

**Optimierung von Transformationsprotokollen und
Entwicklung von SSR Markern für das
Kolumnarwachstum beim Apfel**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Rachel Denise Brandl
geb. am 10.05.1982 in Bingen am Rhein

Mainz, Oktober 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2014

D77 - Mainzer Dissertation

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	I
1.	Bedeutung des Apfels	1
2.	Taxonomie und Ursprung des Apfels	2
3.	Das Apfelgenom	3
4.	Das Kolumnarwachstum	4
4.1	Hormonelle Grundlage des Kolumnarwuchses	5
5.	Marker	6
6.	MAS (Marker Assisted Selection) in der Pflanzenzucht	9
7.	Das Kolumnargen (<i>co-Gen</i>)	10
8.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
8.1	Einsatz von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in der Biotechnologie	17
9.	Biotechnologie beim Apfel	18
10.	Regeneration beim Apfel	20
	Ziel dieser Arbeit	23
B	Material und Methoden	24
1.	Agrobakterien-vermittelte Transformation	24
1.1	Bakterien und Vektoren	24
1.2	Pflanzenmaterial	26
1.3	Ploidiegradanalysen	27
1.4	Nährmedien	27
1.5	Transformation von Agrobakterien	34
1.6	GUS-Färbelösung	35
1.7	Ablauf der Transformation	36
1.8	Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion 'A 14'	41
2.	Markeranalysen	42
2.1	Nachkommenschaften	42
2.2	BSA (Bulked Segregant Analysis)	42
2.3	DNA-Isolation	43
2.4	Entwicklung neuer SSR Marker	44

2.5	Untersuchung der Marker von Bai et al. (2012) _____	44
2.6	Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) _____	45
2.7	Enzymatische S1-Nuklease Verdauung _____	46
2.8	Gelelektrophorese _____	46
2.9	Kapillarelektrophorese _____	47
2.10	Sequenzierung _____	48
2.11	Sequenzauswertung am Computer _____	51
C	<i>Ergebnisse</i>	52
1.	Agrobakterien-vermittelte Transformation _____	52
1.1	Ploidiegradanalysen der Apfelsektion ‘Procats’ und der Sorte ‘Jonagold’ _____	52
1.2	Optimierung der Medien für die Apfelsektionen ‘A 14’ und ‘Procats’ _____	53
1.3	Transformation der Apfelsektion ‘A 14’ _____	56
1.4	Optimierung des Regenerationssystems unter Transformationsbedingungen für die Apfelsektionen ‘A 14’ und ‘Procats’ _____	60
1.5	Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelsektion ‘A 14’ _____	74
1.6	Optimierung des Regenerationssystems und Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelsektion ‘A 14’ _____	82
1.7	Optimierung des Regenerationssystems und Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelsorte ‘Jonagold’ _____	85
2.	Markeranalysen _____	88
2.1	Entwicklung neuer SSR Marker _____	88
2.2	Untersuchung der Marker von Bai et al. (2012) _____	89
2.3	Untersuchung der Nachkommenschaften _____	90
2.4	Untersuchung der Apfelsektionen und Sorten _____	93
D	<i>Diskussion</i>	98
1.	Agrobakterien-vermittelte Transformation _____	98
1.1	Einfluss der Parameter einer Transformation _____	100
1.2	Transgenität an Sprossregeneraten _____	108
1.3	Kritische Schritte einer Agrobakterien-vermittelten Transformation und Möglichkeiten zur Verbesserung der Transformation _____	111
2.	Markeranalysen _____	114
2.1	Kopplungsanalysen der Marker und Definition der <i>co</i> -Region _____	114
2.2	Bonitur des kolumnaren Phänotyps _____	117
2.3	Markeranalysen der Apfelsektionen und Sorten sowie des Baumes 15.67 C _____	119

2.4	Sequenzanalysen der <i>co</i> -Region _____	120
<i>E</i>	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	123
<i>F</i>	<i>Anhang</i>	125
1.	Allgemeine Abkürzungen _____	125
2.	Chemikalien _____	126
3.	Geräte _____	127
4.	Primersequenzen _____	128
5.	Elektronischer Anhang _____	129
5.1	Tabellarische Übersicht der Transformationsversuche _____	129
5.2	DNA-Sequenzen _____	129
5.3	Ergebnisse der Kapillarelektrophorese _____	129
6.	Abbildungsverzeichnis _____	130
7.	Tabellenverzeichnis _____	131
8.	Literatur _____	133
9.	Lebenslauf _____	147
10.	Danksagung _____	150
11.	Eidesstattliche Erklärung _____	151

A Einleitung

1. Bedeutung des Apfels

Der Apfel ist eine weitverbreitet kultivierte und ökonomisch wichtige Frucht mit großer Bedeutung für Ernährung und Medizin (Bhatti & Jha 2010). Er wird auf allen Kontinenten (außer der Antarktis) in den gemäßigten Breitengraden und in höheren Lagen der Tropen kultiviert (Luby 2003).

In 91 Ländern wird der Apfel auf ungefähr 5,3 Millionen Hektar produziert. In den letzten 10 Jahren stieg die Apfelproduktion um ca. 17% (Patel et al. 2012). Mit einer Jahresproduktion von über 75,5 Millionen Tonnen im Jahre 2011 gehört der Apfel hinter den Zitrusfrüchten und Bananen zu einer der bedeutendsten Obstsorten weltweit (FAO 2013). Im Jahre 2011 wurden allein in Deutschland 898.448 Tonnen Äpfel produziert (FAO 2013). Der Großteil



Abb. 1: Früchte der Geisenheimer Apfelsorte 'Goldcats'

wird an der Niederelbe im Alten Land bei Hamburg angebaut. Es ist das größte zusammenhängende Obstanbaugebiet Mitteleuropas und fast 90% der Obstbaufläche entfallen auf den Apfelanbau (Chmielewski 2011).

Die weltweite Verbreitung des Apfels und seine intensive Produktion gehen auf seinen hohen Nährwert und seine große medizinische Bedeutung zurück. Die Inhaltsstoffe Vitamin C, β -Karotin, Kalzium, Kalium, Eisen, Magnesium, Zink, Folsäure, Apfel- und Weinsäure, Pektine, Ballaststoffe, Phenole und Flavenole machen den Apfel von großem Nutzen für die menschliche Gesundheit und für die Behandlung und Vorbeugung von Krankheiten (Boyer & Liu 2004, Veeriah et al. 2006). Die Antioxidantien im Apfelfruchtfleisch und insbesondere in der Schale beeinflussen den Cholesterinspiegel. Sie senken das LDL (Low Density Protein) und steigern die Konzentration von HDL (High Density Protein) (Mayer et al. 2001). Wissenschaftliche Studien zeigen, dass die antioxidative Wirkung des Apfels sogar in der Lage

ist, das Wachstum von Leber- und Darmkrebszellen oder deren Teilung zu hindern (Escarpa & Gonzalez 1998, Wolfe et al. 2003, Liu et al. 2001).

Tab. 1: Weltweite Apfelproduktion im Jahr 2011 (Werte gerundet nach FAO 2013). Menge in Tausend Tonnen

RANG	LAND	2011	RANG	LAND	2011
1	China	35.987	11	Chile	1.169
2	USA	4.275	12	Argentinien	1.116
3	Indien	2.891	13	Ukraine	954
4	Türkei	2.680	14	Deutschland	898
5	Polen	2.493	15	Südafrika	781
6	Italien	2.411	16	Usbekistan	779
7	Frankreich	1.857	17	Nordkorea	752
8	Iran	1.652	18	Spanien	670
9	Brasilien	1.339	19	Japan	655
10	Russland	1.200	20	Mexico	631

2. Taxonomie und Ursprung des Apfels

Bei dem Apfel handelt es sich um ein dikotyles Holzgewächs. Er gehört zu der Familie der *Rosaceae*. Zu ihr gehören viele kommerzielle Früchte, wie beispielsweise die Birnen, Erdbeeren, Kirschen, Pfirsiche, Aprikosen und Mandeln.

Tab. 2: Taxonomie des Apfels (*Malus*)

APFEL	
Gattung	<i>Malus</i>
Klasse	<i>Rosopsida</i> (Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige)
Ordnung	<i>Rosales</i> (Rosenartige)
Familie	<i>Rosaceae</i> (Rosengewächse)
Stamm	<i>Pyreae</i>
Unterstamm	<i>Pyrinae</i> (Kernobstgewächse, früher <i>Maloideae</i>)

Zur Gattung *Malus* gehören 25 bis 35 anerkannte Arten, je nachdem ob sie nach morphologischen oder molekularbiologischen Kriterien eingeteilt werden (Robinson et al. 2001). Neuere Untersuchungen ergaben, dass *Malus x domestica* und *Malus sieversii* dieselbe Art sind und unter dem Namen *Malus pumila* Mill. zusammengefasst werden können (Velasco et al. 2010). Zu *Malus x domestica* gehören heute ca. 20.000 Sorten. Marktwirtschaftlich relevant sind jedoch nur 60 davon. Die weltweit kommerziell bedeutenden Apfelsorten werden der Spezies *Malus x domestica* Borkh. (früher *Pyrus malus* L.) zugeordnet (Way et al. 1991).

Als ursprüngliches Verbreitungsgebiet werden die Regionen vom Kaukasus bis zu dem Altai-Gebirge in Mittelasien vermutet. Eine entscheidende Rolle bei der Evolution und Verbreitung des Apfels fällt der alten Handelsroute entlang der Seidenstrasse zu. Sie erstreckt sich vom Schwarzen Meer über Taschkent, Samarkand und Alma-Ata bis hin zum Westen Chinas.

Die asiatische Sorte 'M. sieversii' wurde zweifelsfrei als Vorfahre unserer heutigen Kulturäpfel identifiziert. Jedoch ist der Beitrag zu dem Genom heutiger Apfelsorten von anderen Wildsorten entlang der Seidenstraße weitestgehend unbekannt (Cornille et al. 2012).

3. Das Apfelgenom

Wie bei den *Pyreae* typisch, besitzt *Malus x domestica* einen Chromosomensatz von $n=17$ (auf den haploiden Zustand bezogen). Die Genomgröße beträgt 742,3 Mb. Bei den meisten Apfelsorten handelt es sich um diploide Organismen. Triploidie bildet eine Ausnahme (Giovannoni 2010).

Das Apfelgenom besteht zu 67% aus repetitiven Elementen. Zusätzlich weisen die Chromosomen 3 und 11, 5 und 10, 9 und 17, 13 und 16 starke Ähnlichkeiten zueinander auf. Dies weist vermutlich auf eine genomweite Duplikation vor 30 bis 45 Millionen Jahren hin. Diese Ähnlichkeiten könnten auch auf den ursprünglich hexaploiden Zustand der meisten Eudikotylen basieren.

Mit 57.386 dokumentierten Genen, besitzt *Malus x domestica* wahrscheinlich die höchste Genanzahl aller Pflanzen. Bislang konnten 11.444 dieser Gene als spezifisch für die Gattung *Malus* identifiziert werden. Darunter findet man ungewöhnlich viele Gene für Transkriptionsfaktoren und *MADS-box* Gene (Velasco et al. 2010). *MADS-box* Gene können die Fruchtentwicklung regulieren, da sie das eventuelle Schicksal des Blütengewebes bei allen bislang untersuchten Pflanzenspezies determinieren (Ng & Yanofsky 2001).

4. Das Kolumnarwachstum

Das Kolumnarwachstum beim Apfel wird durch eine spontane Mutation verursacht (Tobutt 1984). Es ist auf ein dominantes Gen, das sogenannte Kolumnargen (*co*-Gen), zurückzuführen (Lapins 1974, Lapins 1976). Erstmals wurde die Wuchsform bei der Sorte 'McIntosh' in Kanada in den 1960er Jahren entdeckt. Die Mutante wurde nach ihrem Entdecker Wijcik benannt.

Charakteristisch für diese Wuchsform ist ein äußerst kompakter Phänotyp. Die Internodien sind stark verkürzt und die Verzweigung der Seitentriebe reduziert (Lapins 1976). Durch den frühen Triebabschluss der Seitenäste bilden sich an deren Enden zahlreiche Blütenanlagen. Die Früchte sind optimal zur Sonne expositioniert.

Der Stamm ist verdickt und der Durchmesser zwischen Basis und Spitze unterscheidet sich dabei kaum (Bai et al. 2012). Die allgemeine Wuchstendenz ist sehr aufrecht, wobei sich der Durchmesser der Bäume auf ca. 50 cm beschränkt.

Kolumnare Bäume stellen arbeitswirtschaftlich einen großen Vorteil dar und haben ein hohes ökonomisches Potential. Durch ihren kompakten Wuchs können pro Anbaufläche

deutlich mehr Bäume kultiviert werden, als es bei normalwüchsigen Apfelbäumen der Fall wäre. Außerdem benötigen kolumnare Bäume weniger Schnittmaßnahmen und eignen sich sogar für vollautomatische Arbeitsabläufe. Sogenannte Tunnelspritzen und Vollerntemaschinen erleichtern die Bewirtschaftung von den Anbauflächen. Alle diese Vorteile machen den Kolumnarwuchs äußerst interessant für den Anbau des Apfels.



Abb. 2: Kolumnarer Apfelbaum der Geisenheimer Sorte 'Redcats', 3-jährig

4.1 Hormonelle Grundlage des Kolumnarwuchses

Auf Hormonebene scheinen hauptsächlich hohe Konzentrationen von **Cytokinin** für den Kolumnarwuchs verantwortlich zu sein (Looney & Lane 1983, Watanabe et al. 2004, Watanabe et al. 2006). Diese Behauptung deckt sich auch mit Beobachtungen kolumnarer Apfel *in vitro* Kulturen. Diese tolerieren Cytokinine, wie z.B. Benzyl-Adenin-Aminopurin (BA), Kinetin, 2-Isopentenyladenin (2iP), oder N-Phenyl-N-1,2,3-Thiadiazol-5-Urea (Thidiazuron, TDZ) in hohen Mengen. In der *in vitro* Kultur ist die kolumnare Mutante 'McIntosh Wijcik' gegenüber hohen Cytokinin-Konzentrationen toleranter als der Wildtyp 'McIntosh', der bei gleicher Hormonkonzentration abstarb (Lane et al. 1982, Sarwar et al. 1998).

Die Bedeutung des **Auxins** im Zusammenhang mit dem Kolumnarwuchs ist umstritten. Lee und Looney (1977) schreiben der Indol-3-Essigsäure (Indol-3-Acetic Acid, IAA) eine untergeordnete Rolle bei der Wuchsregulation kolumnarer Bäume zu. Looney und Lane (1983) beobachteten dagegen eine Korrelation zwischen der IAA Konzentration und der Ausbildung des kolumnaren Wachstums. Spätere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass gemessene IAA Konzentrationsunterschiede in Sprossspitzen zu gering sind, um für die unterschiedliche Wuchsausprägung zwischen kolumnaren und normalwüchsigen Bäumen verantwortlich zu sein (Watanabe et al. 2004). Bei späteren Untersuchungen wurde eine höhere Cytokinin und IAA Konzentration bei allen untersuchten kolumnaren Bäumen gegenüber den Normalwüchsigen gemessen (Watanabe et al. 2006).

Obwohl die Studien Hinweise liefern, welche Pflanzenhormone wichtig sein könnten für die Regulierung des Kolumnarwachstums, bleibt die unterliegende Physiologie bis heute weitestgehend ungeklärt. Die Art und Ausmaß der Einflüsse von Abscisinsäure (ABA) und Giberillinsäure (GA) auf die Wuchsform ist bis heute nicht geklärt (Bai et al. 2012).

5. Marker

Marker können in drei Gruppen eingeteilt werden, in **morphologische-**, **biochemische-** und **DNA Marker**. Die verschiedenen Markertypen unterscheiden sich in der Qualität der zu markierenden DNA-Sequenzen, in der Art ihres Weitergabe- und Wirkungsmodus, in dem Ausmaß an beobachtbarer Variation sowie in dem experimentellen Aufwand für ihren Nachweis (Bergmann & Leinemann 2000).

Morphologische Marker basieren auf Unterschiede des Phänotyps von Organismen (z.B. Farbe oder Wuchsform) und wurden bis in die 1970er Jahre verwendet. Diese Unterschiede müssen eindeutig bestimmbar und monogenen Ursprungs sein. Dadurch ist ihr Einsatz stark beschränkt. Isoenzyme können als **biochemische Marker** verwendet werden und wurden Anfang der 1970er Jahre entwickelt (Bartels 1971, Bergmann 1973). Bei Isoenzymen handelt es sich um verschiedene Formen eines Enzyms, mit gleicher Funktion aber unterschiedlicher Primärstruktur. Diese Unterschiede können elektrophoretisch identifiziert werden. Das Merkmal der Isoenzym Marker ist, dass sie DNA-Fragmente bekannter Sequenz amplifizieren (Bergmann & Leinemann 2000) und Aufschluss über den Genfluss in segregierenden Populationen geben können (Vallejos & Tanksley 1983). Dies ist notwendig, da bei interspezifischen Kreuzungen sich Allele nicht immer nach Mendel verteilen (Stephens 1949, Rick 1963) und in manchen Fällen sogar bestimmte Allele aufgrund des Selektionsdrucks in präzygotischen Phasen von der Verteilung ausgeschlossen wurden (Khush & Rick 1963, Zamir et al. 1982). Isoenzyme können aber auch als Positivmarker dienen, wenn mit ihnen segregierende BC1 oder F2 Populationen gescreent werden. Dies dient der Identifizierung von Nachkommen mit einer höheren Allelzahl als in der Elterngeneration (Tanksley & Rick 1980). Ein Nachteil der Isoenzym Marker ist jedoch ihre stark begrenzte Anzahl, da je nach Baumart nur 20 bis 30 Enzymloci zur Verfügung stehen (Glaubitz et al. 2000).

Die Wirkungsweise von **DNA Markern** basiert auf der Eigenschaft, Polymorphismen in der Nukleotidsequenz eines Organismus zu erkennen (Francia et al. 2005). Die meisten DNA Marker beziehen sich auf DNA-Abschnitte, die keine kodierende Funktion besitzen oder deren Funktion nicht bekannt ist. Dadurch eignen sie sich auch zur Untersuchung von unbekanntem Genomen. Ein weiterer großer Vorteil von DNA Markern ist, dass sie nicht durch Umweltbedingungen reguliert werden. Dadurch sind sie unabhängig von den Konditionen in denen die Pflanzen wachsen und in allen Pflanzenwuchsstadien anwendbar (Mohan et al. 1997). Bei den meisten DNA Markern handelt es sich um PCR gestützte Techniken, wie

beispielsweise SSR, RAPD, AFLP, SCAR und SNP Marker. Die erzeugten Polymorphismen des untersuchten DNA-Abschnitts werden elektrophoretisch nachgewiesen.

Bei **RFLP** Markern handelt es sich um ein nicht PCR-basiertes DNA Marker System. RFLP steht für Restriction Fragment Length Polymorphism und wurde erstmals 1974 für genetische Analysen benutzt (Grodzicker et al. 1974). RFLP Marker können zum Teil Funktionsgene, die ein bestimmtes Primärprodukt kodieren, identifizieren. Die Mehrzahl der RFLP Marker jedoch bezieht sich auf nicht kodierende Sequenzen (Bergmann & Leinemann 2000). Bei einem RFLP handelt es sich um eine Änderung in der Nukleotidsequenz, die zum Verlust der Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym führt (Knust & Janning 2008). Bei der Änderung der Sequenz kann es sich um Punktmutationen, Deletionen, Insertionen, Inversionen oder Translokationen handeln (Maheswaran 2004). Durch eine DNA-Verdauung mit Restriktionsenzymen entstehen je nach Individuum spezifische, unterschiedliche Fragmente.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Marker sind eine Methode, bei der ebenfalls restringierte Fragmente amplifiziert werden. Sie wurde Anfang der 1990er Jahre von Zabeau und Vos (1993) entwickelt. Sie kombiniert die Zuverlässigkeit der RFLP Methode mit der einfachen Handhabung der PCR-Technik. Die AFLP-Technik wird in drei Schritte eingeteilt:

1) Restriktion und Ligation: Durch die Verdauung genomischer DNA mittels eines häufig schneidenden und eines selten schneidenden Enzyms entstehen unterschiedlich große DNA-Fragmente. An die Enden dieser Restriktionsfragmente werden Adaptoren ligiert. Dadurch entstehen Zielsequenzen, die als Primerbindungsstelle dienen.

2) Selektive Fragmentamplifikation: Durch den Einsatz entsprechender Primer werden nur die Fragmente amplifiziert, die an dem einen Ende durch das häufig schneidende Enzym, und am anderen Ende durch das selten schneidende Enzym restringiert wurden. Die Primer können ein bis drei Nukleotide in das Restriktionsfragment hineinragen. Unterschiede in den Restriktionsenzymchnittstellen verschiedener Genotypen führen zu Polymorphismen. Die selektiven Primer werden radioaktiv oder mit einem fluoreszierenden Farbstoff am 5`-Ende markiert, um die AFLP Marker zu detektieren.

3) Gelanalyse der amplifizierten Fragmente: Die amplifizierten Fragmente werden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und die markierten Fragmente werden detektiert.

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) Primer bestehen zumeist aus lediglich zehn Nukleotiden und zeichnen sich durch einen hohen GC-Gehalt, meist zwischen 60-70%, aus (Weising et al. 2005, Perez et al. 2002). Durch ihre geringe Größe ist die Wahrscheinlichkeit

des Vorhandenseins potentieller Bindungsstellen in der DNA stark erhöht (Hadrys et al. 1992) und können einen hohen Bandenpolymorphismus erzeugen (Weising et al. 2005). Eine PCR mit RAPD Markern ist zwar einfach in der Handhabung und schnell durchzuführen, ein Nachteil dieser Methode ist jedoch ihre geringe Reproduzierbarkeit (Atienzar & Jha 2006).

SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) Marker können aus RAPD oder AFLP Markern abgeleitet werden. Dazu werden die RAPD oder AFLP-Fragmente kloniert und sequenziert. Anhand der gewonnenen Sequenzinformationen werden 24-26 bp lange Primer designt. Die so erhaltenen SCAR Marker liefern in ihrem Ergebnis eine höhere spezifische Bindung und bessere Reproduzierbarkeit.

SNP Marker detektieren Polymorphismen, die auf Veränderungen einzelner Nukleotide (Punktmutationen) zurückzuführen sind und wurden von Jordan und Humphries (1994) entwickelt. Bei dieser Methode sind Informationen über die zu untersuchende Sequenz notwendig. Bei der Gel-basierten Methode werden spezifische Primer so entwickelt, dass sie bei einer Punktmutation nicht mehr binden können und es zu keiner Amplifikation kommt. Bei der nicht Gel-basierten Methode werden entsprechende Regionen amplifiziert und Fehlpaarungen mittels denaturierender „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC) oder „Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry“ (MALD / ITOFMS) detektiert. Diese Techniken sind sehr empfindlich und können Fehlpaarungen detektieren, die auf wenige bis zu einem Nukleotid zurückzuführen sind.

SSR Marker gehören zu den verbreitetsten DNA Markern der letzten Jahre. SSR steht für Simple Sequences Repeats, auch Mikrosatelliten genannt. Es handelt sich dabei um kurze, nicht kodierende, repetitive DNA-Abschnitte. Sie bestehen aus zwei bis vier Basen, die sich 10 bis 100 Mal wiederholen können. Ihre Verteilung erfolgt zufällig im Genom und erstreckt sich über das gesamte Genom. Da sich Anzahl und Länge solcher DNA-Abschnitte stark zwischen den Individuen unterscheiden, wird ein Bandenpolymorphismus erzeugt. Die Ergebnisse der SSR Marker sind zuverlässig reproduzierbar (Liebhard 2002) und die SSR Marker gehören wegen ihrer hohen Variabilität und Kodominanz (d.h., beide Allele eines Locus sind identifizierbar) zu den effizientesten Markertypen (Powell et al. 1996).

6. MAS (Marker Assisted Selection) in der Pflanzenzucht

Die konventionelle Form der Pflanzenzucht basiert auf der phänotypischen Selektion bestimmter Merkmale. Diese Art der Selektion ist jedoch teuer, zeitaufwendig und für bestimmte Merkmale unzuverlässig (beispielsweise für Merkmale, die mit abiotischer Stresstoleranz zusammenhängen) (Francia et al. 2005). Eine wichtige Unterstützung, oder sogar ein völliger Ersatz dieser Selektionsform, bietet die MAS (Marker Assisted Selection). In der Pflanzenzucht verfolgt die Verwendung von DNA Markern innerhalb der MAS das Ziel, Individuen segregierender Nachkommenschaften mit gewünschten Eigenschaften zu selektionieren. Bei dieser Methode wird mittels verschiedener DNA Marker entweder direkt oder indirekt nach Genen selektioniert. Die MAS eignet sich zum Nachweis von Merkmalen, die auf einzelnen Genen beruhen oder von QTL (Quantitative Trait Loci) ausgehen. Unter QTL versteht man quantitative (stetige) Merkmale. Diese werden von mehreren, über das Genom verteilte Loci beeinflusst. Einzelne hätten diese Loci nur einen geringen Einfluss auf die Merkmalsausprägung (Breese & Mather 1957).

Der Erfolg des Einsatzes der MAS hängt von der Lokalisation des DNA Markers in Abhängigkeit des Zielgens zusammen. So können die Marker idealerweise innerhalb des Zielgens liegen oder mit dem Merkmal genetisch assoziiert sein. Im letzteren Fall ist die MAS umso zuverlässiger, je niedriger die Distanz zwischen Marker und Gen ist. Das heißt im Umkehrschluss, je näher der Marker an dem Zielgen liegt, desto weniger treten Rekombinationsereignisse auf, bei denen sich das ausgewählte Marker Allel von dem Merkmal trennen kann. Wird das Zielgen von einem oder mehreren QTLs repräsentiert, ist es wünschenswert entweder zwei den QTL flankierende Marker zu haben, oder ein oder zwei Marker innerhalb der genomischen QTL-Region (Francia et al. 2005).

Für eine effektive Züchtung kolumnarer Apfelbäume ist es notwendig, die Bäume mit der gewünschten Wuchsform bereits im Sämlingsalter zu identifizieren. Unter zwei Jahren ist aber eine Identifikation der Wuchsform äußerst schwer (Hemmat et al. 1997). Für eine zuverlässige Selektion kolumnarer Bäume sind daher Marker erforderlich, die in 100% der Fälle den Kolumnarwuchs detektieren können. Dafür müssen die Marker sehr nah am *co*-Gen, oder innerhalb des *co*-Gens liegen, um Rekombinationsereignisse auszuschließen.

7. Das Kolumnargen (*co*-Gen)

Die kolumnare Wuchsform der Mutante ‘McIntosh Wijcik’ beruht auf einem einzigen dominanten Gen, dem Kolumnargen (*co*-Gen). Bekannt ist, dass es auf dem Chromosom 10 lokalisiert ist (Conner et al. 1997) und in seiner Ausprägung von weiteren Genen beeinflusst wird (Lapins 1976). Durch ein Set von RAPD Markern wurde der *co*-Lokus erstmals auf der Kopplungsgruppe (linkage group, LG) 10 von ‘McIntosh Wijcik’ kartiert (Conner et al. 1997, Conner et al. 1998). Hemmat et al. (1997) entwickelten mit Hilfe von „Bulked Segregated Analysis“ (BSA) mehrere RAPD Marker. Der Marker mit der höchsten Kopplungsrate wurde endsequenziert, um eine STS (Sequence Tagged Site) zu entwickeln. Innerhalb dieser Sequenz wurde ein Mikrosatellit gefunden und ein SSR Marker (SSR_{co}) generiert. Mit diesem Marker konnte das *co*-Gen ebenfalls auf LG 10 kartiert werden und die erste Referenzkarte des Apfels wurde erstellt (Maliepaard et al. 1998). In den letzten Jahren wurden signifikante Fortschritte innerhalb der molekularen Genetik des Apfels gemacht. Dies geschah hauptsächlich durch die Entwicklung von SSR Markern und genetischer Kopplungskarten. Mehrere Marker, die mit dem *co*-Gen koppeln, wurden veröffentlicht:

Tian et al. (2005) gelangen es, zwei SCAR Marker zu entwickeln (SCAR₂₁₆ und SCAR₆₈₂), welche das *co*-Gen flankieren. Aufgrund ihrer relativ weiten Entfernung zum eigentlichen Genort und der damit verbundenen hohen Zahl von Rekombinationsereignissen, können diese Marker aber nur mit 89% (SCAR₂₁₆), bzw. mit 97% (SCAR₆₈₂) Zuverlässigkeit den Kolumnarwuchs detektieren. **Fernández-Fernández et al. (2008)** erstellten ebenfalls eine Kopplungskarte von Chromosom 10 und lokalisierten das *co*-Gen zwischen den SSR Markern CH02c11 und CH03d11 (Liebhard 2002). Diese sind 8,7 cM (CH02c11) und 3,2 cM (CH03d11) vom *co*-Gen entfernt und damit weiter von dem *co*-Gen entfernt als Marker SCAR₆₈₂ von Tian et al. (2005) (siehe Abb. 3 a) und b)). Bei **Moriya et al. (2009)** kosegregieren die Marker CH03d11 und SCAR₆₈₂ mit dem *co*-Gen und der Marker Hi01a03 (Hidras) ist 3,7 cM entfernt (bei der Nachkommenschaft ‘Fuji’ × ‘8H-9-45’, siehe Abb. 3 c)). Bei der Nachkommenschaft ‘Fuji’ × ‘5-12786’ sind die Marker CH03d11 und SCAR₆₈₂ 1,4 cM vom *co*-Gen entfernt und der Marker Hi01a03 7,6 cM.

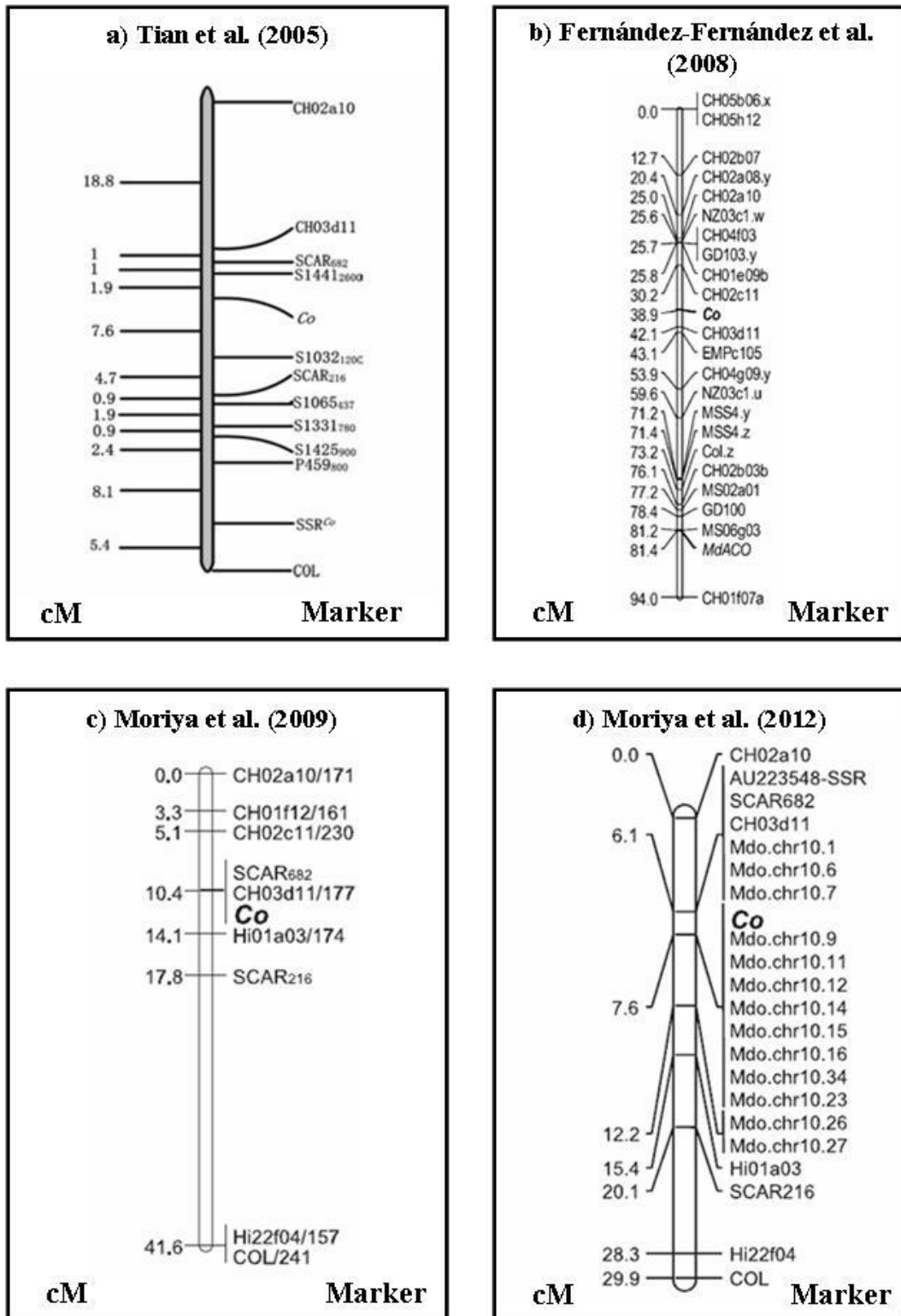


Abb. 3: Kopplungskarten des *co*-Lokus auf Chromosom 10 von Tian et al. (2005), Fernández-Fernández et al. (2008), Moriya et al. (2009) und Moriya et al. (2012). a) Tian et al. (2005): Das *co*-Gen wird von den Markern SCAR₂₁₆ und SCAR₂₈₆ flankiert. b) Fernández-Fernández et al. (2008): Die *co*-Region wird zwischen den SSR Markern CH02c11 und CH03d11 lokalisiert. c) Moriya et al. (2009): Die Marker CH03d11 und SCAR₆₈₂ kosegregieren mit dem *co*-Gen und der Marker Hi01a03 ist 3,7 cM entfernt (bei der Nachkommenschaft ‘Fuji’ × ‘8H-9-45’). d) Moriya et al. (2012): Der *co*-Lokus wird von den Markern CH03d11 und Hi01a03 flankiert. Mittels der Marker Mdo.chr10.11 und Mdo.chr10.15 wurde die *co*-Region auf 196 kb limitiert. Des Weiteren wurden drei neue SSR Marker entwickelt, die mit dem *co*-Gen kosegregieren (Mdo.chr10.12, Mdo.chr10.13 und Mdo.chr10.14).

Die von Velasco et al. (2010) veröffentlichten Genomdaten der Apfelsorte ‘Golden Delicious’ lieferten eine weitere wichtige Voraussetzung für Studien bezüglich des *co*-Lokus. Anhand der Sequenzdaten aus dem Genomprojekt können direkt Marker in der gewünschten Region generiert werden. Die Einschränkung dabei ist, dass die Sequenzdaten für die Sorte ‘Golden Delicious’ gelten. **Moriya et al. (2012)** konnten mit den Genomsequenzdaten von ‘Golden Delicious’ 13 neue SSR Marker entwickeln. Die Feinkartierung des *co*-Lokus wurde mit diesen Markern anhand 1000 F1 Nachkommen aus insgesamt 31 Kreuzungspopulationen vollzogen. Diese SSR Marker liegen zwischen den Positionen von CH03d11 und Hi01a03, welche bereits von Moriya et al. (2009) als eng gekoppelt mit dem *co*-Lokus beschrieben wurden (siehe Abb. 3 c) und d)). Moriya et al. (2012) gelangen es, drei SSR Marker (Mdo.chr10.12, Mdo.chr10.13 und Mdo.chr10.14) zu entwickeln, die mit dem *co*-Gen kosegregieren. Basierend auf drei Rekombinanten, konnte die *co*-Region zwischen den Markern Mdo.chr10.11 (eine Rekombinante) und Mdo.chr10.15 (zwei Rekombinanten) auf 196 kb eingegrenzt werden.

Bai et al. (2012) entwickelten mit Hilfe von Apfel- und Pfirsichgenomdaten anhand 818 Nachkommen verschiedener Populationen sechs neue SSR und einen STS Marker. Diese sind direkt (SSR Marker C1753-3520, C18470-25831, C7629-22009, C6536-31519 und C7223-38004) oder indirekt (STS Marker CV082943STS und SSR Marker C6835.384-2) in der erwarteten *co*-Region kartiert. Das Pfirsichgenom wurde verwendet, da es eine bessere Abdeckung als das Apfelgenom hat. Mit Hilfe des Pfirsichgenoms wurde der STS Marker CV082943STS entwickelt. Dieser spielte eine wichtige Rolle für die Feinkartierung des *co*-Lokus, da er die Entwicklung des SSR Markers C7629-22009 ermöglichte, welcher das *co*-Gen flankiert. Die Feinkartierung wurde durch Analysen anhand von fünf SSR Markern (C1753-3520, C18470-25831, C7629-22009, C6536-31519 und C7223-38004) mit 47 einfach und einer doppelt rekombinierenden Pflanze konstruiert. Davon waren sechs Rekombinanten entscheidend für die Anordnung der Marker. Marker C18470-25831 kosegregiert mit dem *co*-Gen. Marker C1753-3520 und C7629-22009 flankieren das *co*-Gen und grenzen die *co*-Region auf 193 kb ein. Ebenso integrierten Bai et al. (2012) in ihre Kopplungskarte fünf veröffentlichte Marker (SCAR₆₈₂ (Tian et. al 2005), CH03d11 (Liebhard 2002), AU223548, EMPc105 und Hi01a03 (Hidras)). Das *co*-Gen wurde in einen Abschnitt zwischen den Markern EMPc105 und Hi01a03 platziert (siehe Abb. 4). Mit dieser Positionierung des *co*-Lokus ähnelt die Kopplungskarte von Bai et al. (2012) am ehesten der von Moriya et al. (2012). Die Anordnung der vier Marker AU223548, SCAR₆₈₂, CH03d11 und Hi01a03 stimmt mit der Positionierung dieser Marker von Moriya et al. (2012) überein. Der Marker EMPc105 wurde bei Moriya et al. (2012) nicht eingezeichnet. Die relativen Markerpositionen von CH03d11 und EMPc105 bei

Bai et al. (2012), decken sich mit der Karte von Fernández-Fernández et al. (2008), obwohl diese das *co*-Gen auf die andere Seite des Markers CH03d11 kartieren (siehe Abb. 3 b)).

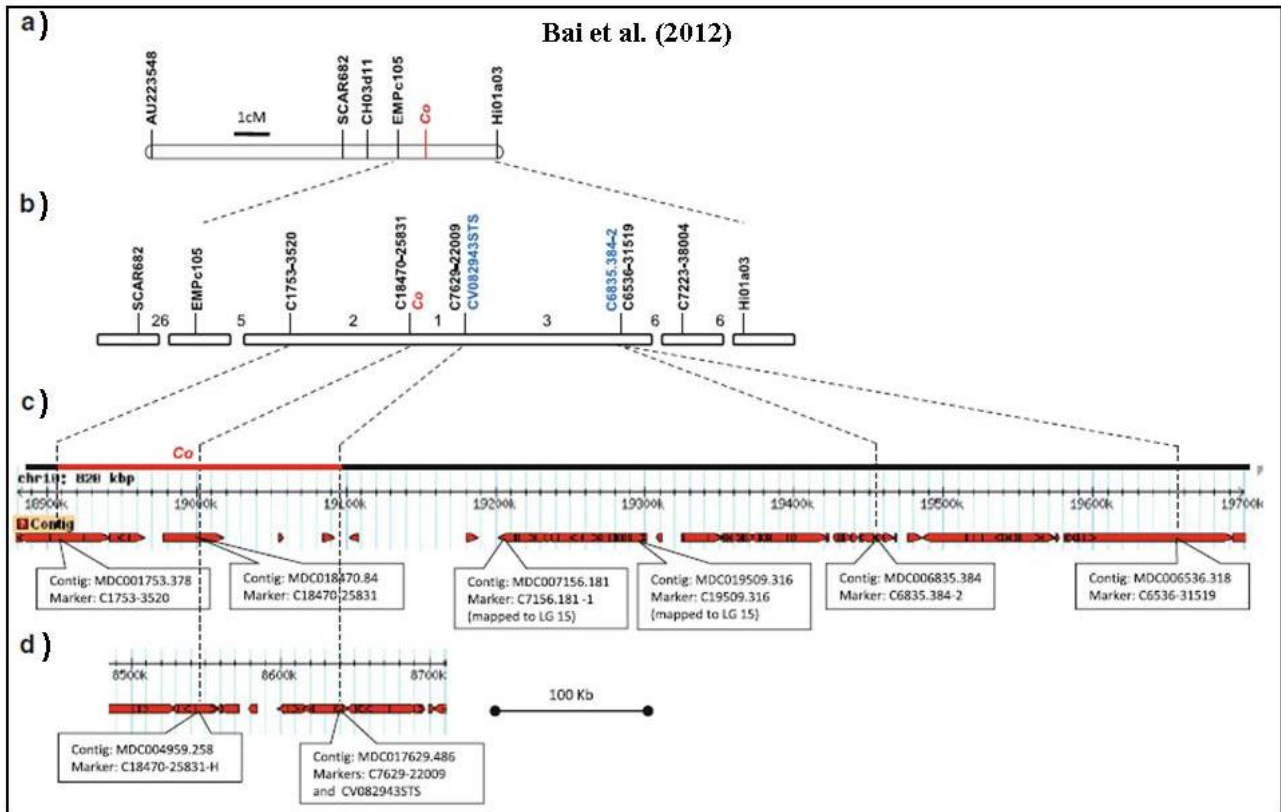


Abb. 4: Feinkartierung des *co*-Lokus auf Chromosom 10 von Bai et al. (2012). a) Anfängliche Kopplungskarte des *co*-Lokus, welcher von den Markern EMPc105 und HI01a03 flankiert wird. b) Kopplungskarte unter Einbeziehung der entwickelten SSR Marker. Marker C18470-25831 kosegregiert mit dem *co*-Gen. Marker C1753-3520 und C7629-22009 flankieren das *co*-Gen und grenzen die *co*-Region auf 193 kb ein. Die Grenzen wurden anhand von einer (Marker C7629-22009), bzw. mit zwei (Marker C1753-352) Rekombinanten ermittelt. c) Contigs (Sequenzdaten) des veröffentlichten ‘Golden Delicious’ Genoms (Velasco et al. 2010), anhand derer die SSR Marker generiert wurden. d) Zwei unverankerte Contigs konnten mit Hilfe der Marker C18470-25831-H (Contig MDC004959.258) und C7629-22009 (Contig MDC017629.486) der *co*-Region zugeordnet werden.

Baldi et al. (2012) entwickelten anhand Sequenzdaten des ‘Golden Delicious’ Genoms (Velasco et al. 2010) SSR Marker und testeten sie an 1551 Individuen aus fünf Nachkommenschaften von vier Kreuzungspopulationen. Sie lokalisierten die *co*-Region zwischen die Marker Co04R10 und Co04R13 (siehe Abb. 5). Der Marker Co04R12 kosegregiert mit dem *co*-Gen. Mit dem Marker Co04R10 wurden fünf Rekombinanten ermittelt, mit dem Marker Co04R13 zwei Rekombinanten. Dadurch wird die *co*-Region auf 393 kb eingeschränkt. Ein weiterer Marker, Co04R11, könnte ebenfalls die Begrenzung der *co*-Region festlegen und den *co*-Lokus weiter, auf 329 kb, eingrenzen. Da aber aufgrund von fehlerhaften Sequenzdaten des ‘Golden Delicious’ Genoms die Linearität der beiden Marker

Co04R10 und Co04R11 nicht eindeutig gesichert ist, wird die *co*-Region zwischen die Marker Co04R10 und Co04R13 eingeordnet.

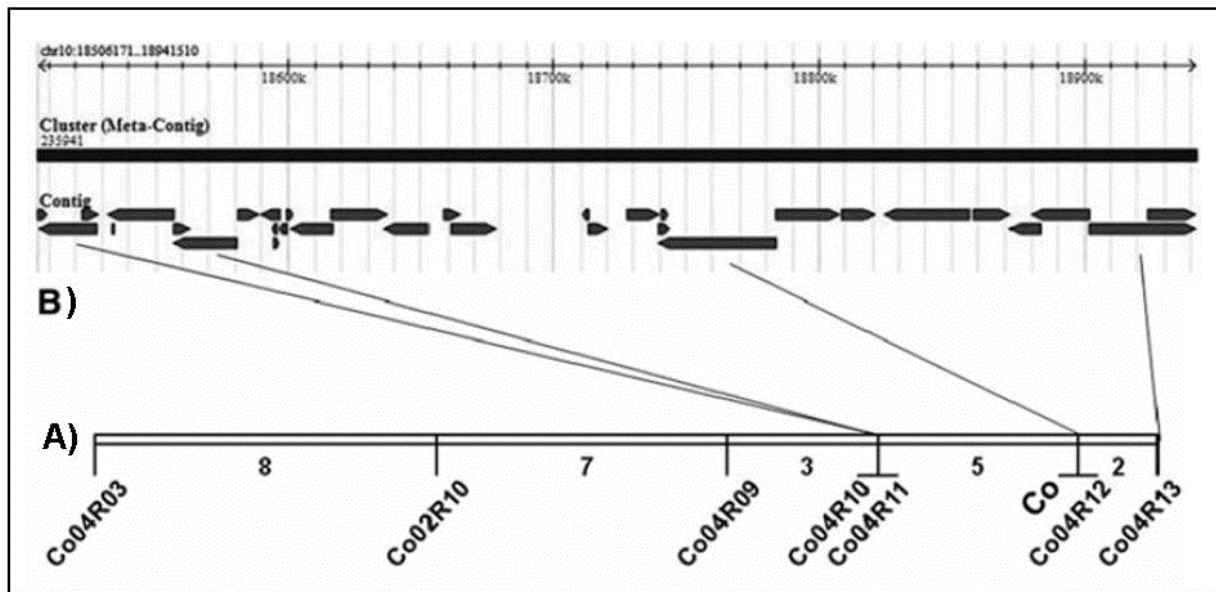


Abb. 5: Feinkartierung des *co*-Lokus auf Chromosom 10 von Baldi et al. (2012). B) Contigs des 'Golden Delicious' Genoms anhand derer die SSR Marker generiert wurden. A) Kopplungskarte unter Einbeziehung der entwickelten SSR Marker. Marker Co04R12 kosegregiert mit dem *co*-Gen. Marker Co04R10 und Co04R13 flankieren das *co*-Gen und grenzen die *co*-Region auf 393 kb ein. Die Grenzen wurden anhand von fünf (Marker Co04R10), bzw. mit zwei (Marker Co04R13) Rekombinanten ermittelt.

Einen Widerspruch bilden die aktuellen Publikationen von Bai et al. (2012), Moriya et al. (2012) und Baldi et al. (2012) bezüglich der gesetzten Grenzen des *co*-Lokus auf dem Chromosom 10. Bai et al. (2012) definieren die Grenze mit Hilfe der Marker C1753-3520 und C7629-22009. Diese liegen bei 18,905 Mbp (C1753-3520), bzw. bei ca. 19,096 Mbp (C7629-22009) und grenzen die *co*-Region auf 193 kb ein. Moriya et al. (2012) haben den *co*-Lokus mit Hilfe der Marker Mdo.chr10.11 (bei 18,757 Mbp) und Mdo.chr10.15 (bei 18,961 Mbp) eingegrenzt und die *co*-Region somit auf 196 kb festgelegt. Die *co*-Region limitierenden Marker von Baldi et al. (2012) liegen bei 18,523 Mbp (Co04R10) und 18,905 Mbp (Co04R13) und grenzen die *co*-Region auf 393 kb ein.

8. *Agrobacterium tumefaciens*

Bei dem *Agrobacterium tumefaciens* handelt es sich um ein gram-negatives **Bodenbakterium**, welches bei Pflanzen **Wurzelhalsgallen** auslösen kann. Es wurde erstmals von Smith und Townsend (1907) beschrieben. Heute ist bekannt, dass es sich bei dem Bakterium um ein Pathogen handelt, welches eine große Bandbreite an potentiellen Wirten besitzt. Seine natürlichen Wirte sind die meisten dikotylen Pflanzen (wie auch der Apfel) sowie einige monokotyle Pflanzen (De Cleene & De Ley 1976).

Das *A. tumefaciens* enthält ein ca. 200 kbp großes Ti-Plasmid (Ti = Tumor induzierend). Die T-DNA wird von je 25 bp großen Sequenzwiederholungen begrenzt (Jouanin et al. 1989) und trägt Gene für die Synthese von Pflanzenhormonen (Auxin und Cytokinin) und Opinen. Sie wird als einzelsträngige DNA in das Pflanzenzellgenom integriert, wodurch wird die Pflanzenzelle dazu veranlasst wird, Nährstoffe für das Bakterium (Opine) und Phytohormone zu produzieren. Letztere sind für ein unkontrolliertes Zellwachstum im Zusammenhang mit der Wurzelhalsgallenbildung verantwortlich. Den gesamten Vorgang kann man in fünf Schritte einteilen:

- a) Ausschüttung von Botenstoffen verletzter Pflanzenzellen und dadurch Anlockung von *A. tumefaciens*
- b) Phosphorylierung von Membranproteinen und Synthetisierung der vir-Proteine
- c) Herausschneiden der T-DNA
- d) Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle und Integration in das Genom der Pflanze
- e) Produktion von Opinen und Phytohormonen

a) Zunächst gibt eine verwundete Pflanzenzelle phenolische Verbindungen frei. Dabei handelt es sich um das Phenolderivat Acetosyringon (Stachel et al. 1985). Durch Acetosyringon wird das Agrobakterium angelockt (Chemotaxis) und anschließend findet die Konjugation (seitliche Anlagerung) der Pflanzen- und Bakterienzellen statt.

b) Die phenolische Verbindung lockt nicht nur die Bakterien an, sondern veranlasst die Autophosphorylierung und damit Aktivierung der Transmembran-Proteinkinase VirA. Phosphoryliertes VirA aktiviert ebenfalls durch Phosphorylierung VirG (Jin et al. 1990 (a), Jin et al. 1990 (b)). Neben den Phenolen, sind Zucker und ein niedriger pH-Wert und PO₄-Wert für die VirA und VirG Aktivierung verantwortlich (Brencic et al. 2005, Palmer et al. 2004). Die phenolische Verbindung ist zwar absolut notwendig für die *vir*-Gen Expression, jedoch erhöhen

die anderen Parameter die Empfindlichkeit des Bakteriums gegenüber den Phenolen (McCullen & Binns 2006). Das aktivierte VirG bindet an den *vir*-Promotoren und aktiviert die Transkription der *vir*-Gene (Brencic et al. 2005).

c) Die translatierten Proteine VirD1 und VirD2 schneiden die einzelsträngige T-DNA aus dem Ti-Plasmid heraus.

d) VirD2 bleibt kovalent am 5'-Ende gebunden und transportiert die DNA durch einen VirB/D4 Komplex-Kanal (Typ IV Bakteriensekretionsapparat) in die Pflanzenzelle (Christie 2004). Dieser Prozess verlangt die Interaktion mit dem bakteriellen T-Pilus und mindestens einem wirtsspezifischen Protein (Hwang & Gelvin 2004). Das *virE*-Protein wird ebenfalls durch den Kanal transportiert und lagert sich im Zytoplasma der Pflanzenzelle um den DNA-Strang. Zusammen bilden sie den T-Komplex (Binns et al. 1995). Der T-Komplex wird in den Zellkern transportiert und danach die T-DNA in das Pflanzengenom integriert.

Die Pflanzenzelle beginnt nun, die auf der T-DNA vorhandenen Gene zu exprimieren. Das sind zum einen Gene für Opine. Dabei handelt es sich um seltene Aminosäurederivate des Arginins, zu denen beispielsweise Octopin und Nopalin gehören. Sie dienen *A. tumefaciens* als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und können von der Wirtszelle nicht weiterverarbeitet werden (Tempe & Petit 1982). Des Weiteren kommt es zur Expression der bakteriellen Auxin- und Cytokiningene. Dies führt in den transformierten Pflanzenzellen zu untypisch hohen Konzentrationen dieser Hormone. Dadurch kommt es in dem betroffenen Bereich zu einem verstärkten Teilungswachstum und damit zur Bildung der Wurzelhalsgallen.

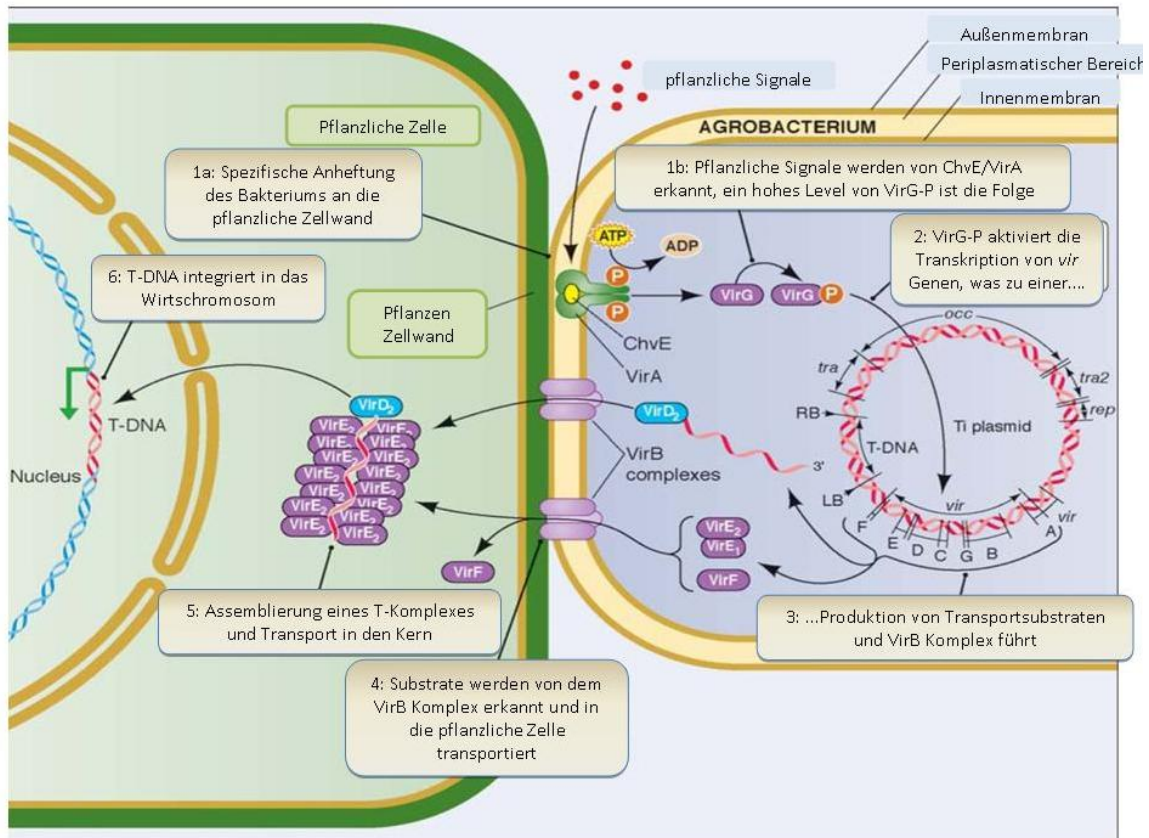


Abb. 6: Schematische Abbildung der DNA Übertragung mittels *A. tumefaciens*, verändert nach McCullen & Binns 2006. 1a) Die Bakterienzelle bindet an die verletzte Pflanzenzelle. 1b) Durch spezifische Signale wird das Membranprotein VirA phosphoryliert. Dies wiederum aktiviert *virG*. 2 und 3) Phosphoryliertes VirG bindet an Promotoren der *vir*-Genen, wodurch diese transkribiert werden. Die Genprodukte VirD1 und VirD2 schneiden die einzelsträngige T-DNA aus dem Plasmid, VirD2 bleibt kovalent am 5'-Ende der DNA gebunden. 4) Der VirB Komplex befördert die T-DNA und VirE in das Zytoplasma der Pflanzenzelle. 5) Dort lagert sich VirE um die T-DNA und bildet den stabilen T-Komplex. Dieser wird in den Nucleus transportiert. 6) Integration der T-DNA in das Pflanzenzellgenom.

8.1 Einsatz von *Agrobacterium tumefaciens* in der Biotechnologie

Die natürliche Eigenschaft von *A. tumefaciens* DNA in Pflanzenzellen zu übertragen, macht man sich in der Biotechnologie gezielt zu nutze. Rekombinante Agrobakterienstämme, in denen die T-DNA durch Zielgene ersetzt wurden, sind die effizientesten Transporter, um Fremd-DNA in Pflanzen einzubringen und um transgene Pflanzen zu erzeugen (Draper et al. 1988). Für eine Agrobakterien-vermittelte Transformation ist es zunächst erforderlich, die Fremdgene in das Plasmid zu integrieren und Tumorgene zu entfernen. Zambryski et al. (1983) gelangen es erstmals, die tumorauslösenden Gene aus der T-DNA eines Wildtypstammes zu entfernen und dadurch ein entwaffnetes Ti-Plasmid herzustellen. Die Vektoren wurden durch homologe Rekombination eines intermediären Vektors mit dem entwaffneten Ti-Plasmid

hergestellt und als kointegrative Vektoren bezeichnet. Da die Integration von Fremd-DNA in ein Ti-Plasmid technisch sehr aufwändig ist und große Plasmide nicht sehr effizient transformiert werden können, wurde ein weiteres Vektormodel entwickelt. Basierend auf Hoekema et al. (1983) und De Framond et al. (1983) wurde das binäre Vektorsystem etabliert. Bei binären Vektorsystemen liegt das Fremdgen auf einem Plasmid (binärer Vektor) und die *vir*-Gene auf einem weiteren Plasmid (Helferplasmid). Die Helferplasmide sind nicht kanzerogen, d.h. die T-Region fehlt teilweise oder völlig, wodurch bei der zur transformierenden Pflanze kein Krebs ausgelöst wird (Gelvin 2003). Der Vorteil der Binärvektoren ist, dass sie mit 5 bis 17 kb deutlich kleiner sind als normale Ti-Plasmide. Sie sind dadurch technisch einfacher zu handhaben, stabiler und können mit einer höheren Effizienz transformiert werden.

Des Weiteren müssen selektive Marker integriert werden. Durch die Verwendung einer Antibiotikaresistenz können transformierte Zellen in Gegenwart des Antibiotikums wachsen und so selektiert werden. Um diese bakterielle Sequenz zu regulieren, benötigt man prokaryotische Promotoren, wie zum Beispiel den CaMV-35S Promotor aus dem Blumenkohl Mosaik Virus. Er ist ein häufig verwendeter Promoter und zeichnet sich durch eine hohe transkriptionelle Aktivität in den meisten Geweben bei den meisten Pflanzenspezies aus (Benfey & Chua 1990). Das rekombinante Plasmid mit dem integrierten Gen muss dann wieder in die Zelle von *A. tumefaciens* transferiert werden. Durch den Kontakt von *A. tumefaciens* mit verletzen Pflanzenzellen der zu transformierenden Geweben oder Organen, wird die Produktion der *vir*-Proteine induziert und die Übertragung der bakteriellen DNA in das Pflanzengenom findet statt (siehe auch 8. *Agrobacterium tumefaciens*).

9. Biotechnologie beim Apfel

Die Leistungsverbesserung durch konventionelle Züchtung ist gerade beim Kulturapfel ein sehr kostenintensiver und langwieriger Prozess. Aufgrund der langen juvenilen Phase von sechs bis acht Jahren (Korban et al. 1992) und einem stark heterozygotem Charakter des Genoms kann ein Züchtungsprozess sich über mehrere Generationszyklen erstrecken. Nach dem Einkreuzen von Wildformen mit gewünschten Eigenschaften sind wiederholte Rückkreuzungen notwendig, um die unerwünschten Eigenschaften der Wildformen wieder zu eliminieren (Szankowski 2002). Somit können Jahrzehnte vergehen, bis neue Sorten zur Verfügung stehen. Auch die

hohe Selbstinkompatibilität des Apfels stellt Züchter vor eine große Herausforderung. Diese Nachteile machen den Einsatz von Gentechnik für den Apfel interessant. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, Eigenschaften gezielt und ohne lange Kreuzungsprozesse zu beeinflussen.

Genetische Transformationen beim Apfel fokussieren sich auf Verbesserung von Krankheitstoleranzen, wie z.B. gegen Viren, Bakterien und Pilze. Des Weiteren sind Modifikationen im Wachstum der Bäume oder Erhöhungen der Resistenz gegenüber abiotischem Stress Gegenstand der Forschung (Gambino & Gribaudo 2012). Zu den Eigenschaften, die den Endverbrauchern wichtig sind, zählen hauptsächlich die Verbesserung der Fruchtqualität bezüglich Inhaltsstoffe, Geschmack und Lagerfähigkeit. Außerdem ist die Reduzierung von Allergenen im Apfel ein wichtiges Forschungsgebiet (Aldwinckle & Malnoy 2009). In Europa ist aber im Allgemeinen keine Akzeptanz der Verbraucher gegenüber genetisch modifizierten Organismen (GMOs) vorhanden. Daher wird versucht, die Akzeptanz beim Endverbraucher zu erhöhen, beispielsweise durch die Entwicklung von antibiotikaresistenzfreien gentechnisch veränderten Äpfeln. Das Enzym Phosphomannose Isomerase (pmi) als Marker befähigt den Apfel, eine alternative Kohlenstoffquelle (Mannose) zu nutzen und dient anstelle von Antibiotika für eine Selektion (Degenhardt & Szankowski 2006, Degenhardt et al. 2006). Trotzdem sind laut Eurobarometer 2006 in Europa 62% der Bevölkerung besorgt über GMOs in der Nahrung.

Genetische Transformationen beim Apfel eignen sich auch als **Funktionsanalysen von Genen**. Durch gezielte Transformationen einzelner Gene soll es in der Pflanze zur Überexpression des Genes kommen. Anhand der Veränderung der transformierten Pflanze können Rückschlüsse auf die Funktion des Genes gezogen werden. Somit könnte ein mögliches Kandidatengen für den Kolumnarwuchs in einen normalwüchsigen Apfelbaum transferiert werden. Würde dieser seine Wuchsform ändern und kolumnar wachsen, handelt es sich bei dem transformierten Gen höchst wahrscheinlich um das *co*-Gen. Der umgekehrte Weg um Aussagen über die Funktion eines Genes treffen zu können, ist es im Genom der Pflanze auszuschalten. Solche „Knock-out“ Mutanten werden durch die Silencing RNA Interferenz (RNAi) Methode erhalten, welche erstmals von Waterhouse et al. (1998) bei Pflanzen beschrieben wurde. Die Methode beruht auf RNAi-Konstrukte, welche in das Pflanzengenom transferiert werden. Die transformierten Konstrukte bestehen aus zwei komplementären Teilsequenzen des Zielgens. Diese sind in „sense“ und „antisense“ Richtung über ein Intron verbunden. Wird dieses Konstrukt in der Pflanze transkribiert, hybridisieren die komplementären RNA-Stränge und bilden zusammen mit dem Intron eine Haarnadelstruktur aus. Diese doppelsträngige RNA führt dann zu dem natürlichen Prozess der RNA Interferenz oder zum „posttranscriptional gene silencing“

(PTGS). Ein solcher „Knock-out“ des *co*-Gens würde bei einem kolumnaren Apfelbaum einen normalen Wuchs hervorrufen.

Das Mittel der Wahl für eine Transformation beim Apfel stellt die **Agrobakterien-vermittelte Transformation** dar. Dabei wird in 95% der Fälle auf *A. tumefaciens* und in 5% auf *A. rhizogenes* zurückgegriffen (Pawlicki-Jullian et al. 2002, Yamashita et al. 2004). Berichte über biolistische Transformationen beim Apfel liegen nur vereinzelt vor (Sanford et al. 1993). Im Gegensatz zu Modellpflanzen ist beim Apfel die Agrobakterien-vermittelte Transformation problematisch und es besteht Forschungsbedarf. Das Hauptproblem ist, dass die Transformationsrate sehr stark von den verschiedenen Genotypen abhängig ist (De Bondt et al. 1994). Als Transformationseffizienz bezeichnet man den Anteil aller transformierten Explantate, die einen transgenen Spross hervorgebracht haben. Die erste beschriebene Apfelsorte, die transformiert wurde, ist *Malus x domestica* cv. ‘Greensleeves’ mit einer Transformationseffizienz von 0,5-1% (James et al. 1989). Seitdem wurden viele Protokolle entwickelt, um andere Apfelsorten zu transformieren. Die Transformationsrate bleibt dabei jedoch sehr niedrig 0,2-15% (Aldwinckle & Malnoy 2009). Zukünftige Forschungen widmen sich der Entwicklung eines Genotypen-unabhängigen Transformationssystems, um den Vorteil dieser Technik für die Züchtung zu erhöhen.

10. Regeneration beim Apfel

Bei höheren Pflanzen sind die Organogenese und die somatische Embryogenese aus Zellen und Gewebe die zwei *de novo* Pfade der Regeneration (Litz 1992). Eine Regeneration bei Pflanzen tritt ein, nachdem Zellen aus organisiertem Gewebe sich zunächst dedifferenzieren, um sich dann wieder zu Meristemen oder somatischen Embryonen zu reorganisieren (Yepes & Aldwinckle 1994). Eine wichtige Voraussetzung für ein erfolgreiches Agrobakterien-vermitteltes Transformationssystem beim Apfel ist die Erhöhung der Regenerationseffizienz (Klee & Rogers 1989). Für den Gentransfer über die biolistische Methode stellt die Regeneration ebenfalls eine entscheidende Grundlage dar (Sanford et al. 1993). Mit einem erfolgreichen Regenerationssystem steht und fällt ein erfolgreiches Gentransfersystem für mehrjährige Pflanzen (Dandekar 1992).

Für die Apfeltransformation spielt die Organogenese von Adventivsprossen aus Blattexplantaten die größte Rolle. Unter Adventivorganogenese versteht man die Bildung neuer

Organe. Beispielsweise können Sprosse und Wurzeln sich aus Explantaten verschiedener pflanzlicher Organe, wie z.B. Blätter, Sprossachsen und Wurzeln bilden.

Erste Berichte über Meristemorganisation und Bildung von Wurzelprimordien aus Kalluskulturen erfolgten von Nobécourt (1939) und Camus (1949). Die erste erfolgreiche *in vitro* Regeneration von Adventivsprossen aus Apfelpewebe wurde von Liu et al. (1983) vollzogen, welche erfolgreich Sprosse aus Apfelsämlingen regenerierten.

Die **Faktoren**, welche die Regeneration beeinflussen, sind beispielweise die Stickstoffquelle und deren Konzentration, die Wachstumsregulatoren (Plant Growth Regulators, PGRs), die Inkubationskonditionen, die Blattherkunft, das Blattalter, die Verwundung und die Orientierung des Explantats (Yepes & Aldwinckle 1994). Der größte Einfluss geht aber von dem Genotyp aus, da die Regenerationseigenschaften zwischen den Sorten sehr stark variieren (Bulley & James 2004).

Das häufigste verwendete **Explantat** bei *Malus* sp. für die Sprossregeneration ist ein *in vitro* Blatt (Welander 1988). Weitere Explantate, die verwendet wurden, sind Kotyledonen und die embryonale Achse bei der Apfelsorte 'Gloster' (Keulemans & De Witte 1994). Liu et al. 1998 verwendeten etiolierte Internodien als Explantate von der Sorte 'Royal Gala'. Ebenso wurden die Wurzeln von intakten mikropropagierten Pflanzen (*Malus prunifolia* Borkh. var. 'Ringo Asami') verwendet (Masuda et al. 1988). Caboni et al. (2000) verwendeten vegetativ vermehrte Sprossspitzen als Explantate und konnten zahlreiche Sprosse aus allen untersuchten Genotypen regenerieren ('Jork9', 'M26', 'Gala' und 'McIntosh'). Diese Methode jedoch benötigt mehr Pflanzen als Ausgangsmaterial und eine längere Bearbeitungszeit gegenüber der Verwendung von Blattexplantaten.

Der **Ursprungsort der Regenerate** aus dem Explantat ist abhängig von Spezies und Explantattyp. Welander und Maheswaran (1992) nannten beim Apfelblattexplantat die Mesophyllzellen um die Leitbündel als den Hauptursprungsort von Adventivsprossen. Yancheva et al. (2003) unterscheiden dagegen zwei Regenerattypen. Zum einen werden frühe Sprosse beschrieben, die auf der Explantatoberfläche innerhalb der ersten 14 Tage auftreten. Sie stammen von epidermalen und subepidermalen Zellschichten, die nicht in Kontakt mit den Leitbündeln stehen. Zum anderen wurde beobachtet, dass Sprosse die später regenerierten, von internen *de novo* geformten meristematischen Zentren stammen.

Für die Meristem- und spätere Adventivsprossbildung gibt es zwei Entwicklungsmöglichkeiten. Entweder **direkt** ohne eine Zwischenstufe oder **indirekt** über ein intermediäres Kallusstadium (Litz & Gray 1992). Bei der indirekten Form wird das Meristem aus unspezialisierten und dedifferenzierten Zellen aus Kallus- oder Suspensionskulturen geformt (Yancheva et al. 2003,

Gahan & George 2008). Beim Apfel treten je nach Genotyp entweder die indirekte oder die direkte Regeneration auf (Korban et al. 1992). Bei der Sorte 'Greensleeves' können sogar beide Formen auftreten (James et al. 1988).

Der gesamte Prozess der Regeneration wird von Sugiyama (1999) in drei Phasen eingeteilt:

1. Phase: Kompetenz (Dedifferenzierung). Die Zellen erwerben eine Kompetenz. Darunter versteht man die Fähigkeit, die Hormonsignale der Organinduktion zu beantworten (Howell et al. 2003). Die Dedifferenzierung der Zellen ermöglicht diese Erwerbung der organbildenden Kompetenz und kann durch eine Verletzung ausgelöst werden (Sugiyama 1999.) Verwundete Oberflächen bilden zudem die Voraussetzung um Kontaktflächen zu bilden, die für die Agrobakterien-vermittelte Transformation notwendig sind (Yepes & Aldwinckle 1994). Zusätzlich liefern Schnittflächen einen Transportweg, um Nährstoffe und PGRs effizient aus dem Medium in das Explantat zu befördern (Sarwar & Skirvin 1997).

2. Phase: Determination. Die kompetenten Zellen im Explantat sind determiniert für spezifische Organbildungen, welche von einer spezifischen Balance der PGRs beeinflusst werden. Die Adventivsprossbildung aus kompetenten Zellen könnte von Cytokinin induziert werden (Gahan & George 2008).

3. Phase: Morphogenese. Sugiyama (1999) diskutiert, dass die Morphogenese unabhängig von exogen zugefügten PGRs erfolgt. Yancheva et al. (2003) fanden jedoch heraus, dass der Auxintyp, die Länge und das Timing der Applikation sowohl kritisch für die Aktivierung, als auch für das Fortschreiten des Entwicklungsprogramms der pflanzlichen Zelle sind.

Die **Phytohormone** spielen demnach eine entscheidende Rolle bei der Regeneration. Fasolo et al. (1989) diskutieren ein hohes Cytokinin- und niedriges Auxin-Verhältnis als Voraussetzung für die Sprossregeneration aus Apfelblattexplantaten. Obwohl der Erfolg der Regeneration auf dieser spezifischen Balance der Phytohormone basiert, ist das Cytokinin vermutlich hauptverantwortlich für den Regenerationsprozess. Der optimale Cytokinintyp und seine Dosierung hängen dabei weitestgehend vom Genotyp des Apfels ab (Yepes & Aldwinckle 1994). Bei Cytokinin handelt es sich um N6-substituierte Adenine mit wuchsregulatorischer Aktivität, welche in Pflanzen Zellteilung hervorrufen und eine Rolle in der Zelldifferenzierung spielen können (McGaw & Burch 1995). Cytokinine im Medium induzieren während der Gewebekultur die Zellteilung und die Organogenese (Howell et al. 2003) und beeinflussen andere physiologische Prozesse und Entwicklungsprozesse (Ferreira & Kieber 2005). Der Erfolg der Regeneration ist abhängig von dem Typ und der Konzentration des verwendeten Cytokinins, da die Aufnahme, der Transport und der Stoffwechsel sich zwischen den Sorten unterscheiden und sie beispielsweise mit den endogenen Cytokinin des Explantats

interagieren können (Werbrouck et al. 2008). Man unterscheidet zwischen zwei Klassen von Cytokininen, je nach chemischer Struktur und der Seitenkette: Isoprenoide und aromatische Cytokinine. Sie unterscheiden sich in ihrer Biochemie, ihren Rezeptoren, ihrer biologischen Aktivität und ihrem Stoffwechsel (Werbrouck et al. 2008). Von den natürlichen Cytokininen ist das Benzyladenin (**BA**) das meist verwendete Cytokinin in der Apfelnkultur (Barciszewski et al. 1999). Das wichtigste verwendete synthetische Cytokinin ist Thidiazuron (**TDZ**). Wie andere synthetische Cytokinine scheint es weniger anfällig für den enzymatischen Abbau *in vivo* zu sein, als es natürliche Cytokinine sind. Deswegen kann TDZ in niedrigen Konzentrationen die Proliferation größerer Seitenknospen induzieren. Bei vielen Gehölzen hat TDZ sich als besonders geeignet für die Mikropropagation und Regeneration schwer zu kultivierenden Spezies oder Genotypen herausgestellt (Huetteman & Preece 1993).

Ziel dieser Arbeit

Ziel der Arbeit war es, molekularbiologische Untersuchungen zum Kolumnarwachstum des Apfels durchzuführen. Zum einen sollten SSR Marker entwickelt werden, welche zuverlässig den Kolumnarwuchs auf DNA-Ebene detektieren können. Zusätzlich sollten in der Literatur beschriebene Marker bezüglich ihrer Rekombination überprüft werden, um Aussagen über die Eingrenzung des *co*-Lokus treffen zu können.

Für die funktionelle Überprüfung von Kandidatengenen des *co*-Gens, sollte ein Agrobakterienvermitteltes Transformationssystem für die Geisenheimer Apfelselektionen *Malus x domestica* Borkh. 'A 14-190-93' und *Malus x domestica* Borkh. 'Procats 28' adaptiert werden. Dies setzte zunächst die Etablierung eines effizienten und zuverlässigen Regenerationssystems voraus.

B Material und Methoden

1. Agrobakterien-vermittelte Transformation

Für die funktionelle Überprüfung von Kandidatengen des *co*-Gens wurde ein Agrobakterien-vermitteltes Transformationssystem für die Geisenheimer Apfelselektionen *Malus x domestica* Borkh. 'A 14-190-93' und *Malus x domestica* Borkh. 'Procats 28' basierend auf dem Protokoll von Bulley und James (2004) adaptiert. Als Kontrolle für ein erfolgreiches Transformationssystem, wurde eine in der Literatur als transformierbar beschriebene Sorte untersucht. Dafür diente der Genotyp *Malus x domestica* Borkh. 'Jonagold', welcher nach dem Protokoll von Viss et al. (2003) transformiert wurde.

1.1 Bakterien und Vektoren

1.1.1 Bakterienstämme

Für die Transformationen wurden die *Agrobacterium tumefaciens* Stämme LBA4404 und EHA105 verwendet. Bei dem Stamm **LBA4404** handelt es sich um ein entwaffnetes Derivat des virulenten *A. tumefaciens* Stamms LBA4213. Ein Bestandteil des binären Vektorsystems ist das Helferplasmid pAL4404. Es leitet sich vom Wildtyp Ti-Plasmid pAL231 ab (Ooms et al. 1982). Zusätzlich ist noch ein Vektor vorhanden, der unter 1.1.2 genannt ist. Der Stamm **EHA105** ist ebenfalls ein entwaffnetes Derivat. Er geht zurück auf den hypervirulenten *A. tumefaciens* Stamm A281 und enthält das Helferplasmid pEHA105 (abgeleitet vom Wildtyp Ti-Plasmid pTiBo542) in einem C58 chromosomalen Hintergrund (Hood et al. 1986). Als weiterer Bestandteil des binären Vektorsystems ist ebenfalls noch ein unter 1.1.2 genannter Vektor enthalten.

1.1.2 Vektoren

Die Vektoren des binären Vektorsystems **pFxB-114.1** und **pCHeG** enthalten das *hptII*-Gen, welches für die Hygromycin-Phosphotransferase (ein Hygromycin detoxifizierendes Enzym) kodiert (Rao et al. 1983). Dieses Enzym ermöglicht die Selektion zwischen transformierten und nicht transformierten Regeneraten auf Hygromycin-haltigen Selektionsmedien. Des Weiteren enthalten die Vektoren die Sequenz für *eGFP*, welche für das „enhanced Green Fluorescence Protein“ kodiert und als Reportergen für ein erfolgreiches

Transformationssystem dient (Sheen et al. 1995). Die Vektoren **pCambia1301** und **pCambia1305.1** enthalten ebenfalls das **hptII-Gen** (siehe Abb. 7). Der Vektor pCambia2305.1 besitzt das **nptII-Gen** und ist ansonsten identisch mit dem Vektor pCambia1305.1.

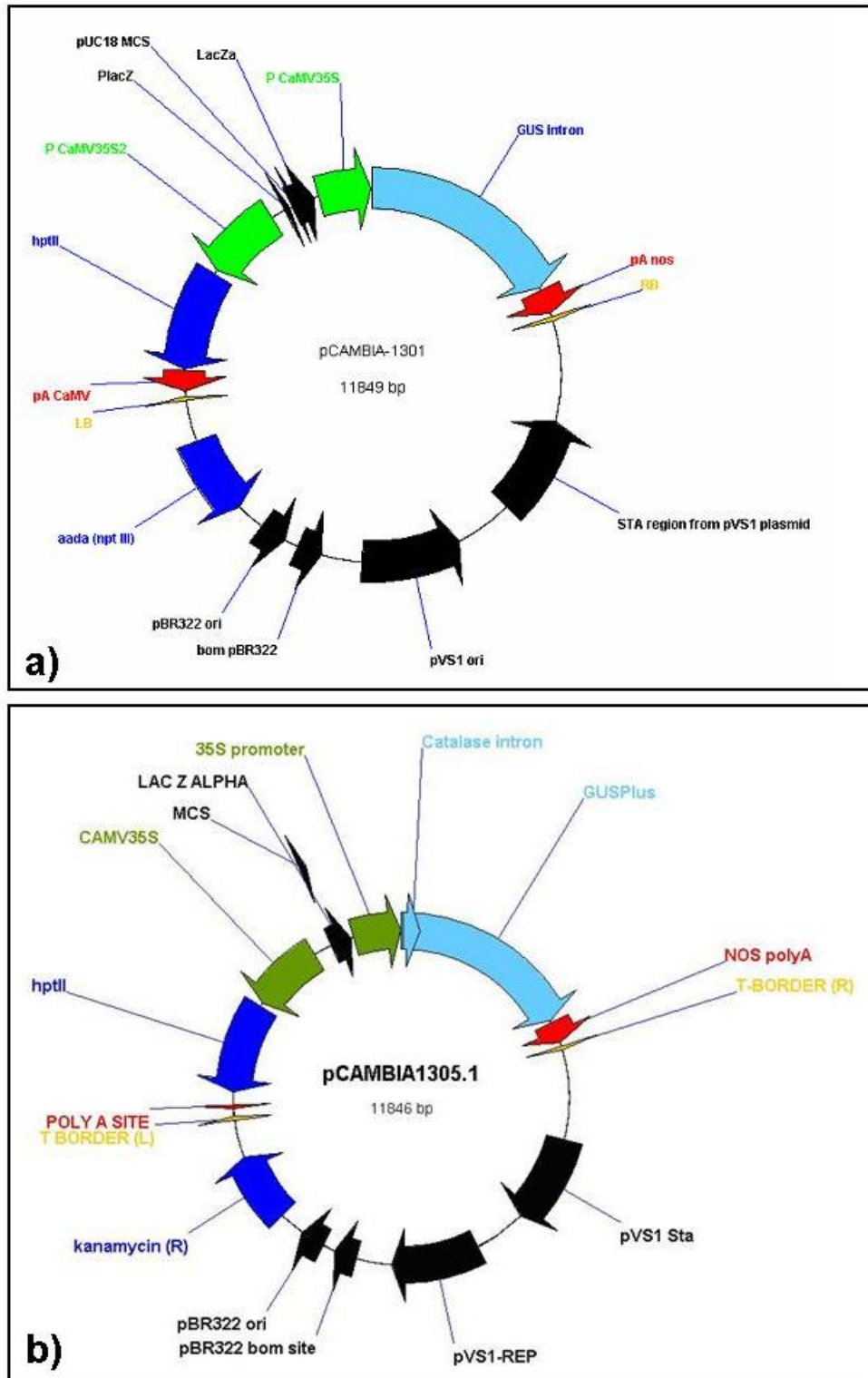


Abb. 7: Schematische Darstellung der Vektoren **pCambia1301** und **pCambia1305.1**. Der Vektor pCambia1301 (a) enthält als Reportergen ein **GUS-Intron**, der Vektor pCambia1305.1 (b) enthält das **GUSPlus-Intron**. Die Antibiotikaresistenzen richteten sich gegen Hygromycin.

Das *nptII*-Gen kodiert für die Neomycin-Phosphotransferase (ein Neomycin detoxifizierendes Enzym) und verleiht Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin (Kan). Als optische Kontrolle enthält der Vektor pCambia1301 das **GUS-Intron** aus *E. coli*. *GUS* kodiert für das Enzym β -Glucuronidase, welches das Substrat 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure (X-Gluc, ein Cyclohexylammoniumsalz) zu einem blauen Farbstoff verstoffwechseln kann. In Anwesenheit des Substrates kommt es bei transformierten Zellen demnach zu einer blauen Färbung, welche Gus-positive Zellen repräsentiert (Friedrich 2005). Diese GUS-positiven Zellen können zum einen auf einer stabilen Expression des *GUS*-Gens beruhen. Unter einer stabilen Expression versteht man den dauerhaften Einbau des Gens in das Pflanzengenom und die Weitergabe der Information durch Zellteilung. Zum anderen können die GUS-positiven Zellen auf einer transienten Expression beruhen. In diesem Fall wird das Gen nicht in das Pflanzengenom eingebaut. Es liegt in dem Zytoplasma oder in dem Zellkern vor und wird nur vorübergehend expremiert. Durch ein in die Kodierungssequenz inseriertes Intron wird die Expression des *GUS*-Gens in Bakterienzellen verhindert und die Aktivität des Enzyms auf transgene Pflanzenzellen beschränkt. Die Vektoren pCambia2305.1 und pCambia1305.1 enthalten die Sequenz für *GUSPlus*, ein synthetisches *GusA*-Gen, welches auf einer Sequenz aus *Staphylococcus sp.* basiert. Der GUSPlus-Nachweis ist zehnmal sensitiver als der von GUS (Broothaerts et al. 2005). Außerdem ermöglicht GUSPlus durch den Zusatz von X-Gluc in das Medium eine Vitalfärbung des zu untersuchenden Pflanzenmaterials.

1.2 Pflanzenmaterial

Das bei den Versuchen verwendete Pflanzenmaterial stammte aus verschiedenen *in vitro* Kulturen von *Malus x domestica* Borkh.. Die Etablierung der *in vitro* Kultur *Malus x domestica* Borkh. ‘Procats 28’ (ab hier ‘**Procats**’ genannt) erfolgte am 23.04.2008. Die *in vitro* Kultur von *Malus x domestica* Borkh. ‘A 14-190-93’ (ab hier ‘**A 14**’ genannt) wurde am 04.07.2007 etabliert. Die Etablierung der *in vitro* Kultur *Malus x domestica* Borkh. ‘Jonagold’ (ab hier ‘**Jonagold**’ genannt) erfolgte am 08.12.1999. Die Kultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 22°C und täglich 16 h Licht mit einer Lichtintensität von 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Als Positivkontrolle für den GUS-Test (siehe 1.6) dienten Sämlinge von *A. thaliana* des Ökotyps Col-2. Es wurde die transgene Linie Cs8046 (Sundaresan et al. 1995) verwendet. Diese besitzt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin und enthält das *GUS*-Gen.

1.3 Ploidiegradanalysen

Bei der Apfelselektion ‘Procats’ und der Sorte ‘Jonagold’ wurden mittels eines Durchflußzytometers (Flowcytometer) Ploidiegradanalysen durchgeführt. Die Vorbereitungen und die Ploidiegradanalyse wurden nach dem Protokoll des Präparations-Kit für Zellkernextraktion „*Cv Stain UV precise P*“ der Firma Partec durchgeführt:

- ca. 0,5 cm² Pflanzengewebe mit 600 µl Extraktionspuffer in eine Petrischale geben und mittels einer Rasierklinge zerkleinern
- 1-5 Min das Gemisch inkubieren
- Gemisch über Einwegfilter (50 oder 70 µm Maschenweite) geben, in dem Eluat befinden sich die Zellkerne
- 1,6 ml DAPI-Färbelösung auf das Eluat geben (zur Anfärbung der Zellkerne) und vortexen
- 1 Min bei 4°C inkubieren
- erneut vortexen und Messung beginnen

Das Prinzip eines Durchflußzytometers beruht auf der Messung von Emissionen optischer Signale von Zellen. Diese Signale erhält man, wenn der Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) an die DNA der Zelle bindet. Da DAPI unter UV-Anregung fluoresziert, können die Zellkerne anhand ihrer Helligkeit bezüglich ihres DNA-Gehaltes ausgewertet und ihr Chromosomensatz bestimmt werden. Die Anregungswellenlängen sollten unter $\lambda = 420$ und die Emissionswellenlängen zwischen $\lambda = 435$ und $\lambda = 500$ liegen.

1.4 Nährmedien

1.4.1 Pflanzennährmedien

1.4.1.1 Erhaltungsmedien

Die Erhaltungsmedien der Apfel *in vitro* Kulturen ‘A 14’, ‘Procats’ und ‘Jonagold’ beinhalteten das standardisierte Nährmedium MS (Murashige & Skoog 1962) inklusive der Vitamine nach Nitsch und Nitsch (1969). Als Kohlenstoffquelle diente Sorbit. Gluconsäure wirkte einer Vitrifizierung der Pflanzen entgegen. Zusätzlich wurden für das Pflanzenwachstum die Hormone Benzyl-Adenin-Aminopurin (BA) und Indol-3-Buttersäure

(IBA) beigegeben. Die Medien wurden im Rhythmus von 6 Wochen erneuert. Dabei wurde zwischen den Medien I und II abgewechselt.

Tab. 3: Erhaltungsmedien für die Apfelselektionen ‘A 14’, ‘Procats’ und die Apfelsorte ‘Jonagold’

	Erhaltungsmedium I	Erhaltungsmedium II
MS	4,4 g/l	2,3 g/l
Sorbit	30 g/l	30 g/l
Gluconsäure	1,3 g/l	1,3 g/l
BA	4,4 µM	2,2 µM
IBA	0,5 µM	0,25 µM
Agar	8 g/l	8 g/l
pH	5,6-5,8	5,6-5,8
Autoklavieren: 1,2 bar, 20 Min, 121°C		

1.4.1.2 Regenerationsmedien

Da beim Apfel die Regenerationseigenschaften der einzelnen Genotypen stark variieren (siehe Einleitung, 10. Regeneration beim Apfel), mussten zunächst Regenerationsmedien für die Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’ etabliert werden. Die Angaben für das MS Nährmedium, die Kohlenstoffquelle (Sorbit) und das Festigungsagens (Phytigel), sowie die zu verwendenden Hormone und deren Bandbreite wurden Bulley und James (2004) entnommen.

Tab. 4: Getestete Hormonkonzentrationen für die Regenerationsmedien der Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’, nach Bulley und James (2004). Die Konzentration von NAA wurde zwischen 0,5 und 5,4 µM festgelegt. BA wurde zwischen 0 und 22,2 µM variiert und TDZ zwischen 0 und 10 µM. Die einzelnen Hormone und deren Konzentration wurden miteinander kombiniert.

HORMONE	A	B	C	D
NAA	/	0,5 µM	2,5 µM	5,4 µM
BA	0 µM	7 µM	14 µM	22,2 µM
TDZ	0 µM	3 µM	6 µM	10 µM

Durch Kombination der Hormone NAA, BA und TDZ entstanden 45 potentielle Regenerationsmedien (siehe Tab. 5).

Tab. 5: 45 Regenerationsmedien für die Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’

MEDIEN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
NAA	B	C	D	B	C	D	B	C	D	B	B	B	B	B	B
BA	B	B	B	C	C	C	D	D	D	B	B	C	C	D	D
TDZ	B	B	B	C	C	C	D	D	D	C	D	B	D	B	C
MEDIEN	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
NAA	C	C	C	C	C	C	D	D	D	D	D	D	B	B	B
BA	B	B	D	D	C	C	D	D	C	C	B	B	B	C	D
TDZ	D	C	B	C	B	D	B	C	B	D	C	D	/	/	/
MEDIEN	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
NAA	C	C	C	D	D	D	B	B	B	C	C	C	D	D	D
BA	B	C	D	B	C	D	/	/	/	/	/	/	/	/	/
TDZ	/	/	/	/	/	/	B	C	D	B	C	D	B	C	D

Von den *in vitro* Kulturen der Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’ wurden Blätter in drei Segmente geschnitten und mit der adaxialen Seite auf das Medium gelegt. Anschließend erfolgte eine Kultivierung im Dunkeln bei 22°C und 25°C. Bildeten sich Sprosse (nach ca. 4-6 Wochen), wurden diese auf den Medien bei einer Photoperiode von 16 h Licht (Lichtintensität von 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kultiviert. Für die Transformationsversuche wurden folgende Medien ausgewählt, auf denen die Organogenese bei 25°C induziert wurde:

Tab. 6: Etablierte Regenerationsmedien für die Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’. Die Regeneration erfolgte bei 25°C.

	‘A 14’ (NR. 1)	‘Procats’ (NR. 36)
MS	4,4 g/l	4,4 g/l
Sorbit	30 g/l	30 g/l
Phytigel	3 g/l	3 g/l
NAA	0,5 μM	5,4 μM
BA	7 μM	22,2 μM
pH	5,6	5,6
Autoklavieren: 1,2 bar, 20 Min, 121°C		
TDZ (sterilfiltriert)	3 μM	/

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf einem Magnetrührer auf 55-60°C abgekühlt. Danach wurde sterilfiltriertes TDZ hinzugegeben und das Medium unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen ausgegossen.

Die Rezeptur für das Regenerationsmedium der Apfelsorte ‘Jonagold’ wurde Viss et al. (2003) entnommen. Die Regeneration erfolgte bei 25°C.

Tab. 7: Regenerationsmedium für die Apfelsorte ‘Jonagold’

	‘Jonagold’
MS	4,33 g/l
Sorbit	40 g/l
Gelrite	2,5 g/l
NAA	2,7 µM
BA	13,3 µM
pH	5,6
Autoklavieren: 1,2 bar, 20 Min, 121°C	
Zeatin (sterilfiltriert)	9,1 µM

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf einem Magnetrührer auf 55-60°C abgekühlt. Danach wurde sterilfiltriertes Zeatin hinzugegeben und das Medium unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen ausgegossen.

1.4.1.3 Selektionsmedien

Das Selektionsmedium besteht aus den Komponenten des Regenerationsmediums und wird zusätzlich mit Antibiotika versetzt. Bei einer Agrobakterien-vermittelten Transformation können auch nach dem Waschschrift (siehe 1.7 E)) die Bakterien am Explantat haften. Um das Wachstum dieser verbliebenen Agrobakterien zu hemmen, wurde das Antibiotikum Cefotaxim dem Medium hinzugegeben. Dieses wirkt sowohl gegen gram-positive, als auch gegen gram-negative Bakterien und zeichnet sich durch eine gute Pflanzenverträglichkeit aus. Das eigentliche Selektionsantibiotikum wird je nach verwendetem Vektor hinzugegeben (siehe 1.1.2). Ein Selektionsagens verhindert, dass nicht-transgene Zellen überleben. Dadurch wird beispielsweise die Regeneration von Sprossen gehemmt, die nicht transgen sind (sogenannte „Escapes“). Die Toleranzschwelle gegenüber einem Selektionsantibiotikum hängt stark vom

Genotyp ab. Als ideal gilt eine Konzentration bei der keine negativen Effekte auf die transgenen Zellen zu erwarten sind, nicht-transgene Zellen aber absterben. Die einzelnen Konzentrationen mussten für die Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’ zunächst etabliert werden. Den Regenerationsmedien von ‘A 14’ und ‘Procats’ (siehe Tab. 6) wurden Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben, siehe Tabelle 8. Die Zugabe von Hygromycin oder Kanamycin erfolgte zusätzlich zu Cefotaxim. Die Blattexplantate wurden auf dem Medium zunächst bei 25°C im Dunkeln kultiviert und dann bei einer Photoperiode von 16 h Licht (Lichtintensität von 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Anschließend wurde die Vitalität der Regenerate beurteilt. Die verwendeten Konzentrationen in späteren Transformationsversuchen sind in Tabelle 8 hervorgehoben. Die Rezeptur für das Selektionsmedium von ‘Jonagold’ wurde Viss et al. (2003) entnommen.

Bei späteren Transformationsversuchen mit ‘Procats’ und ‘Jonagold’ wurde auf ein Selektionsagens im Selektionsmedium verzichtet und lediglich Cefotaxim zur Abtötung der Agrobakterien beigegeben.

Tab. 8: Konzentrationstest der Antibiotika (Cefotaxim, Hygromycin und Kanamycin) für ein Selektionsmedium für die Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’

CEFOTAXIM		HYGROMYCIN	KANAMYCIN
‘Procats’	‘A 14’		
0mg/l	0mg/l	0mg/l	0mg/l
100 mg/l	100 mg/l	5 mg/l	10 mg/l
150 mg/l	150 mg/l	10 mg/l	20 mg/l
200 mg/l	200 mg/l	15 mg/l	25 mg/l
250 mg/l	250 mg/l	20 mg/l	30 mg/l
/	/	25 mg/l	35 mg/l
/	/	30 mg/l	40 mg/l
/	/	35 mg/l	50 mg/l
/	/	40 mg/l	75 mg/l
/	/	45 mg/l	100 mg/l
/	/	50 mg/l	125 mg/l
/	/	/	150 mg/l

Tab. 9: Selektionsmedien für die Apfelselektionen ‘A 14’, ‘Procats’ und die Sorte ‘Jonagold’

	‘A 14’	‘Procats’	‘Jonagold’
MS	4,4 g/l	4,4 g/l	4,33 g/l
Sorbit	30 g/l	30 g/l	40 g/l
Phytigel	3 g/l	3 g/l	2,5 g/l
NAA	0,5 µM	5,4 µM	2,7 µM
BA	7 µM	22,2 µM	13,3 µM
pH	5,6	5,6	5,6
Autoklavieren: 1,2 bar, 20 Min, 121°C			
TDZ (sterilfiltriert)	3 µM	/	/
Zeatin (sterilfiltriert)	/	/	9,1 µM
Cefotaxim (sterilfiltriert)	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
Kanamycin (sterilfiltriert)	25 mg/l	/	/
Hygromycin (sterilfiltriert)	10 mg/l	/	/

Nach dem Autoklavieren wurden die Medien auf einem Magnetrührer auf 55-60°C abgekühlt. Danach wurden die sterilfiltrierten Komponenten dem Medium hinzugegeben. Für die Apfelselektion ‘A 14’ wurden je nach verwendetem Vektorkonstrukt die Selektionsantibiotika hinzugegeben. Anschließend wurde das Medium unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen ausgegossen.

1.4.2 Bakteriennährmedien

Für die Bakterienkultur wurde das „Luria broth“ (LB)-Medium nach Bertani (1951) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein komplexes Nährmedium für Bakterien. Die Flüssigkultur wurde zusätzlich mit MgSO₄ versetzt, um eine Verklumpung der Bakterien zu vermeiden. Den Nährmedien wurden entsprechende Antibiotika beigesetzt, um sicher zu stellen, dass sich ausschließlich die Bakterien vermehren, die den gewünschten Vektor enthalten.

Tab. 10: Flüssige und feste Bakterienmedien

	LBA4404		EHA105	
	Flüssigkultur	Festmedium	Flüssigkultur	Festmedium
LB-Medium	25 g/l	25 g/l	25 g/l	25 g/l
Agar		15 g/l		15 g/l
	pH 7,0	pH 7,5	pH 7,0	pH 7,5
Autoklavieren: 1,2 bar, 20 Min, 121°C				
MgSO₄ (sterilfiltriert)	1 M	/	1 M	/
Rifampicin	/	100 mg/l	/	100 mg/l
Chloramphenicol	50 mg/l	50 mg/l	/	/
Kanamycin (sterilfiltriert)	/	/	25 mg/l	25 mg/l

Festmedium: Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf einem Magnetrührer auf 55-60°C abgekühlt. Anschließend wurden die Antibiotika hinzugegeben. Rifampicin musste nicht sterilfiltriert werden, da es in DMSO gelöst war. Chloramphenicol war in Ethanol gelöst und musste ebenfalls nicht sterilfiltriert werden. Das Medium wurde steril in Plastikpetrischalen ausgegossen.

Flüssigkultur: Nach dem Autoklavieren wurde das LB-Medium bei 4°C aufbewahrt und für die Versuchsansätze frisch mit MgSO₄ und den jeweiligen Antibiotika versetzt.

1.4.2.1 Inokulationsmedium MS20

In Vorbereitung auf die Transformation wurden die Bakterien für 5 h bei 22°C in Dunkelheit in der MS20-Lösung im Schüttler angezogen (siehe 1.7 C)). Anschließend wurden die verwundeten Explantate dem Inokulationsmedium beigegeben.

Tab. 11: MS20-Medium

MS20-MEDIUM	
MS	4,4 g/l
Saccharose	20 g/l
Betainhydrochlorid	1 mM
Acetosyringon	0,1 mM
pH	5,2
sterilfiltrieren	

1.5 Transformation von Agrobakterien

Der *A. tumefaciens* Stamm EHA105 wurde mit dem binären Vektorsystem pCambia2305.1 transformiert:

- Kompetente Bakterien auf Eis auftauen
- Zugabe von 1 µg Vektor zu den Bakterien und vorsichtiges Mischen
- 5 Min in flüssigen Stickstoff schockgefrieren
- 5-10 Min auftauen bei RT
- 1 ml LB-Medium plus MgSO₄ hinzugeben
- 2 bis 4 h inkubieren, bei 28°C in Dunkelheit schütteln
- 200 µl auf LB-Platten ausplattieren
- 24 bis 48 h bei 28°C in Dunkelheit inkubieren
- Keto-Laktose Test:

Dieser Test dient dazu sicherzustellen, dass keine Kontamination mit anderen Bakterien (beispielsweise mit *E. coli*) stattgefunden hat. *A. tumefaciens* wandelt unter aeroben Bedingungen Laktose in 3-Ketolaktose um. Mittels des Benedict's Reagenz (siehe Tab. 13) können Agrobakterienstämme nachgewiesen werden, indem die Bakterienkolonien eine gelbe Färbung aufweisen (Bernaerts & De Ley 1967). 20 Kolonien der ÜK wurden auf eine Kontrollplatte (LB-Platte) überführt. Als Positivkontrolle diente der *A. tumefaciens* Stamm EHA105 mit dem Vektor pCambia1305.1. Die Kontrollplatte wurde bei 4°C inkubiert. 20 Kolonien der ÜK wurden auf eine Laktose-Platte (siehe Tab. 12) überführt und mit dem Benedict's Reagenz übergossen. Als Negativkontrolle diente der *E. coli* Stamm XL1 mit dem Vektor pBIG-Kan. Die Platte wurde in Dunkelheit für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien ausgewählt, die eine gelbe Farbe aufwiesen. Mit diesen Klonen wurde eine Kolonie-PCR (siehe 2.10.2.5) vollzogen und auf die Amplifikation *GUSPlus* und *Kan* spezifischer Banden überprüft.

- ÜK in 5 ml flüssigem LB-Medium bei 28°C, mit den Kolonien die positiv auf *GUSPlus* und *Kan* getestet wurden
- 1 ml der ÜK in 500 µl Glycerol überführen
- Aufbewahrung bei -70°C

Tab. 12: Laktose Platten

LAKTOSE PLATTEN	
Laktose	10 g/l
Hefeextrakt	1 g/l
Agar	20 g/l
Autoklavieren: 1,2 bar, 20 Min, 121°C	

Tab. 13: Benedict's Reagenz

BENEDICT'S REAGENZ	
Na ₂ CO ₃ ·10H ₂ O	256 g/l
Na ₃ Citrat	132 g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	13,2 g/l

1.6 GUS-Färbelösung

Die Regenerate wurden histochemisch mittels GUS-Tests auf Transformationsereignisse untersucht. Es wurden zwei verschiedene Puffersysteme verwendet, der Y-Puffer nach Jefferson (1987) und ein Puffer nach Sessions et al. (1999).

Tab. 14: Puffersysteme für den GUS-Test, nach Sessions et al. (1999) und Jefferson (1987)

	SESSIONS ET AL. (1999)	JEFFERSON (1987)
Na ₂ HPO ₄ (0,1 M)	57,7 ml	57,7 ml
NaH ₂ PO ₄ (0,1 M)	42,3 ml	42,3 ml
Kaliumhexacyanoferrat II Trihydrat (0,01 M)	0,845 g	/
Kaliumhexacyanoferrat III (0,01 M)	0,659 g	/
Triton X-100	400 µl	/
Add. 200 ml dH ₂ O, pH 7,0		
X-Gluc (0,1 M)	2 ml	2 ml

Das X-Gluc (in DMSO gelöst) wurde dem Puffer unmittelbar vor Gebrauch hinzu gegeben. In die dadurch entstandene Färbelösung wurden die zu untersuchenden Objekte gegeben und vakuumfiltriert. Danach erfolgte eine Kultivierung über Nacht bei 37°C. Am nächsten Morgen wurde die Färbelösung abgegossen. Anschließend wurde das Chlorophyll der zu untersuchenden Objekte mit einem Gemisch aus Ethanol und Essigsäure (3:1) entfernt. Dazu wurden die Objekte für jeweils eine Stunde in der Lösung inkubiert. Die Flüssigkeit wurde insgesamt drei Mal gewechselt. Am Schluss wurden die entfärbten Objekte mit dH₂O gespült und in 70% Ethanol gelagert. Die Regenerate, bzw. Explantate der Versuche T28-T79 (außer T75) wurden mit dem Puffer nach Sessions et al. (1999) untersucht. Die zu untersuchenden

Objekte aus den Versuchen T87 und T102 ('A 14', fragmentierte Sprossspitzen) und T99/101, T103 ('A 14') und T91/104, T98 ('Jonagold') wurden ebenfalls nach Sessions et al. (1999) gefärbt, jedoch wurde der Blutlaugensalzanteil auf 1 mM reduziert und die Inkubation bei 55°C vollzogen, um eine endogene Glucuronidase-Aktivität auszuschließen. Die Regenerate, bzw. Explantate aus den Versuchen T75 ('A 14', fragmentierte Sprossspitzen) und T80-T97 und T100 wurden mit dem Y-Puffer durchgeführt.

1.7 Ablauf der Transformation

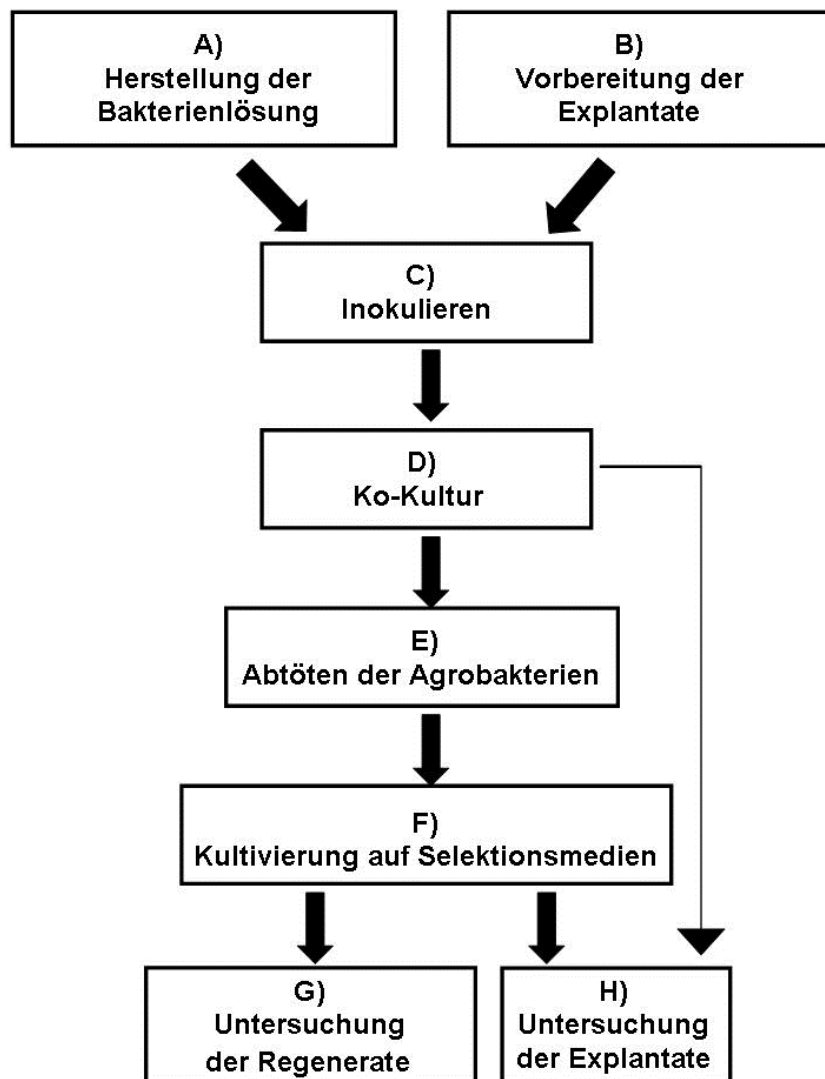


Abb. 8: Schematische Darstellung des Ablaufes einer Transformation. Zunächst wird eine Bakterienlösung hergestellt (A) in der die verwundeten Explantate (B) inokulieren (C). Anschließend erfolgt eine Ko-Kultivierung der Explantate und Bakterien auf Regenerationsmedien (D). Danach werden die Agrobakterien, die am Explantat verblieben sind, durch einen Waschschritt mit Cefotaxim abgetötet (E). Anschließend erfolgt eine Kultivierung der Explantate auf Selektionsmedien. Erfolgt eine Regeneration, werden die Regenerate bezüglich ihrer Transgenität untersucht (G). Die Explantate können entweder direkt im Anschluss an die Ko-Kultur auf transgene Stellen untersucht werden, oder im Laufe der Kultivierung auf Selektionsmedien (H).

A) Herstellung der Bakterienlösung: In Vorbereitung einer Agrobakterien-vermittelten Transformation muss eine Bakterienlösung hergestellt werden, in der die Explantate inokuliert werden können (MS20-Medium, siehe Tab. 11). Dabei wurde entweder auf eine Bakterienkultur im Flüssigmedium (flüssige Bakterienkultur) zurückgegriffen, oder die Bakterien auf Agarplatten kultiviert (feste Bakterienkultur). Letztere Kultur hat den Vorteil, dass die Bakterien über das Wochenende wachsen können und eine Transformation gleich montags stattfinden kann. Der Ablauf ist in Tabelle 15 ersichtlich:

Tab. 15: Ablauf der Transformation. A) Herstellung der Bakterienlösung

Tage vor der Transformation	Flüssige Bakterienkultur	Feste Bakterienkultur
4	/	Vormittags: 5 ml flüssiges LB-Medium mit Bakterien-Glycerindauerkultur animpfen ÜK: in Dunkelheit bei 28°C schütteln
3	/	Morgens: Lagerung der ÜK bei 4°C Nachmittags: 100 µl Übernachtskultur auf LB-Platten ausplattiert Inkubation: 66 h in Dunkelheit bei 28°C
2	Vormittags: 5 ml flüssiges LB-Medium mit Bakterien-Glycerindauerkultur animpfen ÜK: in Dunkelheit bei 28°C schütteln	Inkubation
1	Morgens: Lagerung der ÜK bei 4°C Nachmittags: 100 µl LB-Medium mit 500 µl Übernachtskultur animpfen ÜK: in Dunkelheit bei 28°C schütteln	Inkubation
Transformationstag	Abzentrifugation der Bakterien: 10 Min x 5000 rpm	Abernten des Bakterienrasens mittels Trigalski-Spatel
	Resuspendierung der Bakterien in MS20-Medium Einstellung der optischen Dichte 5 h bei 22°C schütteln	

B) Vorbereitung der Explantate: Die Vorbereitung der Explantate erfolgte durch verschiedene Verwundungstechniken. Durch Erzeugung einer Verwundung sollte es den Bakterien ermöglicht werden, in das Pflanzengewebe einzudringen. Die verwundeten Pflanzenzellen sondern zusätzlich eine phenolische Substanz ab, durch die die Bakterien angelockt werden (siehe Einleitung, 8. *Agrobacterium tumefaciens*). Außerdem eignen sich die Schnittflächen als Areale, an denen die spätere Regeneration stattfinden kann (siehe Einleitung, 10. Regeneration beim Apfel).

Für die Verwundung der **Blattexplantate** wurden verschiedene Techniken angewandt:

Dritteln: Eine Methode Verwundungen zu erzeugen, ist es das Blatt zu dritteln (Bulley & James 2004). Dabei wird das Blatt mit der Oberseite nach unten auf ein Filterpapier gelegt. Mit einem Skalpell wird das Blatt zweimal quer geschnitten, wodurch drei annähernd gleichgroße Segmente entstehen (siehe Abb. 9 a)). Vor dem Dritteln können die Blätter zusätzlich durch Zerkratzen mit einem Skalpell, oder durch Zerstechen mit einer spitzen Pipettenspitze verwundet werden (siehe auch 1.8). Beim **Vierteln** werden durch einen Schnitt entlang der Mittelrippe und einen Schnitt quer zur Blattader vier fast gleich große Segmente erzielt. Beim **Sechsteln** werden die Blätter zusätzlich zu dem Dritteln durch einen Schnitt entlang der Mittelrippe in sechs Segmente geteilt. Eine Alternative stellt dar, mit einem Skalpell ein gleichseitiges Dreieck aus dem Blatt heraus zu schneiden (siehe auch 1.8).

„Crushen“: Eine weitere Verwundungsmethode beruht auf Norelli et al. (1996). Mittels einer nicht-traumatischen Pinzette (siehe Abb. 9 d)), wurde das Blatt mit der Pinzettenspitze „gecrusht“ (gequetscht) (siehe Abb. 9 c)). Dabei war es entscheidend, auf das richtige Druckverhältnis zu achten. Es sollten über die Blattoberfläche verteilt zahlreiche kleine Verletzungen entstehen, jedoch das Gewebe nicht irreversibel geschädigt werden.

Nadeln: Eine Alternative zu dem „Crushen“ stellte das Nadeln dar. Mittels eines Nadelstempels aus der Humanmedizin (siehe Abb. 9 b)) sollten über die Blattoberfläche verteilt zahlreiche Einstichlöcher entstehen. Idealerweise, ohne das um die Einstichstellen liegende Blattgewebe zu verletzen.

Wu et al. (2011) verwendeten zur Transformation **fragmentierte Sprossspitzen** als **Explantate**. Sie erreichten damit, neben einer hohen Kallus- und Sprossregeneration, eine Transformationseffizienz von 5,8%. Darauf basierend wurden fragmentierte Sprossspitzen von der Apfelselektion ‘A 14’ als Explantat verwendet. Hierfür wurden zunächst 1 cm große Sprossspitzen auf einem Erhaltungsmedium für 2 Wochen im Dunklen kultiviert. Dadurch trat eine Etiolierung der Sprosse ein. Von diesen Sprossen wurden die obersten 1-3 mm (das

Meristem und wenige Blattprimordien) entfernt. Diese Stücke wurden je nach Durchmesser ein- bis zweimal mit einem Skalpell vertikal durchgeschnitten.

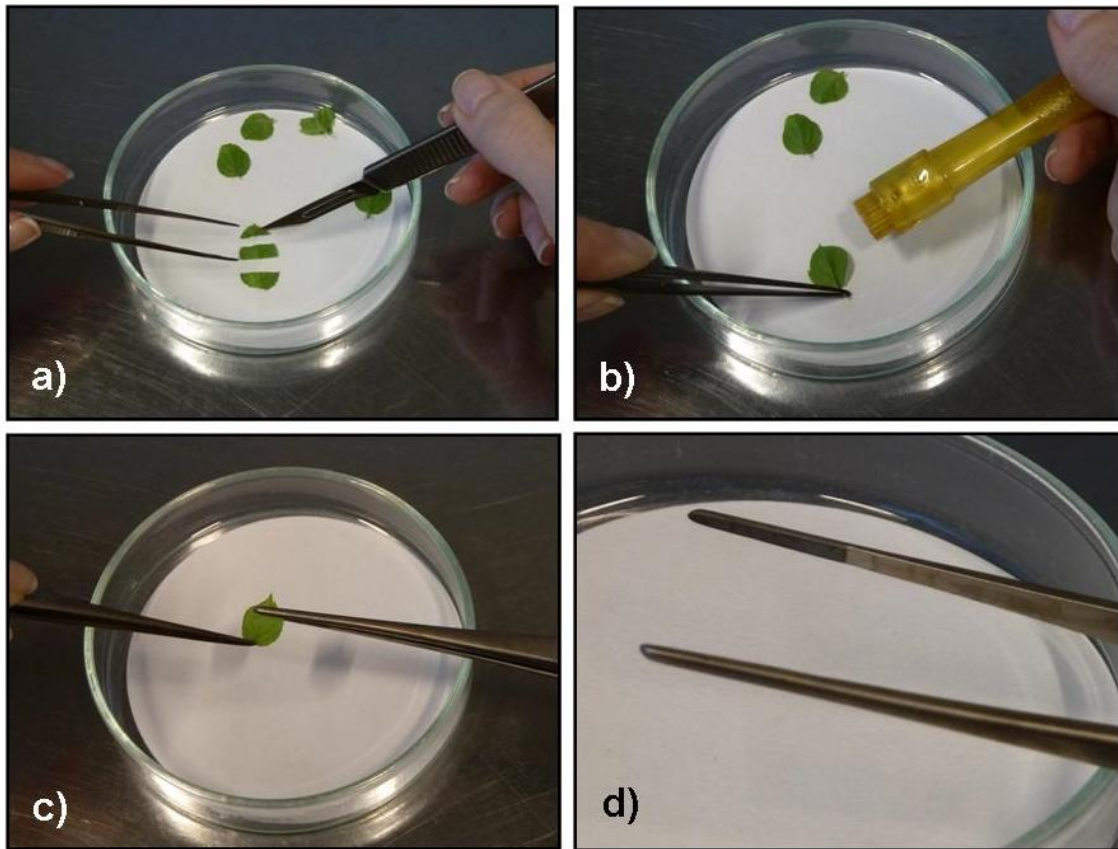


Abb. 9: Verschiedene Verwundungsmethoden für Blattexplantate. Die Blätter wurden nach Bulley und James (2004) gedrittelt (a). Alternativ wurden sie mit einem Nadelstempel aus der Humanmedizin verwundet (b). Eine weitere Methode stellt das „Crushen“ der Blätter nach Norelli et al. (1996) (c) mit einer nicht-traumatischen Pinzette dar (d).

C) Inokulation: Die verletzen Explantate wurden in das mit Bakterien versehene MS20-Medium (siehe Tab. 11) gegeben. Anschließend wurde das Inokulat für 20 Minuten in Dunkelheit bei 22°C sanft geschüttelt. Danach wurde die Flüssigkeit über einen Filtertrichter abgossen und die Blätter in einer Petrischale gesammelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Flüssigkeit mehr an den Explantaten anhaftete, diese aber auch nicht austrocknen.

D) Ko-Kultur: Die Blattexplantate wurden mit der Blattoberseite auf das Ko-Kulturmedium gelegt. Die Sprossspitzen wurden mit der basalen Seite in das Medium gesteckt. Die Ko-Kultur erfolgte bei 25°C in Dunkelheit zwischen 2 und 20 Tagen (siehe Ergebnisse, 1.3). In dieser Zeit fand der von den Agrobakterien veranlasste Gentransfer statt. Dabei war es entscheidend, den Zeitraum einerseits entsprechend lange zu wählen, so dass der Gentransfer stattfinden

kann. Andererseits musste die Ko-Kulturdauer so kurz wie möglich gehalten werden, um eine mögliche Überwucherung der Agrobakterien über das Pflanzengewebe zu verhindern.

E) Abtötung der Agrobakterien: Um die am Explantat verbliebenen Agrobakterien abzutöten, wurden die Explantate einem Waschschrift unterzogen. Sie wurden für 5 h bei 22°C in Dunkelheit in 1 g/l Cefotaxim-haltiger Waschlösung geschüttelt und diese anschließend über einen Filtertrichter abgossen. Dabei war es wichtig, die Explantate vor Austrocknung zu schützen. Die Blätter, die als Vorbereitung „gecrusht“ oder genadelt wurden, wurden an dieser Stelle gedrittelt, um eine spätere Regeneration an den Schnittflächen zu ermöglichen.

F) Kultivierung auf Selektionsmedien: Nach dem Waschschrift wurden die Explantate auf das Selektionsmedium überführt. Die Blätter mit der Blattoberseite nach unten, die fragmentierten Sprossspitzen mit der basalen Seite ins Medium gesteckt. Anschließend erfolgte eine Kultur bei 25°C in Dunkelheit, bis Sprossansatzpunkte zu sehen waren (ca. 4-6 Wochen). Danach wurden die Platten im Licht kultiviert (16 h Licht mit einer Lichtintensität von 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

G) Untersuchung der Regenerate:

Mikroskopie: Enthielten die verwendeten Vektoren *eGFP* als Reportergen (siehe 1.1.2), war es möglich, Blattquerschnitte von Regeneraten durch eine GFP-Fluoreszenz auf transgene Zellen zu überprüfen. Dafür wurden die Blätter in einen Trockensteckschaum eingeklemmt und mit einer Rasierklinge ein möglichst dünnes Präparat angefertigt. Bei einer erfolgreichen Transformation, sollte der Einbau des *eGFPs*-Gens unter Blaulichtanregung eine grüne Fluoreszenz veranlassen.

GUS-Test: Bei einer Transformation mit Vektoren, die ein *GUS*-Intron enthielten, wurden die zu untersuchenden Regenerate einem GUS-Test unterzogen (siehe 1.6). Am darauf folgenden Tag wurden sie auf GUS-positive Signale untersucht.

DNA-Extraktion: Aus den zu untersuchenden Regeneraten wurde DNA isoliert (siehe 2.3) und diese mittels PCR auf Insertion der Reportergene (*eGFP*, *GUS*, *GUSPlus*), sowie des Selektionsgens (*Hyg*) oder auf Gene verbleibender Bakterien (*virG*, *virD*) untersucht.

H) Untersuchung der Explantate: Neben den Regeneraten wurden auch Explantate auf GUS-positive Zellen hin untersucht. Dies sollte zum einen Aufschluss über die transformierten Bereiche am Explantat geben und zum anderen den zeitlichen Verlauf von

Transformationsereignissen dokumentieren. Dafür wurden die Explantate direkt im Anschluss an die Ko-Kultur einem GUS-Test unterzogen. Ebenso wurden Explantate im Laufe der Kultivierung auf GUS-positive Zellen hin untersucht.

1.8 Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘A 14’

Da eine Transformation aus vielen variablen Parametern besteht, wurde der Einfluss einzelner Parameter auf die Anzahl GUS-positiver Blattexplantate untersucht. Je höher die Anzahl GUS-positiver Blattexplantate ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass transgene Adventivsprosse regenerieren. Die untersuchten Parameter sind in Tabelle 16 ersichtlich:

Tab. 16: Übersicht der untersuchten Parameter für eine Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘A 14’

	PARAMETER	VARIANTEN
a)	Vektorkonstrukt	pCambia2305.1/pCambia1305.1
b)	Verwundungsmethode der Blattexplantate	Dritteln/Crushen/Nadeln/Sechsteln/Vierteln/ Dreieck/Zerstechen/Zerkratzen
c)	Ko-Kulturdauer	2-11 Tage
d)	Optische Dichte	OD 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9
e)	Inokulationsdauer	10/20/40 Minuten
f)	200 µM Acetosyringon im Ko-Kulturmedium	ja/nein
g)	Blattalter	4 Wochen/6 Wochen

Jede Parametermodifikation wurde separat innerhalb einer Transformation der Apfelselektion ‘A 14’ untersucht. Dazu wurden die Blattexplantate in Segmente gedrittelt und mit dem Bakterienstamm EHA105 transformiert. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Ko-Kulturdauer 5 Tage, die optische Dichte 0,5 und das Blattalter 6 Wochen. Die transformierten Blattexplantate wurden direkt nach der Ko-Kultur einem GUS-Test unterzogen und die Effizienz, also das Verhältnis GUS-positiver Blattsegmente zu der Gesamtanzahl transformierter Blattsegmente bestimmt:

$$\frac{\text{GUS-positive Segmente}}{\text{Gesamtanzahl aller transformierten Segmente}} = \text{Effizienz in \%}$$

2. Markeranalysen

2.1 Nachkommenschaften

Die in Geisenheim etablierten Nachkommenschaften der Kreuzungen ‘A 14’ (nicht-kolumnar) x ‘Procats’ (kolumnar), ‘Pomfital’ (kolumnar) x ‘Wellant’ (nicht-kolumnar) und ‘A10-20’ (kolumnar) x ‘Pinova’ (nicht-kolumnar) wurden phänotypisch entsprechend ihrer Wuchsform bonitiert. Es wurden zur Markeranalyse nur diejenigen Individuen verwendet, bei denen die phänotypische Einordnung eindeutig war.

Tab. 17: Untersuchte Nachkommenschaften. Anzahl der Individuen der jeweiligen Nachkommenschaften, welche zur Markeranalyse zur Verfügung standen.

KREUZUNGSELTERN	STANDORT	UNTERSUCHTE INDIVIDUEN
‘A 14’ (nicht-kolumnar) x ‘Procats’ (kolumnar)	FA Geisenheim	144
‘Pomfital’ (kolumnar) x ‘Wellant’ (nicht-kolumnar)	FA Geisenheim	521
‘A10-20’ (kolumnar) x ‘Pinova’ (nicht-kolumnar)	FA Geisenheim	416

2.2 BSA (Bulked Segregant Analysis)

Für eine BSA (Bulked Segregant Analysis) wird die DNA von Individuen mit derselben Eigenschaft zu Pools zusammengefasst. Dadurch können Populationen mit Hilfe von Markern bezüglich gewünschter Eigenschaften untersucht werden. Ein Bandenpolymorphismus zwischen den DNA-Pools weist auf eine Kopplung des Markers mit der zu untersuchenden Eigenschaft hin.

Aus der Nachkommenschaft der Kreuzung ‘A 14’ (nicht-kolumnar, N) x ‘Procats’ (kolumnar, C) wurden für jede Wuchseigenschaft drei Pools erstellt, welche bis zu 20 Individuen enthielten. Die Zusammensetzung der Pools ist in Tabelle 18 ersichtlich. Anhand dieser Pools wurden neu entwickelte SSR Marker, sowie Marker von Bai et al. (2012) auf Bandenpolymorphismen zwischen kolumnaren und nicht-kolumnaren Bäumen untersucht.

Tab. 18: BSA. Für die BSA wurden DNA-Pools mit den Individuen aus der Nachkommenschaft 'A 14' x 'Procats' erstellt.

DNA-POOL	INDIVIDUEN
N1 nicht-kolumnar 20 Individuen	6.7; 6.18; 6.20; 6.23; 6.25; 6.29; 6.31; 6.34; 6.37; 6.39; 6.40; 6.44; 6.52; 6.54; 6.60; 6.62; 8.4; 8.9; 8.14; 8.15
N2 nicht-kolumnar 20 Individuen	6.73; 6.74; 6.88; 6.90; 6.91; 6.95; 6.98; 6.101; 6.102; 6.103; 6.105; 6.106; 7.2; 7.3; 7.6; 8.8; 8.18; 8.19; 8.20; 8.21
N3 nicht-kolumnar 20 Individuen	7.13; 7.14; 7.15; 7.16; 7.17; 7.19; 7.23; 7.27; 7.31; 7.36; 7.37; 7.87; 7.88; 7.92; 7.93; 7.94; 7.97; 7.98; 7.105; 7.109
C1 kolumnar 18 Individuen	6.5; 6.8; 6.10; 6.14; 6.19; 6.24; 6.32; 6.41; 6.43; 6.72; 6.76; 7.1; 7.10; 7.18; 8.59; 8.63; 8.68; 8.74
C2 kolumnar 17 Individuen	7.21; 7.25; 7.26; 7.28; 7.42; 7.43; 7.50; 7.60; 7.71; 7.77; 7.85; 7.89; 7.91; 7.95; 7.99; 7.102; 8.76
C3 kolumnar 20 Individuen	6.9; 6.11; 7.104; 8.1; 8.2; 8.3; 8.5; 8.6; 8.7; 8.11; 8.16; 8.17; 8.31; 8.36 8.39, 8.44, 8.45, 8.46, 8.55, 8.58

2.3 DNA-Isolation

Für die Isolierung der DNA wurde den Individuen der Nachkommenschaften Blattmaterial entnommen. Für die DNA-Extraktion aus einzelnen Individuen wurde das Protokoll nach Eimert et al. (2003) verwendet. Für die Isolierung von DNA im 96er Format wurde das „*DNeasy 96 Plant Kit*“ der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Es wurde nach Herstellerempfehlung gearbeitet. Dazu wurden 50 mg gefrorenes Blattmaterial lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlage P10). Alternativ wurde das gefrorene Blattmaterial ohne vorhergehende Lyophilisierung mittels Stickstoff schockgefroren. Für den Gewebeaufschluss wurden Kugeln (Beads) der Firma Qiagen (Hilden) verwendet, welche unter Verwendung eines Tissue Lysers II (Qiagen, Hilden) das Gewebe mechanisch homogenisieren. Einen Unterschied in der DNA-Ausbeute konnte weder nach der Isolierung mit vorhergehender

Lyophilisierung, noch nach der Isolierung mit Schockgefrierung festgestellt werden. Die Lyophilisierung des Gewebes erwies sich als einfacher in der Handhabung. Sowohl nach dem Protokoll von Eimert et al. (2003), als auch nach der Isolierung mit dem DNeasy 96 Plant Kit wurde die DNA anschließend auf 5 ng/ μ l verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

2.4 Entwicklung neuer SSR Marker

Anhand der Sequenzdaten des veröffentlichten ‘Golden Delicious’ Genoms (Velasco et al. 2010) wurden neue SSR Marker entwickelt, die mit dem Kolumnarwuchs koppeln. Für die Etablierung dieser Marker wurden die Sequenzdaten des Chromosoms 10 zwischen 18,6 Mbp und 19,0 Mbp nach Mikrosatelliten ausgewertet. Dies erfolgte mit dem Programm „MSATCOMMANDER“ (Faircloth 2008, Rozen & Skaletsky 1999). Anschließend wurden geeignete Primer designt, die diese Bereiche überspannen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Bindung der Primer spezifisch ist. Durch „blasten“ der Primersequenzen gegen das ‘Golden Delicious’ Genom wurde sicher gestellt, dass diese auf Chromosom 10 binden. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH bezogen. Die neuen SSR Marker wurden zunächst mittels BSA anhand der Nachkommenschaft ‘A14’ x ‘Procats’ auf Bandenpolymorphismen untersucht (siehe 2.2). Wurde ein solcher gefunden, wurde der Marker anhand der Einzelindividuen der Nachkommenschaften bezüglich seiner Kopplung mit dem Kolumnarwuchs untersucht (siehe 2.1).

2.5 Untersuchung der Marker von Bai et al. (2012)

Die von Bai et al. (2012) veröffentlichten SSR Marker C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519 wurden zunächst an den DNA-Pools C1 und C2 (siehe 2.2) untersucht. Es sollte zunächst überprüft werden, ob die von Bai et al. (2012) beschriebene kolumnare Bande, also die Bande die für den kolumnaren Phänotyp spezifisch ist, des jeweiligen Markers bei der Nachkommenschaft (‘A14’ x ‘Procats’) amplifiziert wird. Anschließend wurden anhand der Einzelindividuen der Nachkommenschaften die Marker auf Rekombinationsereignisse hin untersucht (siehe 2.1). Durch die Auswertung sollten Rückschlüsse bezüglich der von Bai et al.

(2012) gefundenen Grenzen des *co*-Lokus auf Chromosom 10 gezogen werden (siehe Einleitung, 7. Das Kolumnargen (*co*-Gen)).

Tab. 19: Untersuchte SSR Marker von Bai et al. (2012)

MARKER	TYP	SEQUENZ	LAGE AUF CHR 10	KOLUMNARE BANDE
C1753 -3520	SSR	For TCCCTCTCTTCTGTTGCAATTT RevGGCTTAAAAGGGTTGAAGTTCTC	18,905 Mbp	176 bp
C7629 -22009	SSR	For GGGCTAGCTGGCTAGGTGTA Rev ACAACACACCCAGCCCTAAT	19,096 Mbp	184 bp
C6536- 31519	SSR	For TGGATGGTGGGATTCTTGT Rev AAGGAAACCACATTGCCAAA	19,656 Mbp	196 bp

2.6 Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Für die BSA und die Einzeltestung der Individuen wurden PCRs mit den zu untersuchenden Markern vollzogen. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Polymerase Ketten Reaktion ist in Tabelle 20 ersichtlich. Es wurde die „*Taq DNA Polymerase*“ von Fermentas (St- Leon-Rot) verwendet.

Tab. 20: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Polymerase Ketten Reaktion

Komponenten	µl
MgCl₂ (25 mM)	1,2
10x Puffer (750 mM)	2,0
dNTP (10 mM/each)	0,4
<i>Taq</i>-Polymerase (5 u/µl)	0,3
BSA (20 mg/ml)	0,1
dH₂O	6,6
Primer for (1 µM)	2,7
Primer rev (1 µM)	2,7
DNA (5 ng/µl)	4
Σ	20

Die PCR- und Cycler-Bedingungen für die SSR Marker von Bai et al. (2012) wurden aus der Literatur entnommen.

Tab. 21: Cycler-Bedingungen für die Polymerase Ketten Reaktion

		NEU ENTWICKELTE MARKER	MARKER BAI ET AL. (2012)
1.	Deckeltemperatur	110°C	110°C
2.	Initiale Denaturierung der DNA	95°C, 3 Min	95°C, 5 Min
3.	Denaturierung der DNA	94°C, 30 Sec	94°C, 30 Sec
4.	Annealing	55°C, 30 Sec	55°C, 30 Sec
5.	Elongation	72°C, 30 Sec	72°C, 90 Sec
6.	Finale Inkubation	72°C, 5 Min	72°C, 5 Min
Schritt 2.-5.	Zyklen	34	35

2.7 Enzymatische S1-Nuklease Verdauung

Eine Behandlung von PCR-Produkten mit der S1-Nuklease von Fermentas (St-Leon-Rot) dient dazu, unspezifische Banden zu verdauen. Das Enzym S1-Endonuklease erkennt Fehlpaarungen aus einzelsträngiger DNA und schneidet sie. Es wurde laut Herstellerprotokoll gearbeitet und 2 µg DNA eingesetzt.

2.8 Gelelektrophorese

Die erzielten Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Um eine möglichst hohe Auflösung zu bekommen, wurden die Gele mit 4% Agarose in 150 ml TAE Puffer hergestellt. Pro Geltasche wurden 5 µl des Ansatzes pipettiert. Das Verhältnis PCR-Produkt zu Stop-Puffer (5x) betrug 4:1. Von dem Marker „GeneRulerDNA-Ladder Mix“ von Fermentas (St. Leon-Rot) wurden 6 µl aufgetragen. Bei präparativen Gelen zur Rückgewinnung von DNA (siehe 2.10.1), wurde der komplette Reaktionsansatz (20 µl) aufgetragen. Die Elektrophoresen

wurden mit 60 V für 15 Min gestartet. Anschließend wurde für einen Zeitraum von 4 h und 45 Min die Stromspannung auf 100 V erhöht.

Nach Ende der Elektrophorese wurde die im Gel enthaltene DNA gefärbt, um die Banden zu visualisieren. Hierzu wurde das Gel 15 Minuten in einer Lösung aus dH₂O und Ethidiumbromid (10000:1) inkubiert. Zum Differenzieren des Gels wurde es 15 Minuten in dH₂O gewaschen. Für die Dokumentierung wurde das Gel im DNR-Bio-Imaging-System unter UV-Licht abgelichtet.

Tab. 22: TAE-Puffer und Stop-Puffer

TAE-PUFFER		STOP-PUFFER	
Tris	40 mM	Glycerol	5,43 M
EDTA	1 mM	EDTA	0,1 M
NaOH	5 mM	TRIS-HCl	0,1 M
Essigsäure	33,3 mM	Bromphenolblau	3 mM

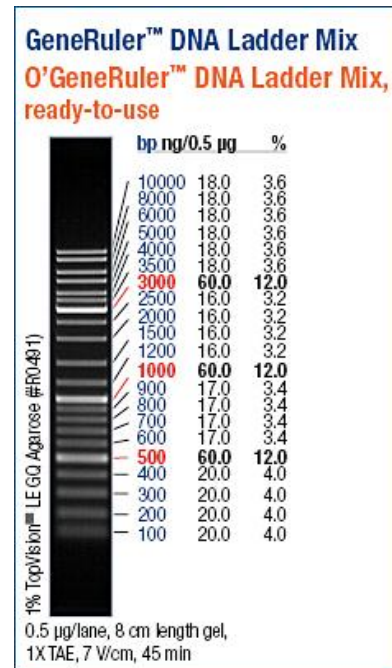


Abb. 10: 100 bp Leiter („GeneRuler DNA-Ladder Mix“ von Fermentas (St. Leon-Rot))

2.9 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese wurde von der Firma Genterprise (Mainz) mit dem Qiaxel System der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Bei der Kapillarelektrophorese findet die Trennung der DNA in einem dünnen Kapillarrohr in einer Elektrolytlösung statt. Sie hat gegenüber der herkömmlichen Gelelektrophorese den Vorteil, dass sie auch bei niedriger Nukleinsäurekonzentration (bis zu 0,1 ng/µl) noch distinkte Banden liefert. Die Auftrennung erfolgt bis auf 3-5 bp genau. Die Durchführung benötigt mit ca. 30 Minuten erheblich weniger Zeitaufwand als die herkömmliche Gelelektrophorese. Die Ergebnisse werden digital dargestellt.

2.10 Sequenzierung

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den Amplifikaten der untersuchten Marker um die gewünschte kolumnarspezifische Bande handelt, wurde die DNA der Banden sequenziert. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen gegen das Genom von 'Golden Delicious' „geblastet“ und überprüft, ob sich diese auf Chromosom 10 befinden.

2.10.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Das Gel wurde auf einen UV-Tisch gelegt und die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurden sie in ein Säulenröhrchen aus dem „*Ultrafree®-DA Gelextraktionskit*“ (Roth, Karlsruhe) gegeben und es erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 g für 10 Minuten. Im Eluat befand sich die zurückgewonnene DNA. Diese wurde zur Direktsequenzierung zur Firma Starseq (Mainz) gegeben. Dafür war es lediglich erforderlich, die gereinigten Plasmide wie folgt zusammen zu pipettieren:

x µl Plasmid
1 µl Primer (10pmol)
mit H₂O auf 6 µl auffüllen

Die eingesetzte Menge an Plasmid war abhängig von der Plasmidkonzentration und sollte zwischen 170 und 350 ng betragen. Als Primer wurden bei der Direktsequenzierung der spezifische Forward oder Reverse Primer benutzt. Alternativ wurde die DNA vor der Sequenzierung zunächst in Bakterien kloniert. Bei einer Sequenzierung nach vorangegangener Klonierung wurde entweder der M13 Primer forward oder der M13 Primer reverse benutzt.

2.10.2 Klonierung

Eine Klonierung ist eine Methode, mit der ein PCR-Produkt in reiner Form vervielfältigt wird. Sie setzt sich aus den Arbeitsschritten Ligation und Transformation zusammen. Der Einbau der Fragmente in ein Plasmid erfolgte hierbei über eine Topoisomerase vermittelte Reaktion (Ligation). Als Transformation bezeichnet man die anschließende Einschleusung des Ligationsproduktes (Vektor plus Insert) in eine kompetente Bakterienzelle.

2.10.2.1 Ligation

Für den Ligationsansatz wurde das pGem®-T Vektor System I (Promega, Mannheim) verwendet. Der Einbau des Fragments in den Vektor wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die empfohlene Vektormenge wurde von 1,0 µl auf 0,5 µl reduziert.

2.10.2.2 Transformation

Für die Transformation wurde das Ligationsprodukt in die kompetenten Bakterien eingefügt:

- Kompetente Bakterien (*E. coli* XL1, 100 µl) auf Eis auftauen
- Zugabe der ligierten DNA (2 µl) und vorsichtiges Mischen mit den Bakterien
- 30 Min auf Eis inkubieren
- 100 µl LB-Medium hinzugeben
- 30 Min bei 37°C inkubieren
- 20 µl IPTG (1 ml/l) und 10 µl x-Gal (2 ml/l) dazugeben
- 200 µl auf LB-Platten ausplattieren
- ÜK 37°C

Die Platten können bei 4°C aufbewahrt werden.

2.10.2.3 Blau-Weiß-Selektion

Anhand der Blau-Weiß-Selektion ist es möglich, diejenigen Bakterienkolonien zu identifizieren, welche das rekombinante Plasmid aufgenommen haben. Da die Zellen auf Carbenecillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen wurden und der Vektor ein Carbenecillinresistenzgen trägt, können auf den Platten ausschließlich plasmidhaltige Bakterien wachsen. Die verwendeten *E. coli* Bakterienstämme enthalten ein mutiertes *lacZ*-Gen, welches nur für den α -Peptidteil der β -Galactosidase kodiert. Der Vektor trägt den fehlenden, für die Bildung der Galactosidase notwendigen Abschnitt. Wird ein DNA-Fragment in das Plasmid eingebaut, wird dieser enzymkodierende Teil im Vektor zerstört. Die Galactosidase setzt das Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid) zu einem blauen Produkt um. Diejenigen Bakterienkolonien, die einen Vektor ohne Insert aufgenommen haben, verfärben sich bläulich. Diejenigen Zellen, in die ein Plasmid mit Insert eingebaut wurde, bleiben weiß. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden die weißen Kolonien aufgenommen und in 5 ml LB-Medium mit Carbenecillin (5 mg/l) übertragen. Es erfolgte eine Übernachtskultur bei 37°C.

2.10.2.4 Plasmidaufreinigung

Von der Übernachtskultur der Bakterien der Blau-Weiß-Selektion wurde die Plasmid-DNA mit dem „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ von Fermentas (St.Leon-Rot) aufgereinigt.

2.10.2.5 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung, ob es sich bei der Übernachtskultur der Blau-Weiß-Selektion um Bakterien mit dem gewünschten Integrat handelte, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Zu dem Reaktionsansatz der PCR wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze ein kleiner Teil der gepickten Kolonie in den Reaktionsansatz der Kolonie-PCR überführt.

Tab. 23: Reaktionsansatz Kolonie-PCR

REAKTIONSANSATZ KOLONIE-PCR	
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
10x Puffer (750 mM)	2,0 µl
dNTP (10 mM/each)	0,4 µl
Taq-Polymerase (5 u/µl)	0,8 µl
BSA (20 mg/ml)	0,1 µl
dH ₂ O	11,1 µl
Primer for (1 µM)	2,7 µl
Primer rev (1 µM)	2,7 µl
Σ	20 µl

Tab. 24: Cycler-Bedingungen Kolonie-PCR

KOLONIE-PCR		
1.	Deckeltemperatur	110°C
2.	Denaturierung der DNA	92°C, 30 Sec
3.	Annealing	65°C, 90 Sec
4.	Finale Inkubation	72°C, 5 Min
Schritt 2.-3.	Zyklen	30

2.10.2.6 Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Klonierung der DNA wurden kompetente Bakterien hergestellt:

- 5 ml LB + MgSO₄ mit Bakterien (XL-1 Blue MRF, Stratagene) animpfen
- ÜK, 37°C
- 2 ml der ÜK in 500 ml LB + MgSO₄ überführen, 3 h bei 37°C schütteln
- Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 Min (4°C)
- in 35 ml Transformationspuffer resuspendieren
- Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 Min (4°C)
- Pellet in 20 ml Transformationspuffer resuspendieren, 1 h auf Eis inkubieren
- Bakterien à 100 µl aliquotieren und bei -70°C aufbewahren

Tab. 25: Transformationspuffer

TRANSFORMATIONSPUFFER	
MOPS (MW 209.3)	1,05 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (MW 147)	6,26 g
D-Glukose (MW 180)	2,5 g
dH ₂ O	425 ml
Glycerol	75 ml
10 N NaOH	100 µl
pH	6,5

Der Transformationspuffer wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz der kompetenten Zellen wurden die Bakterien mit 2 µg des pUC 18 Vektors (Fermentas, St. Leon-Rot) transformiert und auf Agarplatten mit 50 mg/l Carbenecillin ausplattiert. Nach der Übernachtskultur wurden die erhaltenen Kolonien ausgezählt. Die Kolonienanzahl steht äquivalent für die Transformationseffizienz der Bakterien.

2.11 Sequenzbewertung am Computer

Folgende Computerprogramme und Datenbanken wurden zur Sequenzbewertung verwendet:

Datenanalyse

CHROMAS 2.31 <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

Primerdesign

MSATCOMMANDER <http://code.google.com/p/msatcommander/>

OLIGO CALC <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html>

Datenbanken

Blast NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Blast IASMA <http://genomics.research.iasma.it/blast/blast.html>

Genome Browser IASMA <http://genomics.research.iasma.it/gb2/gbrowse/apple/>

Die von der Firma Starseq (Mainz) erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Programm „CHROMAS“ editiert. Ob es sich dabei um die gewünschten Sequenzen des Chromosoms 10 handelte, wurde durch eine „Blast-Suche“ mit Blast IASMA untersucht. Die Blast Zuordnung wurde mittels dem „Genome Browser“ von IASMA überprüft. Die Mikrosatelliten für die Markergenerierung wurden mit „MSATCOMMANDER“ identifiziert (siehe 2.4). Die Primer wurden mit dem Programm „OLIGO CALC“ auf ihre Eigenschaften überprüft.

C Ergebnisse

1. Agrobakterien-vermittelte Transformation

1.1 Ploidiegradanalysen der Apfelselektion ‘Procats’ und der Sorte ‘Jonagold’

Um einen Aufschluss über den Chromosomensatz der zu transformierenden Apfelselektionen und Sorten zu erhalten, wurden mit den Genotypen ‘Procats’ und ‘Jonagold’ Ploidiegradanalysen durchgeführt. Der Chromosomensatz der Apfelselektion ‘A 14’ wurde bereits als diploid ($2n=34$ Chromosomen) beschrieben (Badstieber 2009). Für die Untersuchungen wurden zunächst Einzelproben der Apfelselektion ‘Procats’ und der Sorten ‘Jonagold’ und ‘Suncats’ gemessen (Abb. 11 a-c)). Die Sorte ‘Suncats’ wurde als triploid ($3n=51$ Chromosomen) beschrieben (Badstieber 2009) und diente als Referenzwert für die unbekannt Chromosomensätze von ‘Procats’ und ‘Jonagold’. Die x-Achse gibt die Fluoreszenzintensität der gemessenen Zellkerne an, die y-Achse die Anzahl analysierter Zellkerne. Die Peaks stehen für die verwendeten Apfelgenotypen. Anschließend wurden Mischproben angefertigt und gemessen. Anhand der Verhältnisse der Peaks der Sorte ‘Suncats’ zu ‘Procats’ und ‘Jonagold’, ließen sich optisch der Chromosomensatz der zu untersuchenden Genotypen ableiten. Bei ‘Procats’ ist deutlich zu erkennen, dass der Peak vor der Sorte ‘Suncats’ liegt (Abb. 11 d)) und der Chromosomensatz als diploid bestimmt werden kann. Bei der Sorte ‘Jonagold’ liegt der Peak gleich auf mit der Sorte ‘Suncats’ (Abb. 11 e)), daher kann der Chromosomensatz als triploid definiert werden.

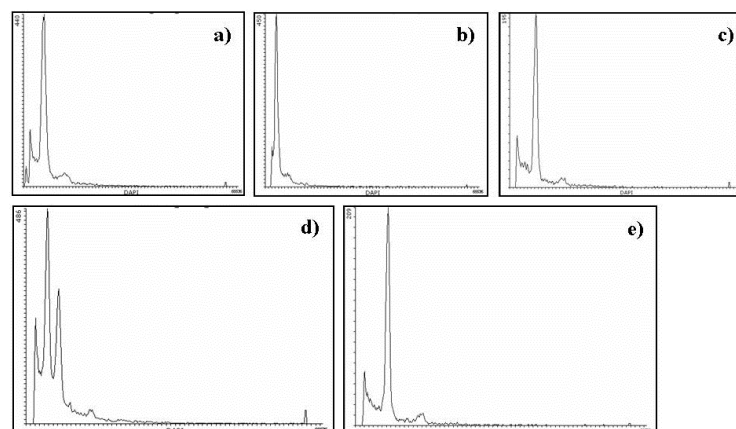


Abb. 11: Ploidiegradanalysen der Apfelselektion ‘Procats’ und den Sorten ‘Suncats’ und ‘Jonagold’. Einzelanalysen von ‘Suncats’ a), ‘Procats’ b) und ‘Jonagold’ c). Mischproben von ‘Suncats’ und ‘Procats’ d) und ‘Suncats’ und ‘Jonagold’ e).

1.2 Optimierung der Medien für die Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’

Sprossregenerationsmedien

Die Grundlage für ein erfolgreiches Transformationssystem ist ein effizientes Regenerationssystem (Klee & Rogers 1989). Da die Regeneration beim Apfel stark Genotypen abhängig ist (Bulley & James 2004), wurden für die Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’ ein Regenerationsmedium etabliert. Dabei wurden 45 Medien mit unterschiedlichen Hormonkonzentrationen bei zwei verschiedenen Temperaturen untersucht (22 und 25°C). In Tabelle 26 sind die Medien ersichtlich, auf denen erfolgreich Sprosse aus Blattexplantaten regeneriert werden konnten. Für Transformationsversuche wurde das Medium ausgewählt, welches die meisten, größten und vitalsten Regenerate erzielen konnte. Für den Genotyp ‘A 14’ war das Medium Nummer 1, für ‘Procats’ Medium Nummer 36, die beide bei 25°C kultiviert wurden (siehe Abb. 12).

Tab. 26: Getestete Regenerationsmedien für die Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’. Die Medien, auf denen erfolgreich Sprosse aus Blattexplantaten regeneriert werden konnten, sind mit einem Kreuz markiert. Die bei Transformationsversuchen verwendeten Medien sind mit einem roten Kreuz hervorgehoben.

MEDIEN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
‘A 14’, 22°C	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
‘A 14’, 25°C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
‘Procats’, 22°C			x		x			x							
‘Procats’, 25°C			x		x			x				x			
MEDIEN	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
‘A 14’, 22°C	x		x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x
‘A 14’, 25°C	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
‘Procats’, 22°C				x	x						x	x			x
‘Procats’, 25°C	x				x		x				x	x			
MEDIEN	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
‘A 14’, 22°C	x	x	x	x	x			x	x	x	x				
‘A 14’, 25°C	x	x	x	x	x	x			x		x				
‘Procats’, 22°C	x	x			x	x									
‘Procats’, 25°C	x	x	x	x		x				x					x

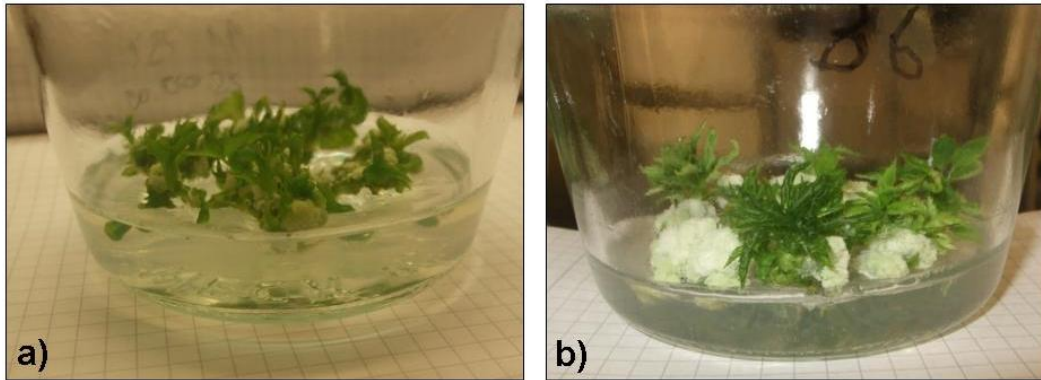


Abb. 12: Sprossregenerate auf Regenerationsmedium. a) zeigt den Genotyp 'A 14' auf dem Regenerationsmedium Nummer 1, b) zeigt den Genotyp 'Procats' auf dem Regenerationsmedium Nummer 36. Beide Medien wurden bei 25°C kultiviert.

Selektionsmedien

Zusätzlich wurden Selektionsmedien für die Apfelsektionen 'A 14' und 'Procats' etabliert. Neben dem eigentlichen Selektionsagens ist in diesem Medium ein Antibiotikum notwendig, dass Agrobakterien abtötet. Diese können auch nach dem Waschschrift bei einer Transformation in Restmengen am Explantat verbleiben. Den Regenerationsmedien wurde zunächst das Antibiotikum Cefotaxim zugefügt, welches die am Explantat verbliebenen Agrobakterien abtöten soll. Die Apfelsektionen 'A 14' und 'Procats' tolerieren Cefotaxim im Medium mit der Konzentration 200 mg/l sehr gut. In Abbildung 13 ist zu sehen, dass die Vitalität der Sprossregenerate bei dieser Antibiotikakonzentration im Medium sich nicht von der Vitalität unterscheidet, die auf einem Medium ohne Antibiotika erzielt wird.

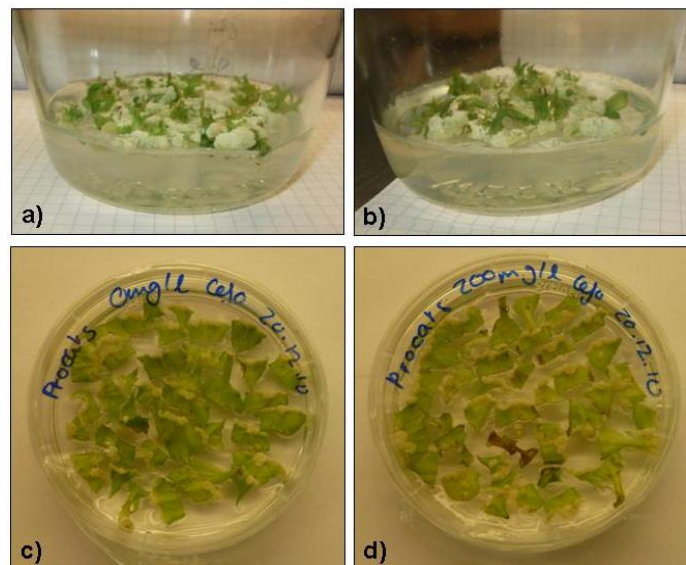


Abb. 13: Cefotaxim-haltiges Regenerationsmedium. Sprossregenerate auf einem Regenerationsmedium ohne Cefotaxim (a) 'A 14', c) 'Procats') und auf dem gleichen Medium mit 200 mg/l Cefotaxim (b) 'A 14', d) 'Procats').

Für die Apfelselektion 'A 14' wurde dem Medium zusätzlich zu Cefotaxim die Selektionsantibiotika Hygromycin oder Kanamycin hinzugegeben, um je nach verwendetem Vektorkonstrukt (siehe Material und Methoden, 1.1.2) eine Selektion transgener von nicht-transgenen Pflanzen zu ermöglichen. Es wurde die Konzentration ausgewählt, bei der alle Blattsegmente abgestorben waren, um eine Regeneration von sogenannten „Escapes“ vorzubeugen.

Wie in Abbildung 14 b) zu sehen ist, waren bei 10 mg/l Hygromycin im Medium alle Blattsegmente der Apfelselektion 'A 14' abgestorben. Daher wurde diese Konzentration bei späteren Transformationen in den Selektionsmedien verwendet. Bei Medien mit dem Selektionsantibiotikum Kanamycin sind bei 25 mg/l (Abb. 14 e)) die Blattsegmente nicht mehr vital und regenerierten nicht mehr. Daher wurde diese Konzentration in späteren Versuchen verwendet.

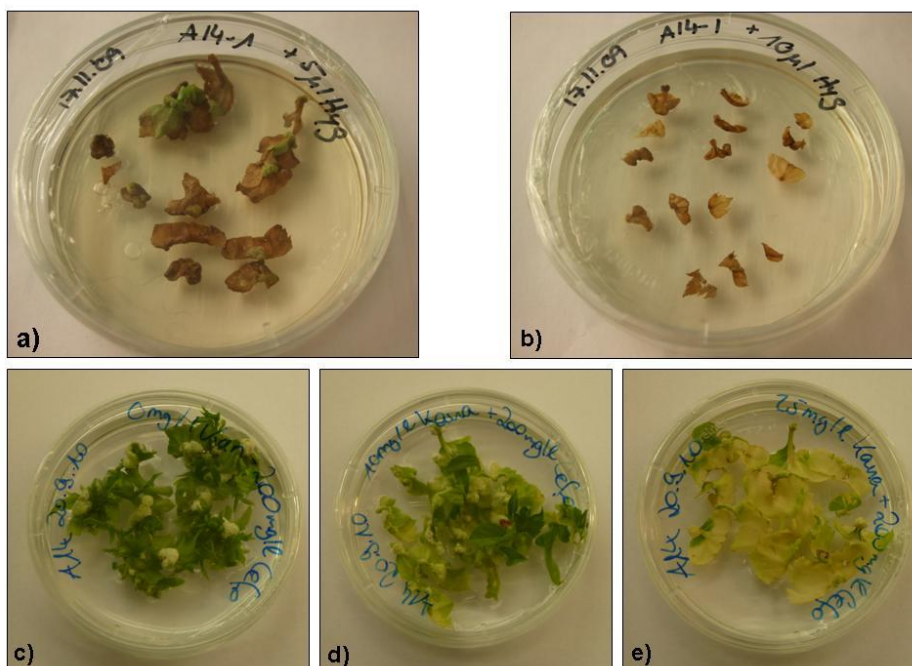


Abb. 14: Selektionsmedien für die Apfelselektion 'A 14'. a) zeigt ein Regenerationsmedium mit 5 mg/l Hygromycin, es wurde ein „Escape“ gebildet. Bei 10 mg/l Hygromycin im Medium (b) sind alle Blattsegmente abgestorben. c) zeigt ein Regenerationsmedium ohne Selektionsagens und deutlicher Sprossregeneration, b) zeigt das gleiche Medium mit 10 mg/l Kanamycin. Die Regeneration reduzierte sich deutlich gegenüber dem Medium ohne Kanamycin. Bei 25 mg/l Kanamycin im Medium (e) war keine Regeneration mehr festzustellen.

1.3 Transformation der Apfelselektion 'A 14'

Der Genotyp 'A 14' sollte mittels Agrobakterien transformiert werden. Dafür wurde der Bakterienstamm **LBA4404** mit dem binären Vektorsystem **pFxB-114.1** verwendet. Die **OD** des Inokulationsmediums betrug **0,5**. Als Verwundungsmethode wurde das **Dritteln** der Blätter gewählt. Die **Ko-Kulturdauer** wurde mit **4** und **5** Tagen getestet. Die bei diesen Transformationsversuchen erzielten Regenerate starben ab und konnten bezüglich ihrer Transgenität nicht untersucht werden (T1/2 und T11, siehe Tab. 27).

Die Transformationsbedingungen stellen für die Blattexplantate einen Stressfaktor dar. Um diesen zu minimieren, wurde ein möglicher positiver **Einfluss des Antioxidans Liponsäure (LS)** auf die Transformationsrate untersucht. Bei den folgenden Transformationen wurde das Antioxidans in verschiedenen Konzentrationen (0/50/75/100 µM bei T8, 0/10/250/500 µM bei T3, 0/50/100/150 µM bei T4 und 0/75/150/200 µM bei T5/6) den Ko-Kultur- und Selektionsmedien hinzu gegeben. Exemplarisch konnten die erhaltenen Regenerate bezüglich ihrer Transgenität untersucht werden (siehe Abb. 15 und Abb. 16).

Da auch bei diesen Regeneraten keine Transgenität festgestellt werden konnte, wurde der Einfluss des hypervirulenten Bakterienstamms **EHA105** auf die Transformationsrate getestet und zusätzlich verschiedene Parameter variiert, um die Transformationsrate zu steigern:

Als Variation der Vektorkonstrukte dienten die binären **Vektorsysteme pCHeG, pCambia1301** und **pCambia2305.1**. Der Einfluss der **OD** des Inokulationsmediums wurde mit Werten in Höhe von **0,5, 1,0** und **1,5** getestet. Die **Ko-Kulturdauer** wurde von **2** bis **5 Tagen** getestet. Als **Verwundungsmethoden** der Blattexplantate wurden das „**Crushen**“, das **Nadeln** und das **Dritteln** untersucht. Bei den untersuchten Regeneraten aus diesen Transformationsversuchen konnte mittels GUS-Tests ebenfalls keine Transgenität nachgewiesen werden.

Da bei den Transformationsversuchen der Apfelselektion 'A 14' unter selektiven Bedingungen gearbeitet wurde und an sämtlichen untersuchten Regeneraten keine Transgenität nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich bei den untersuchten Objekten um sogenannte „Escapes“ handelte.

Tab. 27: Transformationsversuche der Apfelsektion 'A 14'

Nr.	Bakterien Vektor	Ko-Kulturdauer (Tage)	OD	Segmente	Regenerate	Transformationsrate	Verwundung
T1/2	LBA4404 pFxB-114.1	4	0,5	270	2	/	gedrittelt
T11		5		1400	3	/	gedrittelt
T8				180	2 (75µM LS)	/	gedrittelt
T3		6		180	/	/	gedrittelt
T4		7		180	3 (100µM LS)	/	gedrittelt
T5/6		20		360	2 (0µM LS) 2 (75µM LS) 1 (200µM LS)	/	gedrittelt
T17/19/21	EHA105 pChEG	2	0,5	1030	5	/	gedrittelt
T26			0,5	132	2	/	gecrusht
T23/25			1,0	465	22	/	gedrittelt
T24			1,5	150	/	/	gedrittelt
T17/19/21		3	0,5	1030	10	/	gedrittelt
T26			0,5	132	/	/	gecrusht
T23/25			1,0	465	15	/	gedrittelt
T24			1,5	150	/	/	gedrittelt
T12/15/21		4	0,5	1000	6	/	gedrittelt
T16/18			1,0	600	4	/	gedrittelt
T20			1,5	300	/	/	gedrittelt
T13/14		5	0,5	1105	/	/	gedrittelt
T27			0,5	192	/	/	gecrusht
T22			1,5	300	/	/	gedrittelt
T28		EHA105 pCambia 1301	2	0,5	300	1	/
T29	1,0			450	/	/	gecrusht
T28	3		0,5	300	2	/	gecrusht
T29			1,0	450	/	/	gecrusht
T51	EHA105 pCambia 2305.1	2	0,5	675	7	/	gecrusht
T46/48/49/50				3570	17	/	genadelt
T44		3		1041	9	/	genadelt

Transgennachweis der Regenerate:

Die erhaltenen Regenerate aus den Transformationsversuchen wurden bezüglich ihrer Transgenität untersucht. Blattquerschnitte von Regeneraten, die durch Transformationen mit den Vektoren pFxB-114.1 und pCHeG erzielt wurden, wurden mikroskopisch unter UV-Anregung bezüglich einer eGFP veranlassten Fluoreszenz untersucht. Abb. 15 b) und d) zeigen, dass unter UV-Anregung die Chloroplasten mit einer intensiven, roten Eigenfluoreszenz leuchten. Die Zellwände fluoreszieren gelb-grünlich. Eine für eGFP typische, leuchtend grüne Fluoreszenz konnte bei keinem der untersuchten Regenerate festgestellt werden.

Die Regenerate, die durch Transformationen mit den Vektoren pCambia1301 und pCambia2305.1 erzielt wurden, wurden mittels GUS-Test untersucht. GUS-positive Zellen konnten nicht detektiert werden.

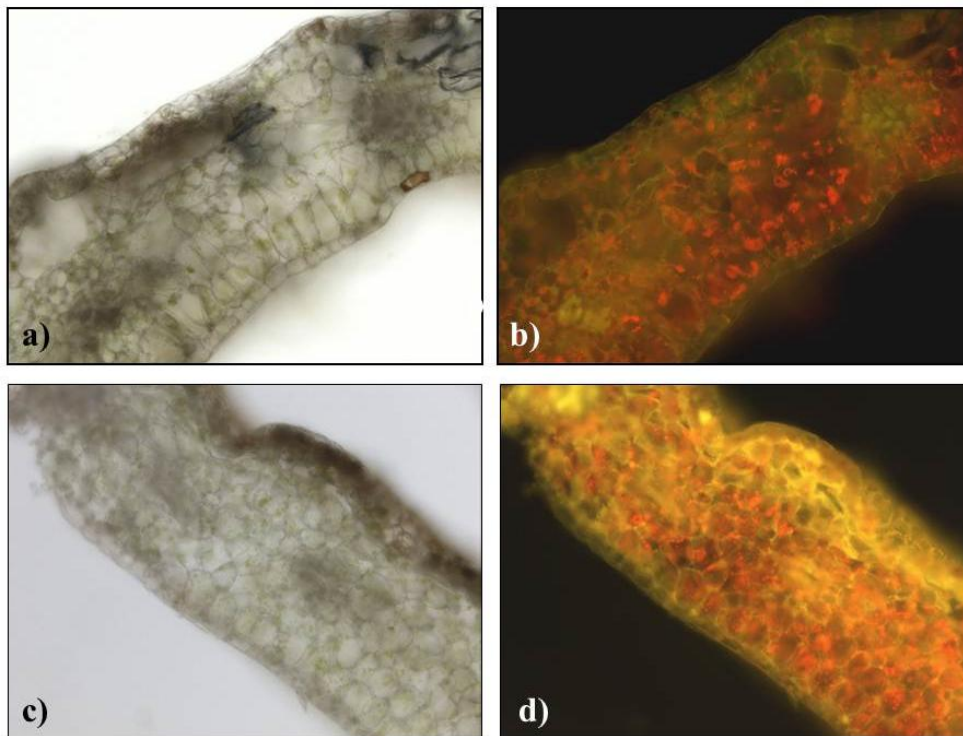


Abb. 15: Blattquerschnitte von Sprossregeneraten aus den Versuchen T5 und T18. a) (T5) und c) (T18) zeigen die untersuchten Objekte im Hellfeld. b) (T5) und d) (T18) zeigen die Blattquerschnitte unter Blauanregung. Die Vergrößerung betrug 40x.

Zusätzlich wurde DNA aus den Regeneraten isoliert. Mittels PCR wurden exemplarisch Regenerate (zwei aus T6, drei aus T4, eines aus T18 und drei aus T21) auf die Amplifikation des *hptII*-Gens (Hyg) und des *virG*-Gens untersucht (siehe Abb. 16). Bei den Regeneraten aus den Versuchen T18 und T21 wurde zusätzlich auf Insertion des *eGFP*-Gens getestet (Abb. 16 c)).

Bei den Regeneraten 1, 2 und 3 (T4) konnten zwar Banden für das *hptII*-Gen detektiert werden, jedoch wurden bei diesen Regeneraten auch Banden in Größe des *virG*-Gens amplifiziert (Abb. 16 b)). Bei den untersuchten Regeneraten aus den Versuchen T18 und T21 konnten keine Amplifikate nachgewiesen werden (Abb. 16 c) und d)).

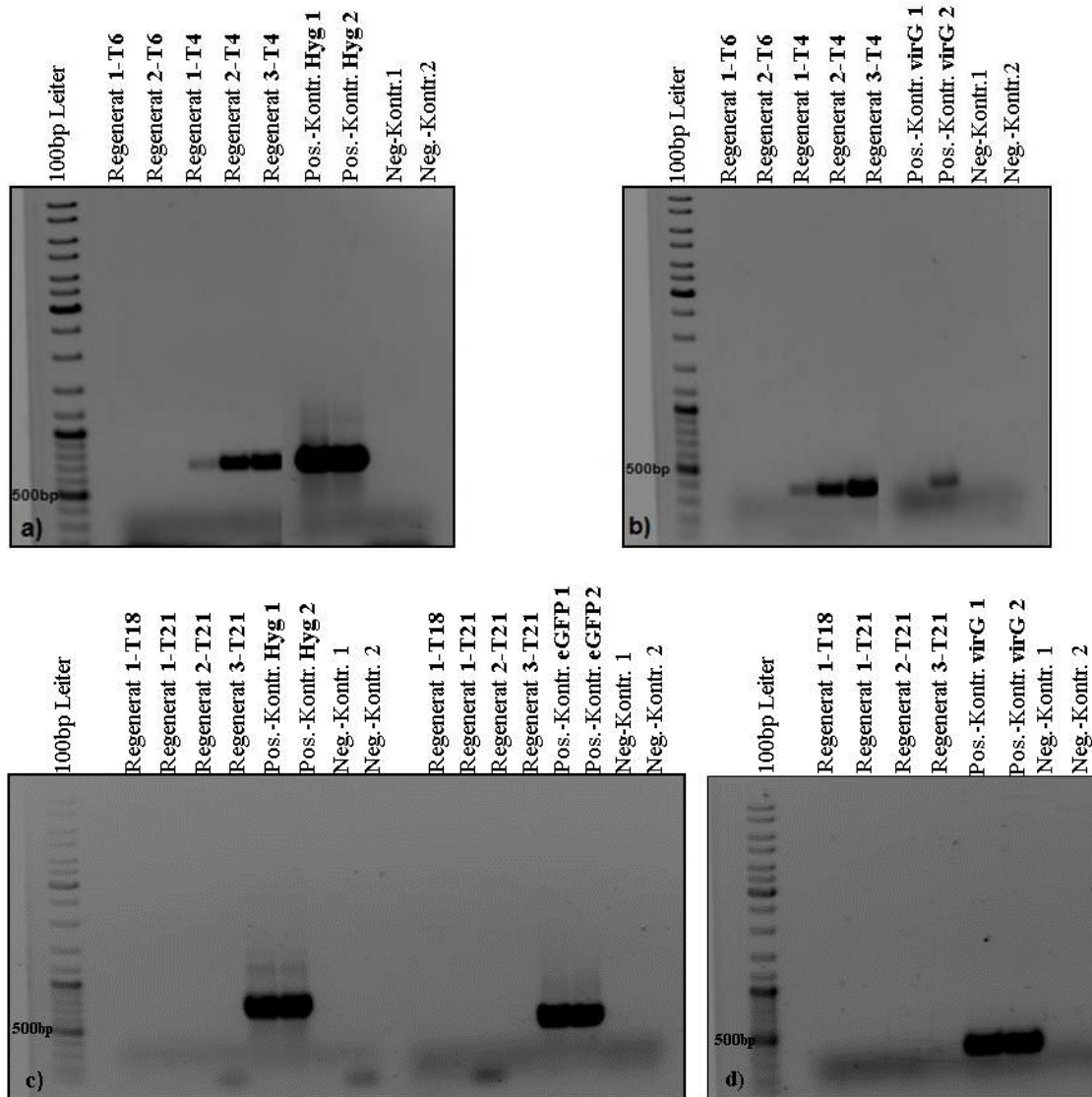


Abb. 16: Gelelektrophoresen der DNA aus Regeneraten der Transformationen T4, T6, T18 und T21. Bei den Regeneraten 1 bis 3 (T4) wurden *hptII* (a) und *virG* (b) spezifische Banden detektiert. Bei den untersuchten Regeneraten aus den Versuchen T18 und T21 konnte weder das *hptII*-Gen, noch das *eGFP*-Gen (c) oder das *virG*-Gen (d) nachgewiesen werden.

1.4 Optimierung des Regenerationssystems unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’

Bei Transformationen unter selektiven Bedingungen konnten keine Transformanden erzeugt werden (siehe 1.3). Da bei einer Selektion nicht-transgene Zellen absterben, kann eine toxische Umgebung im Medium entstehen. Dies stellt für die eventuellen transgenen Zellen eine schwierige Voraussetzung zur Teilung und Wachstum dar und es ist nicht auszuschließen, dass die wenigen transgenen Zellen unter diesen Bedingungen ebenfalls absterben. Daher wurde bei den folgenden Transformationsversuchen auf ein Selektionsantibiotikum im Selektionsmedium verzichtet. Die Auswertung der Regenerate stellt sich zwar als umfangreich dar, gibt aber einen genauen Aufschluss über sämtliche Transformationsereignisse. Zusätzlich wurden verschiedene Parameter einer Transformation variiert, um die Regenerationseffizienz für die Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’ zu optimieren. Die Regenerationseffizienz wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Regenerate}}{\text{Anzahl der transformierten Segmente}} = \text{Regenerationseffizienz in \%}$$

Die **Erhöhung der Regenerationseffizienz** ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für ein erfolgreiches Transformationssystem beim Apfel (Klee & Rogers 1989). Unter 1.2 konnte beobachtet werden, dass die Genotypen auf den etablierten Medien sehr gut regenerieren. Die Regenerationseigenschaften der Blattexplantate sind aber Schwankungen unterworfen, die beispielsweise in der aktuellen Vitalität begründet liegen. D.h. um Rückschlüsse auf eine Steigerung oder Reduzierung der Regenerationseffizienz der transformierten Genotypen ziehen zu können, hätten Regenerationsversuche parallel zu den Transformationsversuchen die aktuellen Regenerationseffizienzen der Blattexplantate widerspiegelt. Aufgrund des stark begrenzten Blattmaterials waren diese Versuche aber nicht umsetzbar. Da der Transformationsprozess sich zusätzlich reduzierend auf die Regenerationseffizienz auswirkt, wurden innerhalb der Transformationsversuche einige Blattsegmente parallel in einem Inokulat ohne Bakterien inkubiert, ansonsten durchliefen sie den gleichen Prozess wie die zu transformierenden Blattsegmente. Dadurch wurde sichergestellt, dass der untersuchte Genotyp trotz des stressauslösenden Transformationsprozesses in der Lage ist, auf dem verwendeten Medium zu regenerieren. Um Rückschlüsse auf eine Steigerung oder Reduzierung der Regenerationseffizienz transformierter Genotypen ziehen zu können, waren diese Kontrollen aufgrund des stark

begrenzten Blattmaterials bezüglich ihrer Regenerationseffizienz nicht aussagekräftig. Daher wurde die Regenerationseffizienz ausschließlich anhand transformierter Genotypen untersucht. Zusätzlich wurden die durch die Transformationsversuche erhaltenen Regenerate bezüglich einer möglichen **Transgenität** untersucht und ausgewertet.

1.4.1 Optimierung des Regenerationssystems unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘A 14’

Es wurde der Einfluss folgender Parameter auf das Regenerationssystem der Apfelselektion ‘A 14’ unter Transformationsbedingungen untersucht:

- a) **Antioxidantien (Liponsäure)**
- b) **Vektorkonstrukt**
- c) **Ko-Kulturdauer**
- d) **Verwundungsmethode**
- e) **Explantattyp**

Da sich die Transformationsbedingungen nachteilig auf die Regenerationseigenschaften der Blattexplantate auswirken können, wurde in dem Transformationsversuch T7 (Tab. 28) ein möglicher positiver **Einfluss des Antioxidans Liponsäure (a)** auf das Regenerationssystem der Apfelselektion ‘A 14’ untersucht. Es wurde der Bakterienstamm **LBA4404** mit dem binären Vektorsystem **pFxB-114.1** verwendet. Die **Ko-Kulturdauer** betrug **4 Tage**, die Blätter wurden **gedrittelt**. Die OD des Inokulationsmediums betrug 0,5. Den Ko-Kultur- und Selektionsmedien wurden Liponsäure (LS) in Konzentrationen von 0, 100, 175 und 200 µM (siehe Tab. 28) hinzugegeben.

Um den **Einfluss der Vektoren (b)** auf die Regenerationseffizienz zu untersuchen, wurden Transformationen mit dem Bakterienstamm **EHA105** und den binären Vektorsystemen **pCambia1301**, **pCambia1305.1** und **pCambia2305.1** durchgeführt (T30, T43, und T32/34/36). Die **Ko-Kulturdauer** betrug **2 Tage** und als **Verwundungsmethode** der Blattexplantate wurde das „**Crushen**“ gewählt (siehe Tab. 28).

Um den **Einfluss der Ko-Kulturdauer (c)** auf die Regenerationseffizienz zu untersuchen, wurde sie mit **2** und **3** Tagen analysiert. Die Transformationen wurden mit dem Bakterienstamm **EHA105** und den binären Vektorsystemen **pCambia1301** und **1305.1** durchgeführt (T30, T31, T38/40, T32/34/36, T37/39 und T33/35). Als **Verwundungsmethode** der Blattexplantate wurde das „**Crushen**“ und **Nadeln** gewählt (siehe Tab. 28).

Um den **Einfluss der Verwundungsmethode (d)** auf die Regenerationseffizienz zu untersuchen, wurde das „Crushen“ und **Nadeln** der Blattexplantate gewählt. Zusätzlich wurde der Nadelstempel vor Verwendung in die Bakterienlösung **gedippt**, um die Aufnahme der Bakterien in das Blattexplantat zu maximieren. Die Transformationen wurden mit dem Bakterienstamm **EHA105** und dem binären Vektorsystem **pCambia1305.1** durchgeführt (T72/73/74, T38/40, T32/34/36, T37/39 und T33/35). Die **Ko-Kulturdauer** wurde mit **2 und 3 Tagen** analysiert (siehe Tab. 28).

Tab. 28: Optimierung des Regenerationssystems unter Transformationsbedingungen für die Apfelsorte 'A 14'. Untersuchung des Einflusses von Antioxidantien (Liponsäure), Vektorkonstrukt, Ko-Kulturdauer und Verwundungsmethode auf die Regenerationseffizienz.

Nr.	Bakterien Vektor	Ko-Kulturdauer (Tage)	OD	Segmente	Regenerate	Regenerations-effizienz	Transgenität	Verwundung	Explantattyp
T7	LBA4404 pFxB-114.1	4	0,5	27	43 (0µM LS)	159,26%	/	gedrittelt	Blatt
				27	9 (100µM LS)	33,33%			
				27	4 (175µM LS)	14,81%			
				27	5 (200µM LS)	18,52%			
T30	EHA105	2		1200	124	10,33%	/	gecrusht	
T31	pCambia 1301	3		1500	188	12,53%	/	gecrusht	
T43	EHA105	2		1242	314	25,28%	/	gecrusht	
T41/42	pCambia 2305.1	3		2169	641	29,55%	/	genadelt	
T72/73/74	EHA105 pCambia 1305.1	2		2274	302	13,28%	9 (K/E)	genadelt+Dip	
T38/40				2814	479	17,02%	5(K)	genadelt	
T32/34/36				4752	450	9,47%	3(K)	gecrusht	
T37/39		3		2157	120	5,56%	4(K/E)	genadelt	
T33/35			2010	290	14,43%	11(K)	gecrusht		
T75		2	104	104	100%	44 (K/E/R)	/	Sprossspitze	
T87/102	5	281	271	96,44%	74 (K/E/R)	/			

Um den **Einfluss des Explantattyps (e)** auf die Regenerationseffizienz zu untersuchen, wurden als Alternative zu den *in vitro* Blättern **fragmentierte Sprossspitzen** als Explantate verwendet (T75 und T87/102). Die Transformationen wurden mit dem Bakterienstamm **EHA105** und dem binären Vektorsystem **pCambia1305.1** durchgeführt. Die **Ko-Kulturdauer** wurde mit **2 und 5 Tagen** getestet. Transformationsversuch T102 wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Elisabeth Bayer durchgeführt.

Den Transformationen T35 bis T43 wurde X-Gluc in das Selektionsmedium hinzugegeben. Die Transformationen T32, T34, T36, T38 und T40 wurden im Rahmen der Projektarbeit von Uwe Schwan durchgeführt. Erstmals wurden GUS-positive Zellen im Kallus (K), Explantat (E) oder Regenerat (R) nachgewiesen (T72/73/74, T38/40, T32/34/36, T37/39, T33/35, T75, T87/102, siehe Tab. 28).

a) Einfluss von Antioxidantien auf das Regenerationssystem von 'A 14' (T7)

Die Zugabe von Liponsäure wirkte sich nachteilig auf die Regenerationseigenschaften aus. Ohne das Antioxidans im Medium konnte eine Regenerationseffizienz von 159,26% erreicht werden. Diese reduzierte sich durch Zugabe von 100 μM Liponsäure auf 33,33%. Durch Zugabe von 175 μM Liponsäure reduzierte sich die Regenerationseffizienz auf 14,81%, durch Zugabe von 200 μM auf 18,52% (siehe Tab. 28). Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, reduzierten sich bei der Transformation durch steigende Liponsäurekonzentration nicht nur die Regenerationseffizienzen, sondern auch die Wachstumsentwicklung der Regenerate verzögerte sich mit steigender Liponsäurekonzentration.

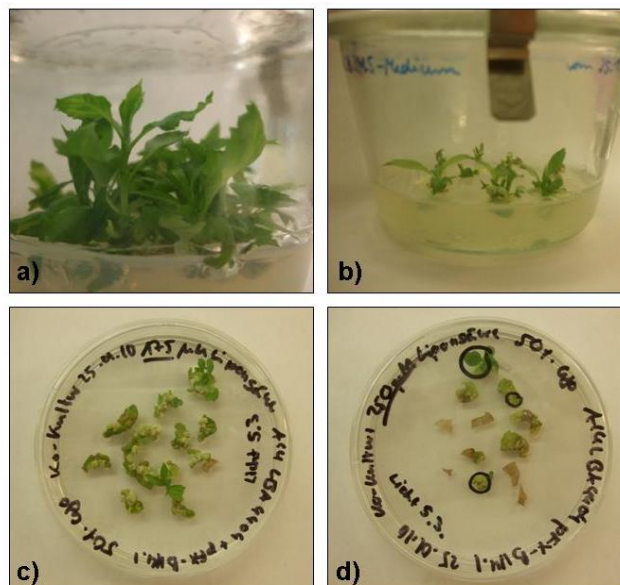


Abb. 17: Transformation T7. 8 Wochen alte Regenerate auf Selektionsmedium ohne Selektionsantibiotika. Mit steigender Liponsäurekonzentration nehmen Anzahl und Größe der Regenerate ab. a) zeigt Regenerate auf Medium ohne Liponsäure, b) mit 100 μM , c) mit 175 μM und d) mit 200 μM Liponsäure.

b) Einfluss der Vektoren auf die Regenerationseffizienz (T30, T43 und T32/34/36)

Bei der Transformation mit dem Vektor pCambia2305.1 wurde die Regenerationseffizienz auf 25,28% (T43) gesteigert, gegenüber Transformationen mit dem Vektor pCambia1301 (10,33%, T30) und mit dem Vektor pCambia1305.1 (9,47%, T32/34/36) (siehe Tab. 28).

c) Einfluss der Ko-Kulturdauer auf die Regenerationseffizienz (T30, T31, T38/40, T32/34/36, T37/39 und T33/35)

Die Erhöhung der Ko-Kulturdauer von 2 auf 3 Tage steigerte die Regenerationseffizienz von 10,33% (T30) auf 12,53% (T31) und von 9,47% (T32/34/36) auf 14,43% (T33/35). Bei den Transformationsversuchen T38/40 und T37/39 reduzierte sich bei Erhöhung der Ko-Kulturdauer die Regenerationseffizienz von 17,02% auf 5,56% (siehe Tab. 28).

d) Einfluss der Verwundungsmethode auf die Regenerationseffizienz (T72/73/74, T38/40, T32/34/36, T37/39 und T33/35)

Bei Transformationen mit **2-tägiger Ko-Kultur** reduzierte sich die Regenerationseffizienz gegenüber dem Nadeln von 17,02% auf 13,28%, wurde der Nadelstempel in die Bakterienlösung gedippt (T38/40 und T72/73/74). Wurden die Blattexplantate gecrusht, reduzierte sich die Regenerationseffizienz weiter auf 9,47% (T32/34/36).

Bei Transformationen mit **3-tägiger Ko-Kultur** steigerte das „Crushen“ der Blattexplantate die Regenerationseffizienz gegenüber dem Nadeln von 5,56% auf 14,43% (T37/38 und T33/35, siehe Tab. 28).

e) Einfluss des Explantattyps auf die Regenerationseffizienz (T75, T87/102, T72/73/74, T38/40 und T32/34/36)

Eine Erhöhung der Ko-Kulturdauer von 2 auf 5 Tage bei der Transformation fragmentierter Sprossspitzen reduzierte die Regenerationseffizienz von 100% (T75) auf 96,44% (T87/102). Bei der Transformation von Blattexplantaten wurden dagegen nur Regenerationseffizienzen zwischen 9,47% (T32/34/36) und 17,02% (T38/40) erreicht (siehe Tab. 28).

Transgennachweis der Regenerate:

Blattquerschnitte der Regenerate aus dem Transformationsversuch T7 wurden mikroskopisch unter UV-Anregung bezüglich einer eGFP veranlassten Fluoreszenz untersucht. Abbildung 18 zeigt Chloroplasten mit einer intensiven, roten Eigenfluoreszenz. Die Zellwände fluoreszieren gelb-grünlich. Eine für eGFP typisch leuchtend grüne Fluoreszenz konnte nicht festgestellt werden.

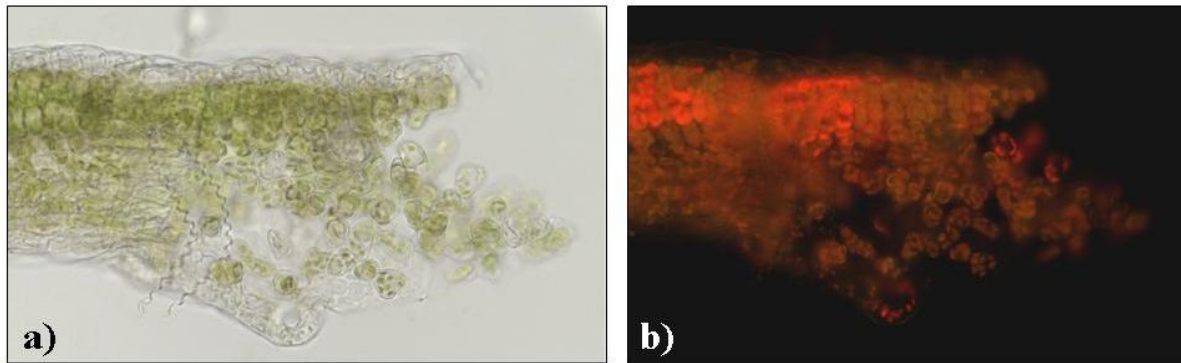


Abb. 18: Blattquerschnitt von Sprossregenerat 1 (T7). a) zeigt das untersuchte Objekt im Hellfeld, b) unter Blauanregung. Die Vergrößerung betrug 40x.

Es wurden exemplarisch 8 Regenerate des Transformationsversuches T7 mittels PCR auf die Amplifikation des *hptIII*-Gens (Hyg) und des *virG*-Gens untersucht (Abb. 19). Bei dem Regenerat 1 wurden *hptIII* (a) und *virG* (b) spezifische Banden detektiert.

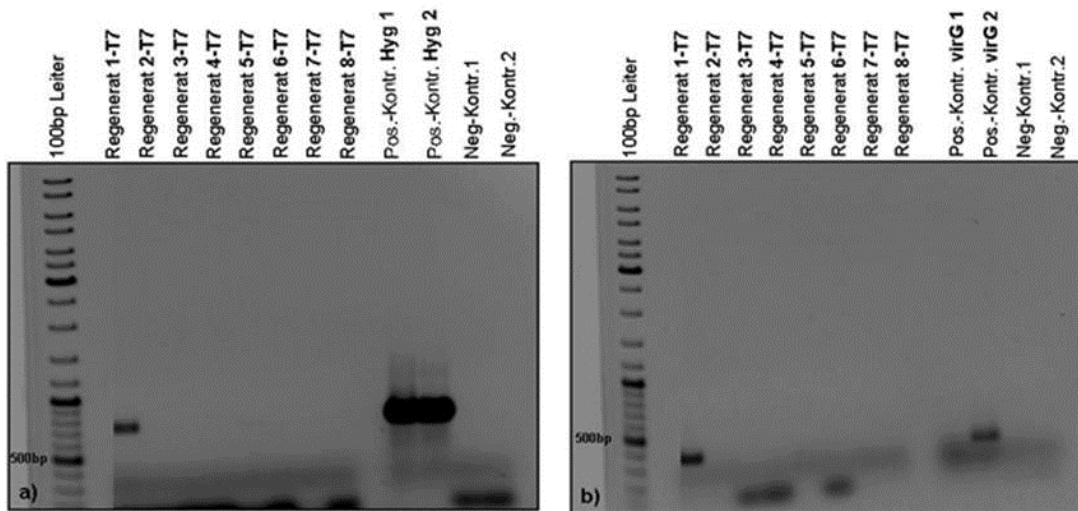


Abb. 19: Gelelektrophoresen der DNA aus 8 Regeneraten der Transformationen T7. Bei dem Regenerat 1 wurden *hptIII* (a) und *virG* (b) spezifische Banden detektiert.

Die erhaltenen Regenerate aus den Transformationsversuchen T30, T31, T43, T41/42, T72/73/74, T38/40, T32/34/36, T37/39, T33/35, T75 und T87/102 wurden mittels GUS-Test bezüglich einer

möglichen Transgenität untersucht. GUS-positive Zellen konnten bei Transformationen mit den Vektoren pCambia1301 und pCambia2305.1 nicht festgestellt werden (T30, T31, T43, T41/42). Bei Transformationen mit dem Vektor pCambia1305.1 (T72/73/74, T38/40, T32/34/36, T37/39, T33/35, T75 und T87/102) konnten GUS-positive Zellen detektiert werden. Dies war bei 32 Regeneraten möglich, die bei Transformationen erzeugt wurden, bei denen Blätter als Explantate dienten (T72/73/74, T38/40, T32/34/36, T37/39, T33/35). Die GUS-positiven Bereiche befanden sich am Kallus (K), bzw. am Explantat (E) (siehe Tab. 28 und Abb. 21). Ein *in vivo* Nachweis GUS-positiver Zellen gelang nicht.

Bei den Transformationen, bei denen Sprossspitzen als Explantat dienten (T75 und T87/102), konnten 375 Regenerate erzielt werden, von denen an 118 Regeneraten GUS-positive Zellen am Kallus (K), am Explantat (E) und am Regenerat (R) nachgewiesen werden konnte (siehe Tab. 28 und Abb. 22). Zusätzlich wurden 6 Regenerate (T87) mittels PCR auf Amplifikation von *Hyg*, *GUSPlus*, *virD* und *virG* spezifischer Banden untersucht. Bei allen getesteten Regeneraten konnten *Hyg*, *GUSPlus*, *virD* und *virG* spezifische Banden detektiert werden (Abb. 20).

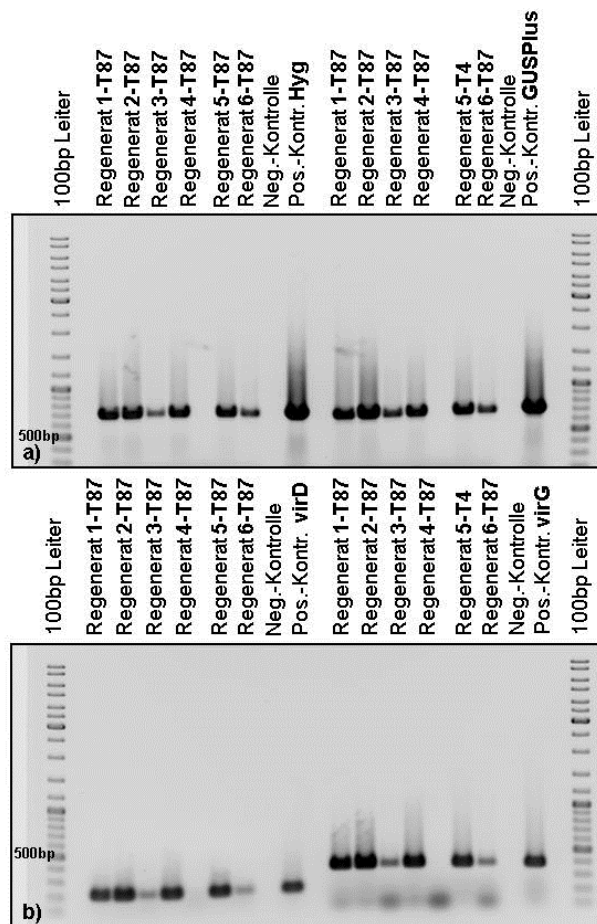


Abb. 20: Gelelektrophoresen der DNA aus 6 Regeneraten der Transformation T87. Alle getesteten Regenerate amplifizierten *Hyg*, *GUSPlus*, *virD* und *virG* spezifische Banden.

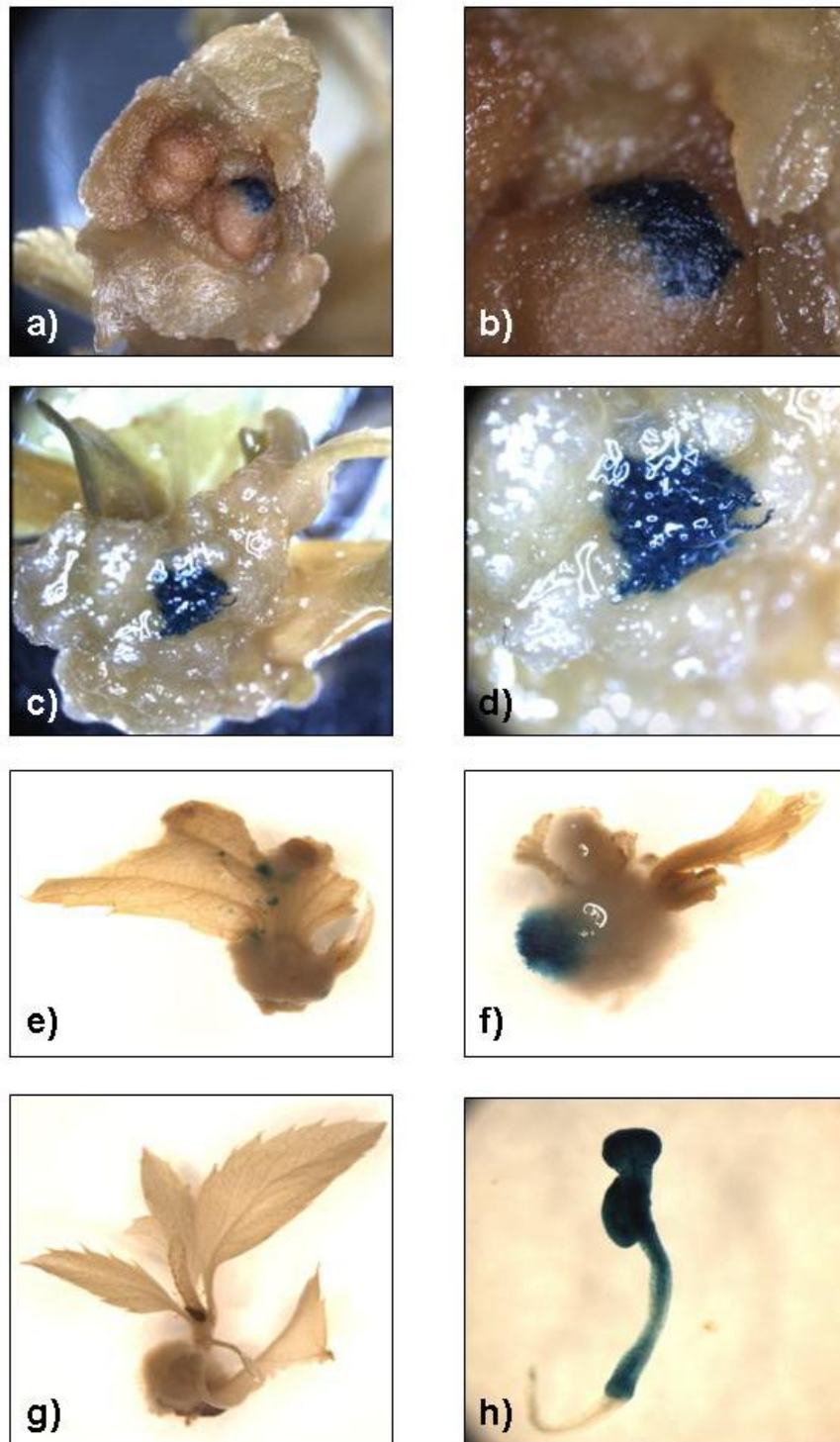


Abb. 21: GUS-Färbungen der Regenerate aus Blattexplantaten (T32, T38 und T73). Transformation T32: GUS-positive Zellen im Kallus mit 29-facher (a) und 100-facher (b) Vergrößerung. Transformation T38: GUS-positive Zellen im Kallus mit 32-facher (c) und 65-facher (d) Vergrößerung. Transformation T73: GUS-positive Zellen am Explantat (e) mit 17-facher Vergrößerung und am Kallus (f) mit 20-facher Vergrößerung. g) zeigt eine Negativkontrolle mit 12-facher Vergrößerung und h) *Arabidopsis thaliana* als Positivkontrolle des GUS-Tests mit 59-facher Vergrößerung.

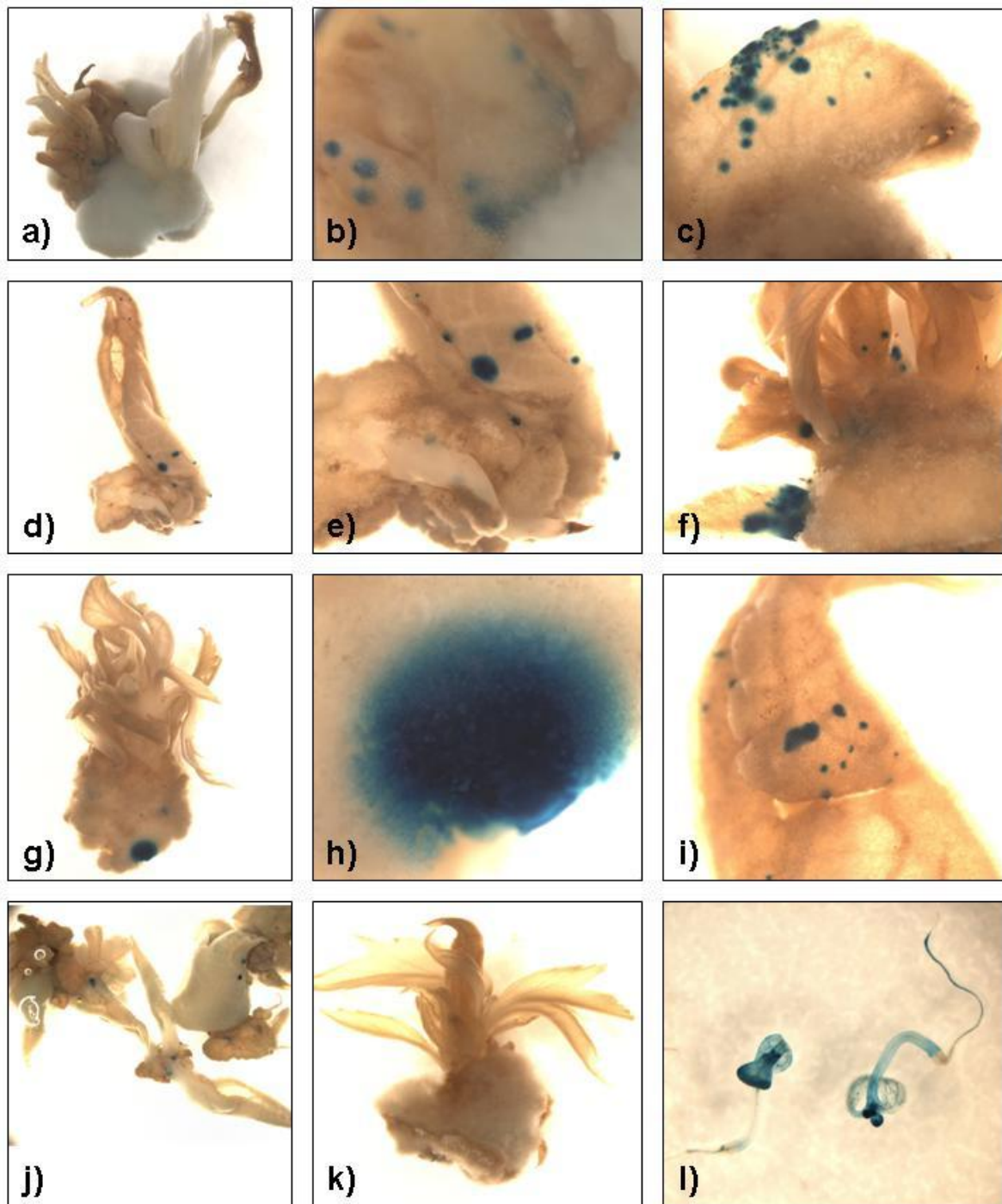


Abb. 22: GUS-Färbung der Regenerate aus fragmentierten Sprossspitzen (T75, T87 und T102).
Transformation T75: GUS-positive Zellen am Regenerat mit 17-facher (a) und 106-facher (b) Vergrößerung.
Transformation T87: GUS-positive Zellen am Regenerat mit 42-facher Vergrößerung (c). GUS-positive Zellen am Regenerat mit 9-facher (d) und 27-facher Vergrößerung (e). f) zeigt GUS-positive Zellen am Regenerat mit 24-facher Vergrößerung. GUS-positive Zellen im Kallus mit 9-facher (g) und 92-facher (h) Vergrößerung. i) zeigt GUS-positive Zellen am Regenerat mit 49-facher Vergrößerung. **Transformation 102:** GUS-positive Zellen an Regeneraten (j). k) zeigt eine Negativkontrolle mit 11-facher Vergrößerung und l) *Arabidopsis thaliana* als Positivkontrolle des GUS-Tests mit 26-facher Vergrößerung.

1.4.2 Optimierung des Regenerationssystems unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘Procats’

Es wurde der Einfluss folgender Parameter auf die Regenerationseffizienz der Apfelselektion ‘Procats’ unter Transformationsbedingungen untersucht:

- a) **Antioxidantien (Liponsäure)**
- b) **Ko-Kulturdauer**
- c) **Bakterienstamm und Vektoren**
- d) **Verwundungsmethoden**

Da sich die Transformationsbedingungen nachteilig auf die Regenerationseigenschaften der Blattexplantate auswirken können, wurde in den Transformationsversuchen TP2 und TP3 (Tab. 29) ein möglicher positiver **Einfluss des Antioxidans Liponsäure (a)** auf das Regenerationssystem der Apfelselektion ‘Procats’ untersucht. Den Ko-Kultur- und Selektionsmedien wurde Liponsäure in Konzentrationen von **0, 50, 150 und 250 µM** (siehe Tab. 29) hinzugegeben. Es wurde der Bakterienstamm **LBA4404** mit dem binären Vektorsystem **pFxB-114.1** verwendet. Die Blätter wurden **gedrittelt**. Um den Einfluss der **Ko-Kulturdauer (b)** auf die Regenerationseffizienz zu untersuchen, wurde diese mit **4 und 20 Tagen** getestet.

Um den **Einfluss des Bakterienstamms und Vektoren (c)** auf die Regenerationseffizienz zu untersuchen, wurden Transformationen mit dem Bakterienstamm **EHA105** und den binären Vektorsystemen **pCambia1305.1** und **pCambia2305.1** durchgeführt (TP4-8 und TP9). Die **Ko-Kulturdauer** betrug **3 Tage**. Um den **Einfluss der Verwundungsmethoden (d)** auf die Regenerationseffizienz zu untersuchen, wurde bei Transformationen das „**Crushen**“ und **Nadeln** der Blattexplantate untersucht (TP4-8 und TP9). Die Versuche TP4 bis TP9 wurden im Rahmen der Projektarbeit von Katrin Gamer durchgeführt. Den Transformationen TP6 bis TP8 wurde X-Gluc in das Selektionsmedium hinzugegeben, um eine *in vivo* Färbung zu ermöglichen. Bei keinem der Versuche TP4 bis TP9 konnten jedoch Regenerate erzielt werden (siehe Tab. 29). Die Blattsegmente der Kontrolle (siehe 1.4) regenerierten ebenfalls nicht.

Tab. 29: Optimierung des Regenerationssystems unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion 'Procats'. Untersuchung des Einflusses von Antioxidantien (Liponsäure), Ko-Kulturdauer, Bakterienstamm und Vektorkonstrukte und Verwundungsmethode auf die Regenerationseffizienz.

Nr.	Bakterien Vektor	Ko-Kulturdauer (Tage)	OD	Segmente	Regenerate	Regenerationseffizienz	Transgenität	Verwundung
TP1	LBA4404 pFxB-114.1	4	0,5	225	1	0,44%	/	gedrittelt
TP2				56	0(0µM)	0%	/	
				56	1(50µM)	1,79%		
				56	10(150µM)	17,86%		
				56	1(250µM)	1,79%		
TP3		20		56	1(0µM)	1,79%	/	
				56	0(50µM)	0%		
				56	0(150µM)	0%		
				56	0(250µM)	0%		
TP4-8		EHA105 pCambia 1305.1		3	0,5	7539	/	
TP9	EHA105 pCambia 2305.1	1572	/			/	/	genadelt

a) Einfluss von Antioxidantien auf die Regenerationseffizienz (TP1, TP2 und TP3)

Bei Transformationen mit 4 Tagen Ko-Kultur konnte die Regenerationseffizienz durch Zugabe von 50 μM Liponsäure von 0,44% (TP1) und 0% (TP2) auf 1,79% (TP2) gesteigert werden. Durch Zugabe von 150 μM Liponsäure wurde die Regenerationseffizienz sogar auf 17,86% gesteigert (TP2). Eine Zugabe von 200 μM Liponsäure reduzierte jedoch die Regenerationseffizienz auf 1,79% (TP2).

Bei Transformationen mit einer 20-tägigen Ko-Kulturdauer konnte nur ohne die Zugabe des Antioxidans ein Regenerat erzielt werden (TP3, siehe Tab. 29).

b) Einfluss der Ko-Kulturdauer auf die Regenerationseffizienz (TP2 und TP3)

Eine Erhöhung der **Ko-Kulturdauer** von **4** auf **20 Tage** steigerte die Regenerationseffizienz von 0 (TP2) auf 1,79% (TP3), wurde auf ein Antioxidans verzichtet. Wurde Liponsäure verwendet, reduzierte sich die Regenerationseffizienz auf 0 (TP3) (siehe Tab. 29).

c) Einfluss des Bakterienstamms und Vektoren auf die Regenerationseffizienz (TP4-8 und TP9)

Transformationen mit dem Bakterienstamm EHA105 und den binären Vektorsystemen pCambia1305.1 und pCambia2305.1 erzielten keine Regenerate. Dadurch konnte auch keine Aussage über den **Einfluss der Verwundungsmethode auf die Regenerationseffizienz (d)** getroffen werden.

Transgennachweis der Regenerate:

Bei dem Regenerat aus dem Versuch TP1 sowie bei 10 Regeneraten aus TP2 (150 μM LS) konnte DNA in ausreichender Menge isoliert werden. Mittels PCR wurden diese auf Amplifikation von *Hyg*, *eGFP* und *virG* spezifischen Banden untersucht (siehe Abb. 23).

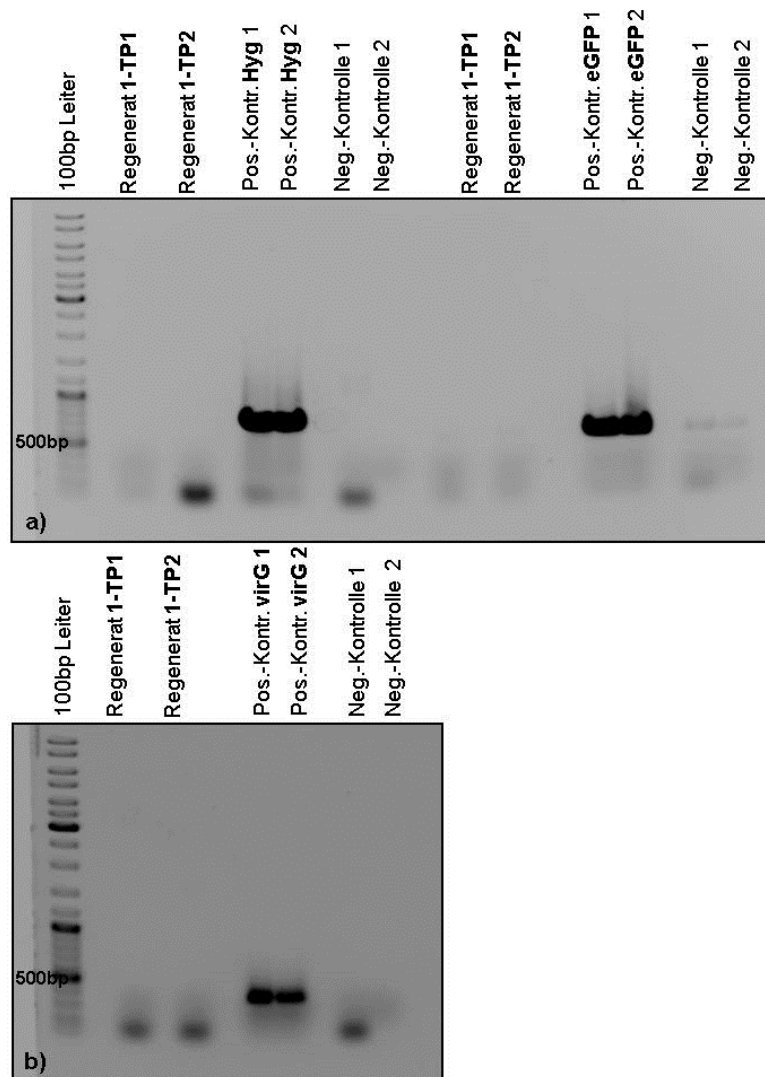


Abb. 23: Gelelektrophoresen der DNA des Regenerats der Transformation TP1 und der DNA eines exemplarischen Regenerats aus der Transformation TP2. Es konnten keine *Hyg*, *eGFP* und *virG* spezifischen Banden detektiert werden.

Mit der untersuchten DNA der Regenerate konnten keine Banden amplifiziert werden. Zusätzlich wurden Blattquerschnitte der erhaltenen Regenerate mikroskopisch unter UV-Anregung auf eGFP-Fluoreszenz untersucht. Eine eGFP charakteristische grüne Fluoreszenz konnte an den Regenraten nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 24).

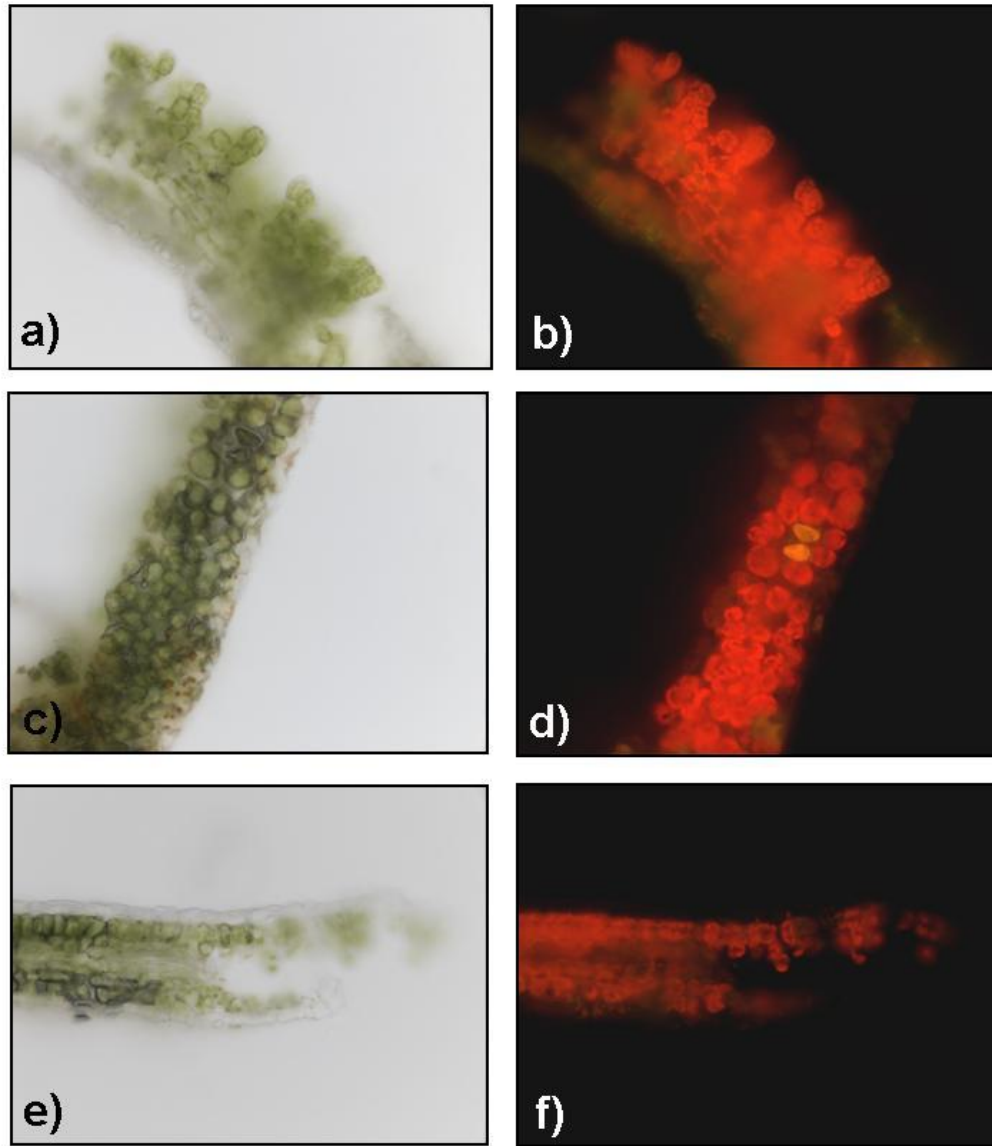


Abb. 24: Blattquerschnitte von Sprossregeneraten aus Transformationsversuchen TP1 und TP2. a) (Hellfeld) und b) (Blauanregung) zeigen das Regenerat aus TP1. c) (Hellfeld) und d) (Blauanregung) zeigen ein Regenerat aus TP2. e) (Hellfeld) und f) (Blauanregung) zeigen eine untransformierte Kontrollpflanze. Die Vergrößerung betrug 40x.

1.5 Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘A 14’

Bei der Optimierung des Regenerationssystems unter Transformationsbedingungen der Apfelselektion ‘A 14’ (1.4.1) konnten GUS-positive Zellen an Kallus und Explantat erzielt werden, wenn die Blattexplantate mit dem Bakterienstamm EHA105 und dem Vektor pCambia1305.1 transformiert wurden (Abb. 21). Ziel war es nun, die Anzahl GUS-positiver Blattexplantate zu optimieren, da durch die Erhöhung GUS-positiver Blattexplantate die Wahrscheinlichkeit der Regeneration GUS-positiver Sprosse gesteigert werden sollte. Für die Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate wurden die Blattsegmente mit dem Bakterienstamm **EHA105** und dem Vektorkonstrukt **pCambia1305.1** transformiert. Wenn nicht anders angegeben betrug die **Ko-Kulturdauer 5 Tage**, die **optische Dichte** des Inokulationsmediums **0,5** und das **Blattalter 6 Wochen**. Die **Blattexplantate** wurden in Segmente **gedrittelt**. Bei den Transformationen wurden jeweils einzelne Parameter variiert und deren Einfluss auf die Anzahl GUS-positiver Blattsegmente untersucht. Zu den untersuchten Parametern gehörten:

- a) Das Vektorkonstrukt
- b) Die Verwundungsmethode der Explantate
- c) Die Ko-Kulturdauer
- d) Die optische Dichte
- e) Die Inokulationsdauer
- f) Acetosyringon im Ko-Kulturmedium
- g) Das Blattalter

Die transformierten Blattexplantate wurden direkt nach der Ko-Kultur einem GUS-Test unterzogen und die Effizienz, also das Verhältnis GUS-positiver Blattsegmente, zu der Gesamtanzahl transformierter Blattsegmente bestimmt:

$$\frac{\text{GUS-positive Segmente}}{\text{Gesamtanzahl aller transformierten Segmente}} = \text{Effizienz in \%}$$

a) Vektorkonstrukt

Die binären Vektorsysteme pCambia1305.1 und pCambia2305.1 unterscheiden sich lediglich in ihrer Hygromycin-, bzw. Kanamycinresistenz. Deswegen sollte zunächst geklärt werden, wieso es bei Transformationen mit dem Vektor pCambia1305.1 möglich war, GUS-positive Zellen zu erhalten und bei Transformationen mit dem Vektor pCambia2305.1 dagegen nicht (siehe Tab. 28). Hierfür wurden Transformationen mit beiden Vektorsystemen durchgeführt und die Explantate nach 2, bzw. 5 Tagen Ko-Kultur einem GUS-Test unterzogen.

Tab. 30: Untersuchung des Vektorkonstruktes (T79, T85/T89)

Vektor	pCambia2305.1	pCambia1305.1
Versuchsnummer	T79	T85/89
getestete Segmente nach 2 Tagen Ko-Kultur	180	120
GUS-positive Segmente	/	/
getestete Segmente nach 5 Tagen Ko-Kultur	180	120
GUS-positive Segmente (Effizienz)	/	53 (44,17%)

Nach **2 Tagen Ko-Kultur** konnten bei den Explantaten keine GUS-positiven Zellen nachgewiesen werden. Nach **5 Tagen Ko-Kultur** wiesen 44,17% der Segmente ein GUS-positives Signal auf, die mit dem Vektor pCambia1305.1 transformiert wurden. Ein solches Signal konnte bei Explantaten, die mit dem Vektor pCambia2305.1 transformiert wurden, nicht detektiert werden (siehe Tab. 30 und Abb. 25). Als optimaler Parameter wurde daher das Vektorsystem pCambia1305.1 bestimmt.

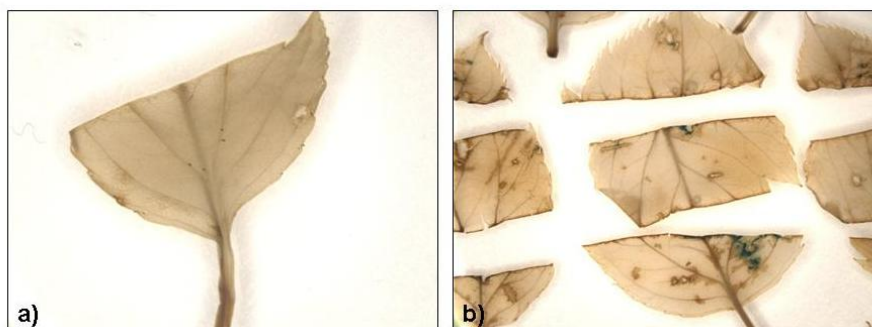


Abb. 25: Untersuchung des Vektorkonstruktes (T79, T85/T89), GUS-Test nach 5 Tagen Ko-Kultur. a) zeigt ein Blattsegment, das mit dem Vektor pCambia2305.1 transformiert wurde (T79, Vergrößerung 14,1x). Es konnten keine GUS-positiven Zellen nachgewiesen werden. b) zeigt GUS-positive Zellen an Blattsegmenten, die mit dem Vektor pCambia1305.1 transformiert wurden (T89, Vergrößerung 7,11x).

b) Verwundungsmethode

Bei diesen Transformationen wurden die Verwundungsmethoden „Crushen“, Nadeln, Sechsteln und Dritteln der Blattextplantate angewandt und miteinander verglichen. Die meisten GUS-positiven Segmente (23,06%) konnten erzielt werden, wenn die Explantate nach Bulley und James (2004) gedrittelt wurden (siehe Tab. 31). Des Weiteren wurde überprüft, ob die Effizienz des Dritteln noch gesteigert werden konnte. Durch zusätzliches Zerkratzen der Blattoberfläche mittels eines Skalpell, bzw. durch Zerstechen mit einer Pinzettenspitze ließ sich die Effizienz auf 34,67% und 30,67% steigern (siehe Tab. 32). Das Herausschneiden eines Dreiecks oder ein Vierteln der Blätter reduzierte den Anteil GUS-positiver Segmente (auf 12,00% und 6,00%, Tab. 32). Als optimale Verwundungsmethode der Explantate bei einer Transformation wurde das Dritteln der Blätter bestimmt. Zwar ließ sich die Zahl der GUS-positiven Segmente durch zusätzliches Zerkratzen oder Zerstechen erhöhen, jedoch ließ durch die zusätzliche Verletzung die Qualität des Blattmaterials stark nach. Dies wiederum wirkt sich negativ auf die Regenerationseigenschaft des Explantats aus.

Tab. 31: Untersuchung der Verwundungsmethoden (T77 und T78)

VERSUCHSNUMMERN T77 UND T78				
Verwundungsmethode	„Crushen“	Nadeln	Sechsteln	Dritteln
Segmente	360	360	240	360
GUS-positive Segmente	46	34	53	83
Effizienz	12,78%	9,44%	22,08%	23,06%

Tab. 32: Untersuchung zusätzlicher Verwundungsmethoden (T83 und T88)

VERSUCHSNUMMERN T83 UND T88				
Verwundungsmethode	Dritteln + Zerkratzt	Dritteln + Zerstoehen	Dreieck	Vierteln
Segmente	150	150	50	200
GUS-positive Segmente	52	46	6	12
Effizienz	34,67%	30,67%	12,00%	6,00%

c) Ko-Kulturdauer

Der Einfluss der Ko-Kulturdauer wurde zwischen 2 und 11 Tagen getestet. Blattsegmente mit GUS-positiven Zellen sind erstmalig nach 4 Tagen Ko-Kultur zu beobachten und ihre Anzahl nimmt mit jedem Tag Ko-Kultur zu. Ab dem 8. Tag stagniert die Erhöhung leicht und nimmt am 9. Tag sogar geringfügig ab (86,67% gegenüber 85,00%). Danach tritt eine nochmalige leichte Erhöhung bis auf 90% am 11. Tag ein (siehe Tab. 33). Als optimale Ko-Kulturdauer wurden 6 Tage gewählt. Mit 70,83% liegt diese zwar unter dem Höchstwert von 90% am 11. Tag, jedoch muss bei der Entscheidung der Einfluss der Agrobakterien miteinbezogen werden. Mit jedem Tag Ko-Kultur nimmt der Bakterienstress für die Explantate zu und die Möglichkeit einer Bakterienüberwucherung erhöht sich.

Tab. 33: Untersuchung der Ko-Kulturdauer (T85 und T89)

VERSUCHSNUMMERN T85 UND T89										
Ko-Kultur-dauer (Tage)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Segmente	120	120	120	120	120	120	120	120	120	60
GUS-positive Segmente	/	/	11	53	85	89	104	102	106	54
Effizienz in %	/	/	9,17	44,17	70,83	74,17	86,67	85,00	88,33	90,00

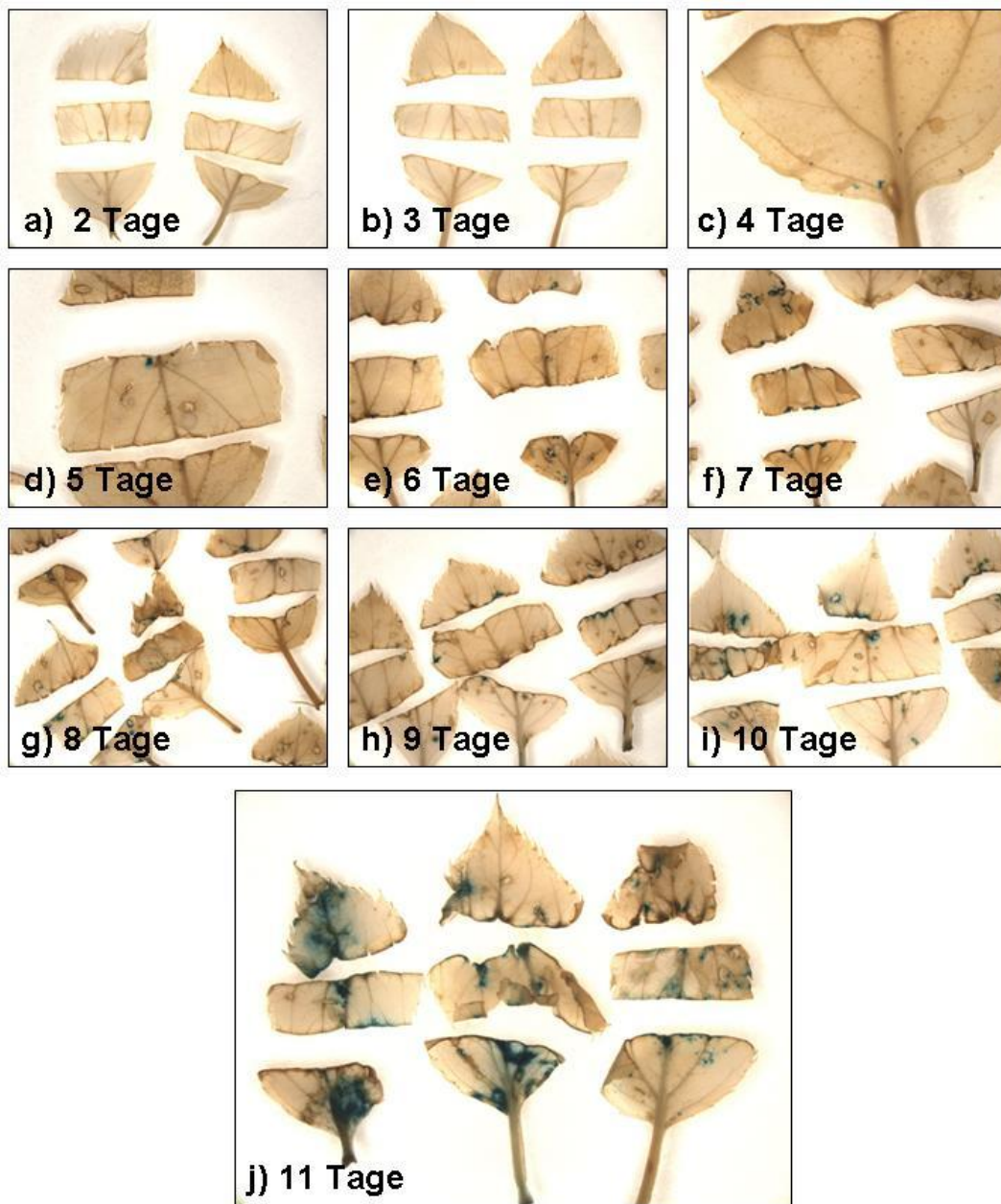


Abb. 26: Untersuchung der Ko-Kulturdauer (T85 und T89). GUS-Test der Blattsegmente der Transformation T85. Mit steigender Dauer der Ko-Kultur nimmt die Anzahl GUS-positiver Blattsegmente zu. Auch die Intensität der Blaufärbung erhöht sich im Laufe der Ko-Kulturdauer.

d) Optische Dichte

Der Einfluss der optischen Dichte des Inokulationsmediums auf die Anzahl GUS-positiver Segmente wurde untersucht. Dafür wurde die OD zwischen den Werten 0,3 und 0,9 in 0,2er Schritten getestet. Die optische Dichte korreliert nicht mit der Effizienz. Mit einer steigenden optischen Dichte nimmt die Anzahl der GUS-positiven Blattsegmente nicht zu (Tab. 34). Da die meisten GUS-positiven Segmente (42,50%) bei Transformationen mit einer optischen Dichte des Inokulationsmediums von 0,7 erreicht werden konnten, wurde dieser Wert als optimal eingestuft.

Tab. 34: Untersuchung der optischen Dichte (T82, T 84, T86 und T90)

VERSUCHSNUMMERN T82, T 84, T86 und T90					
OD	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9
Segmente	360	360	360	360	360
GUS-positive Segmente	65	103	53	153	98
Effizienz	18,06%	28,61%	14,72%	42,50%	27,22%

e) Inokulationsdauer

Um die Dauer der Inokulation zu optimieren, wurde die herkömmliche Zeit (20 Min, nach Bulley & James 2004) halbiert (10 Min), bzw. verdoppelt (40 Min). Der Unterschied zwischen einer 10-minütigen und einer 40-minütigen Inokulation ist sehr gering (41,94% gegenüber 37,22%, Tab. 35). Da die Transformation mit einer 20-minütigen Inokulation mit 52,22% die meisten GUS-positiven Segmente hervorbrachte, wurde dieser Wert beibehalten und als optimal eingestuft.

Tab. 35: Untersuchung der Inokulationsdauer (T92 und T93)

VERSUCHSNUMMERN T92 UND T93			
Inokulationsdauer (Min)	10	20	40
Segmente	360	360	360
GUS-positive Segmente	151	188	134
Effizienz	41,94%	52,22%	37,22%

f) Acetosyringon im Ko-Kulturmedium

Ein möglicher positiver Einfluss von Acetosyringon im Ko-Kulturmedium auf die Anzahl GUS-positiver Segmente wurde untersucht. Bei Transformationen mit 200 µM Acetosyringon im Ko-Kulturmedium wurden geringfügig mehr GUS-positive Segmente detektiert (39,79% gegenüber 39,58%, Tab. 36). Deswegen wurde ein Ko-Kulturmedium mit dem Agens als optimaler Parameter eingestuft.

Tab. 36: Untersuchung von Acetosyringon im Ko-Kulturmedium (T94 und T95)

VERSUCHSNUMMERN T94 UND T95		
Acetosyringon im Ko-Kulturmedium	ja	nein
Segmente	480	480
GUS-positive Segmente	191	190
Effizienz	39,79%	39,58%

g) Blattalter

Das Blattalter der Explantate wurde mit Blattexplantaten von 4 und 6 Wochen alten Sprossen getestet (T97 und T100 wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Elisabeth Bayer durchgeführt). Bei Transformationen mit Blattexplantaten von 4 Wochen alten Sprossen wurden mehr GUS-positive Segmente (34,26%, Tab. 37) erreicht, wodurch dieses Blattalter als optimalerer Parameter für eine Transformation festgelegt wurden.

Tab. 37: Untersuchung des Blattalters (T97 und T100)

VERSUCHSNUMMERN T96, T97 UND T100		
Blattalter (Wochen)	4	6
Segmente	540	540
GUS-positive Segmente	185	145
Effizienz	34,26%	26,85%

1.5.1 Übersicht der Ergebnisse der Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘A 14’

Die als optimal bewerteten Parameter für eine Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate von ‘A 14’ sind in Tabelle 38 ersichtlich:

Tab. 38: Ergebnisse der Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate von ‘A 14’

PARAMETER	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	ERGEBNIS
a)Vektor	pCambia1305.1/2305.1	pCambia1305.1
b)Verwundungsmethode	Crushen/Nadeln/Sechsteln/Dritteln	Dritteln
b)Verletzungsmethode verfeinert	Zerstechen/Zerkratzen/Dreieck/Vierteln	Zerkratzen
c)Ko-Kulturdauer	2-10 Tage	6 Tage
d)Optische Dichte	OD 0,1-0,9	OD 0,7
e)Inokulationsdauer	10, 20 oder 40 Minuten	20 Minuten
f)Acetosyringon	Zugabe im Ko-Kulturmedium ja/nein	ja
g)Blattalter	4 oder 6 Wochen	4 Wochen

1.6 Optimierung des Regenerationssystems und Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘A 14’

Anhand der ermittelten Parameter für eine Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate für die Apfelselektion ‘A 14’ (1.5) wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Elisabeth Bayer Transformationen mit dem Bakterienstamm **EHA105** und dem Vektorkonstrukt **pCambia1305.1** durchgeführt. Die **OD** der Bakterienkonzentration des Inokulationsmediums betrug **0,7**, die Blattexplantate wurden in Segmente **gedrittelt**, die **Ko-Kulturdauer** betrug **6 Tage** und es wurden **4 Wochen alte Blätter** als Explantate verwendet. Dem Ko-Kulturmedium wurde **Acetosyringon** hinzugegeben, die **Inokulation** betrug **20 Min** (siehe 1.5.1). Es wurde auf ein Selektionsantibiotikum im Medium verzichtet, da bei einer Selektion nicht-transgene Zellen absterben und eine toxische Umgebung im Medium entsteht. Dies wiederum würde eine ungünstige Voraussetzung zur Entwicklung der transgenen Zellen darstellen (siehe 1.4). Zur Überprüfung des zeitlichen Verlaufes GUS-positiver Zellen, wurde ein Teil der Explantate direkt nach der Ko-Kultur einem GUS-Test unterzogen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wurden weitere Teile der Blattexplantate in bestimmten zeitlichen Abständen auf GUS-positive Zellen untersucht (siehe Tab. 39). Es wurden zusätzliche Transformationen (T99/101) mit 6 Wochen altem Blattmaterial durchgeführt, um den Einfluss des Blattalters auf die **Regenerationseffizienz** zu untersuchen und diese zu optimieren. Zusätzlich wurde der Einfluss des Blattalters auf die Anzahl GUS-positiver Blattsegmente untersucht.

Tab. 39: Optimierung des Regenerationssystems und Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘A 14’

BLATTALTER	4 WOCHEN			6 WOCHEN			
Versuchsnummer	T103			T99/101			
Tage nach der Transformation	6 Tage	20 Tage	42 Tage	6 Tage	20 Tage	34 Tage	59 Tage
Getestete Segmentanzahl	37	23	840	74	45	62	1379
Getestete Regenerate	/	/	220	/	/	/	446
GUS-positive Segmente	16	17	/	29	35	39	/
Effizienz	43,24%	73,91%	/	39,19%	77,77%	62,90%	/
Regenerationseffizienz			26,19%				32,34%
GUS-positive Zellen	ja	ja	Ja (K/E)	Ja	Ja	Ja	Ja (K/E)

Einfluss des Blattalters auf die Anzahl GUS-positiver Segmente:

Eine GUS-Färbung direkt nach der Ko-Kultur zeigte bei Blattexplantaten von 4 Wochen alten *in vitro* Kulturen bei 43,24% der Segmente ein GUS-positives Signal, bei Blattexplantaten von 6 Wochen alten *in vitro* Kulturen waren 39,19% der Segmente GUS-positiv. 20 Tage nach der Transformation erhöhte sich der Anteil GUS-positiver Segmente bei Blattexplantaten von 4 Wochen alten Kulturen auf 73,91%, bei Blattexplantaten von 6 Wochen alten Kulturen auf 77,77% (Tab. 39). Zusätzlich wurde bei den Explantaten von 6 Wochen alten Kulturen ein GUS-Test nach 34 Tagen vollzogen, wodurch beobachtet werden konnte, dass der Anteil GUS-positiver Segmente auf 62,90% abfällt.

Einfluss des Blattalters auf die Regenerationseffizienz:

Transformationen von Blattexplantaten von 4 Wochen alten Kulturen erzielten eine **Regenerationseffizienz** von 26,19%. Bei Transformationen von Explantaten von 6 Wochen alten Kulturen lag diese bei 32,34% (Tab. 39).

Transgennachweis der Regenerate:

Bei Transformationen von Blattexplantaten von 4 und 6 Wochen alten Kulturen konnte ein abschließender GUS-Test der Regenerate GUS-positive Zellen im **Kallusgewebe (K)** und am **Explantat (E)** detektieren (Tab. 39 und Abb. 27)).

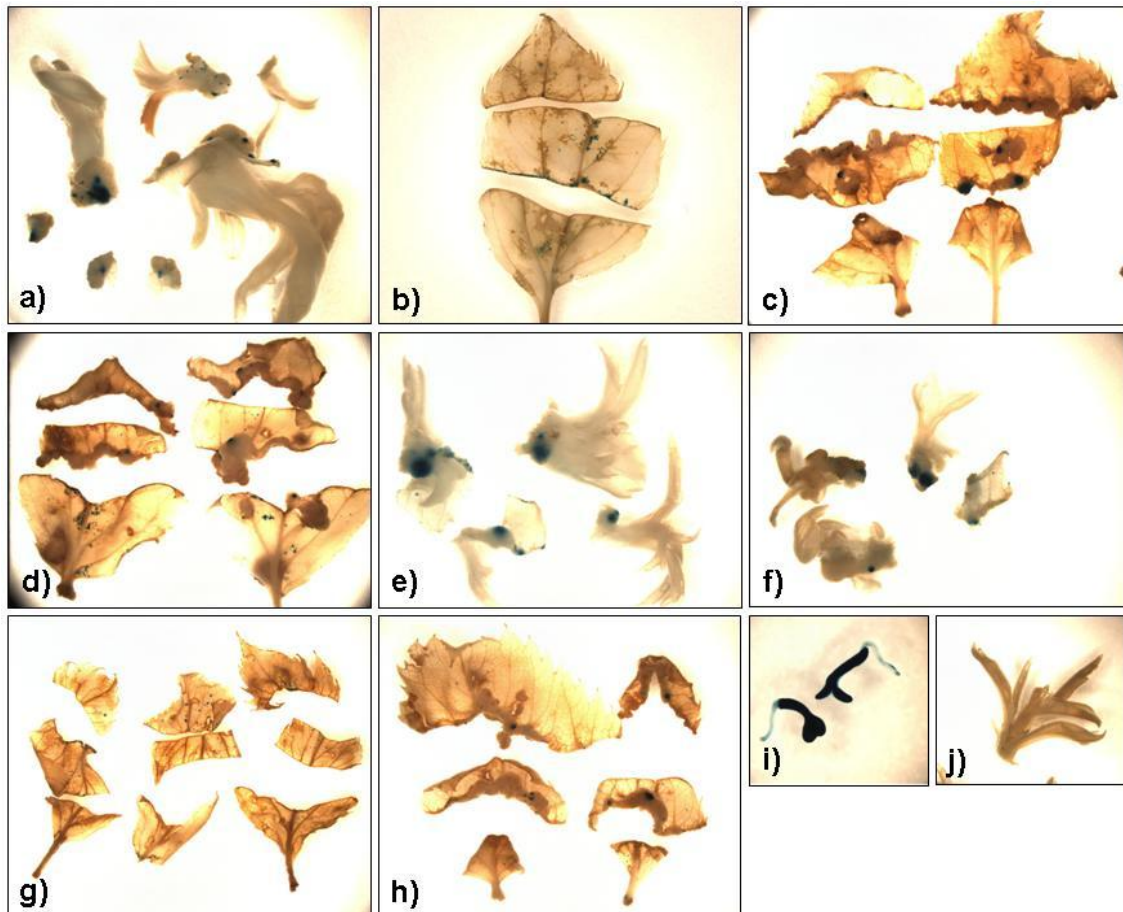


Abb. 27: GUS-Test der Transformationen T99/T101 und T103 ('A 14'). T99: GUS-positive Zellen an Kallus und Explantat nach 59 Tagen nach der Transformation (a). GUS-positive Zellen am Explantat nach 6 (b), 20 (c) und 34 (d) Tagen nach der Transformation. T101: GUS-positive Zellen an Kallus und Explantat nach 59 Tagen nach der Transformation (e). T103: GUS-positive Zellen am Kallus und Explantat nach 42 Tagen nach der Transformation (f). GUS-positive Zellen am Explantat nach 6 (g) und 20 (h) Tagen nach der Transformation. Positivkontrolle des GUS-Tests, Sämlinge von *Arabidopsis thaliana* (i) und Negativkontrolle, untransformierter Spross (j). Die Vergrößerungen betragen 7,11x. Bei b) beträgt die Vergrößerung 11,3x, bei j) 36,8x.

1.7 Optimierung des Regenerationssystems und Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelsorte ‘Jonagold’

Bei den Transformationsversuchen mit dem Genotyp ‘Jonagold’ wurde auf ein Selektionsantibiotikum im Medium verzichtet, da bei einer Selektion die nicht-transgenen Zellen absterben können und eine toxische, für die Entwicklung eventueller transgener Zellen ungünstige, Umgebung im Medium entstehen kann (siehe auch 1.4). Die **Ko-Kulturdauer** sollte bezüglich der **Regenerationseffizienz** und der **Anzahl GUS-positiver Blattexplantate** (siehe auch 1.5) optimiert werden und wurde mit **3** und **5 Tagen** untersucht. Es wurde mit dem Bakterienstamm **EHA105** und dem binären Vektorsystem **pCambia1305.1** transformiert. Sämtliche Versuche wurden mit einer **OD** des Inokulationsmediums von **0,5** durchgeführt. Als **Verwundungsmethode** wurden die Blattexplantate in Segmente **gedrittelt**. Zur Überprüfung des zeitlichen Verlaufes GUS-positiver Zellen wurde ein Teil der Explantate direkt nach der Ko-Kultur einem GUS-Test unterzogen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wurden weitere Teile der Blattexplantate in bestimmten zeitlichen Abständen auf GUS-positive Zellen untersucht. Ein abschließender GUS-Test der Regenerate konnte GUS-positive Stellen an Kalli (K), Regeneraten (R) und Explantaten (E) nachweisen (siehe Tab. 40 und Abb. 28). Transformationen T98 und T104 wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Elisabeth Bayer durchgeführt.

Tab. 40: Optimierung des Regenerationssystems und Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelsorte ‘Jonagold’

Versuchsnummer	T91/104			T98	
Ko-Kulturdauer	3 Tage			5 Tage	
Tage nach der Transformation	3 Tage	17 Tage	73 Tage	5 Tage	81 Tage
Getestete Segmentanzahl	37	23	1320	80	820
Getestete Regenerate	/	/	825	/	197
GUS-positive Segmente	0	10	/	62	/
Effizienz	0%	43,48%	/	77,50%	/
Regenerationseffizienz	/	/	62,50%	/	24,02%
GUS-positive Zellen	ja	ja	ja (K/R/E)	ja	ja (K/R/E)

Einfluss der **Ko-Kulturdauer** auf die **Anzahl GUS-positiver Segmente** und die **Regenerationseffizienz**:

GUS-Tests nach **3 Tagen Ko-Kultur** konnten an den untersuchten **Explantaten** keine GUS-positiven Signale nachweisen. Erst im Laufe der Kultur, nach 17 Tagen, hatten 43,48% der getesteten Segmente GUS-positive Bereiche. Die **Regenerationseffizienz** betrug 62,50%. Bei GUS-Tests nach **5 Tagen Ko-Kultur** betrug der Anteil getesteter **Explantate**, die GUS-positive Zellen aufwiesen, 77,50%. Die **Regenerationseffizienz** betrug 24,02% (Tab. 40).

Transgennachweis der Regenerate:

Bei einem abschließenden GUS-Test nach 73 bzw. 81 Tagen konnten sowohl bei Transformationen mit einer 3-tägigen, als auch bei Transformationen mit einer 5-tägigen Ko-Kulturdauer an den **Explantaten**, im **Kallusgewebe** und an den **Regeneraten** GUS-positive Zellen nachgewiesen werden. Die Transformationen mit 5-tägiger Ko-Kulturdauer (T98) brachte erstmals ein fast durchgängig GUS-positives Regenerat hervor (siehe Abb. 29 c), d) und e)).

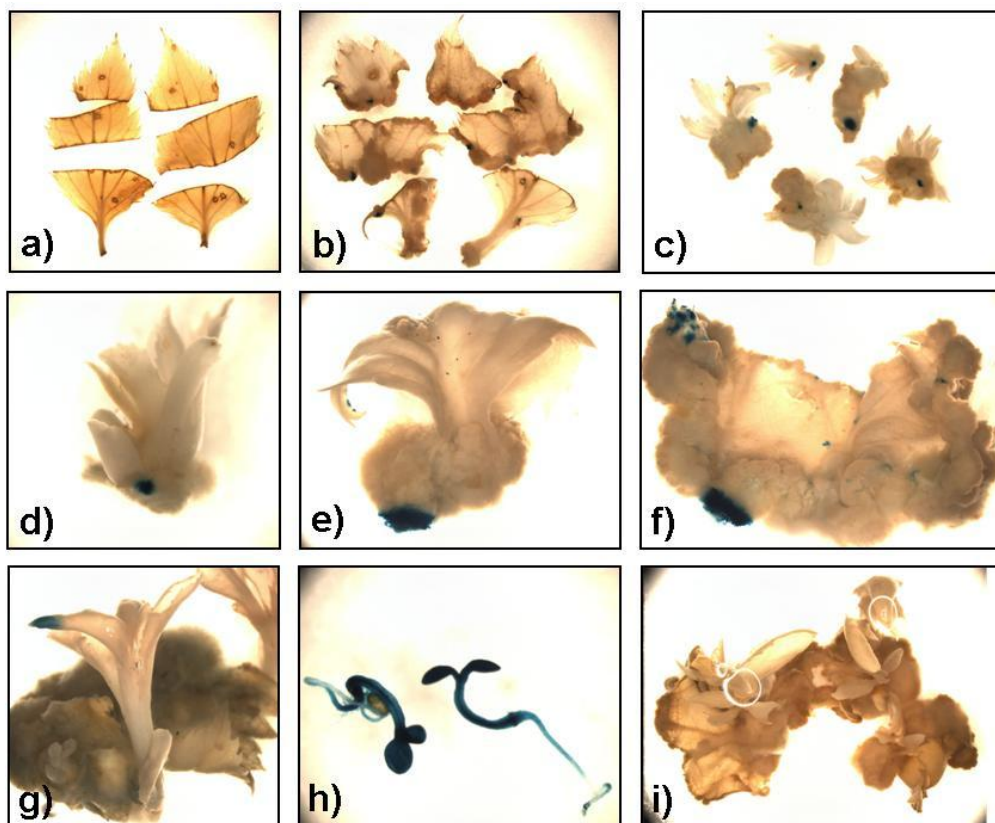


Abb. 28: GUS-Test der Transformationen der Sorte ‘Jonagold’ T91 und T104 (3 Tage Ko-Kultur). a) nach 3 Tagen Ko-Kultur konnten keine GUS-positiven Zellen an den Explantaten nachgewiesen werden (T104, Vergrößerung 7,1x). b) GUS-positive Zellen nach 17 Tagen Kultur (T104, Vergrößerung 7,1x). c) und d) GUS-positive Stellen im Kallus (T104, Vergrößerung 7,1x und 32,4x). e) GUS-positive Signale am Kallus und Explantat (T91, 17,3-fache Vergrößerung). f) GUS-positive Signale an Kallus, Explantat und Regenerat (T91, 10,5-fache Vergrößerung). g) GUS-positive Zellen an Regenerat (T91, 12,6-fache Vergrößerung). h) Sämlinge von *Arabidopsis thaliana* als Positivkontrolle des GUS-Tests (T104, 24,3-fache Vergrößerung) und i) Negativkontrolle, untransformiert (T91, 8,07-fache Vergrößerung).

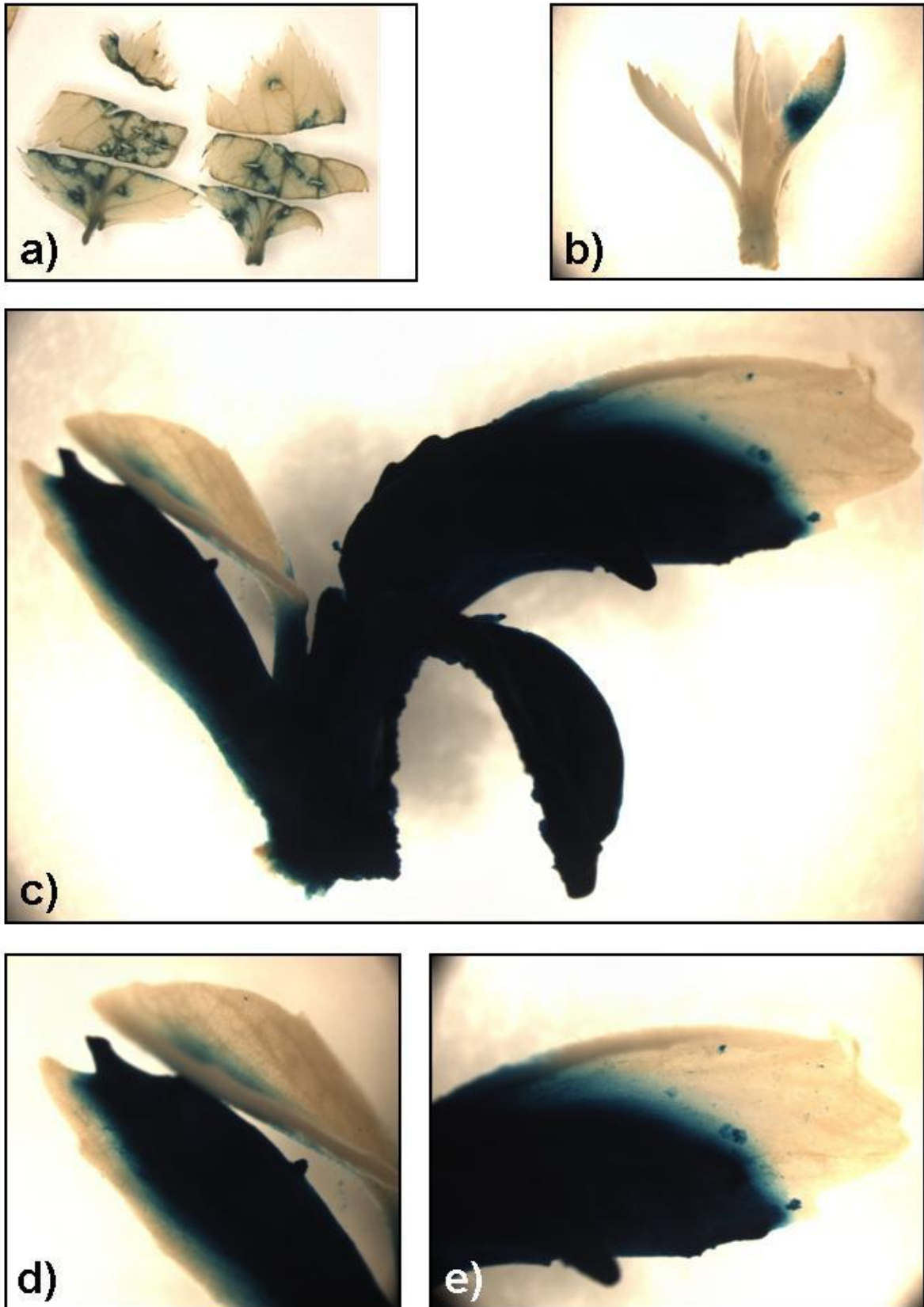


Abb. 29: GUS-Test der Transformation der Sorte 'Jonagold' T98 (5 Tage Ko-Kultur). a) nach 5 Tagen Ko-Kultur konnten GUS-positive Zellen an den Explantaten nachgewiesen werden (Vergrößerung 9,25x). b) GUS-positive Bereiche am Regenerat (15-fache Vergrößerung). c) Fast vollständig GUS-positives Regenerat (22,4-fache Vergrößerung). d) Ausschnitt des Regenerats mit 56,4-facher Vergrößerung, e) Ausschnitt mit 47,2-facher Vergrößerung.

2. Markeranalysen

2.1 Entwicklung neuer SSR Marker

Mit Hilfe der Sequenzdaten des veröffentlichten Genoms von ‘Golden Delicious’ (Velasco et al. 2010) wurden neue SSR Marker entwickelt, die mit dem Kolumnarwuchs kosegregieren. Sie wurden zunächst mittels BSA getestet und anschließend an Individuen aus Nachkommenschaften (siehe 2.3) überprüft (siehe auch Material und Methoden, 2.1, 2.2 und 2.4).

Es war möglich, drei Marker zu etablieren, die bei den untersuchten Nachkommenschaften zu 100% mit dem Kolumnarwuchs koppeln und eine kolumnarspezifische Bande amplifizieren: Marker **949_2 M1**, **256_1 M1** und **84_1 M1** (Tab. 41).

Im Anschluss an die BSA wurden die PCR-Produkte der Marker einer S1-Nuklease Verdauung unterzogen, um sicherzustellen, dass es sich bei der kolumnarspezifischen Bande nicht um ein unspezifisches Produkt handelt. Abbildung 30 b) zeigt, dass auch nach einem enzymatischen Verdau die kolumnarspezifische Bande amplifiziert wird. Die Banden, die auch nach dem S1-Verdau noch amplifiziert wurden, wurden sequenziert und mittels „Blast“-Suche eindeutig auf Chromosom 10 zugeordnet. Die Sequenzen befinden sich im elektronischen Anhang.

Tab. 41: Übersicht der drei neu entwickelten SSR Marker 949_2 M1, 256_1 M1 und 84_1 M1. Die kolumnarspezifische Bande (c) wurde gegenüber der nicht-kolumnaren Bande (nc) hervorgehoben.

MARKER	TYP	SEQUENZ	LAGE AUF CHR 10	PRODUKTGRÖßE
949_2 M1	SSR	For GGTCTTCACTAAGGTAACT Rev AACATGTCCCTTAACACACA	18,775 Mbp	235 bp (nc) 223 bp (c)
256_1 M1	SSR	For TATACTTGCGCACCCCCAGAT Rev CTCCCCTACCGACAGCCC	18,797 Mbp	289 bp (nc) 295 bp (c)
84_1 M1	SSR	For CAAGGACTCTTGCCTGGTTC Rev TGTGACAACTCAATCTGCCC	19,004 Mbp	144 bp (nc) 172 bp (nc) 160 bp (c)

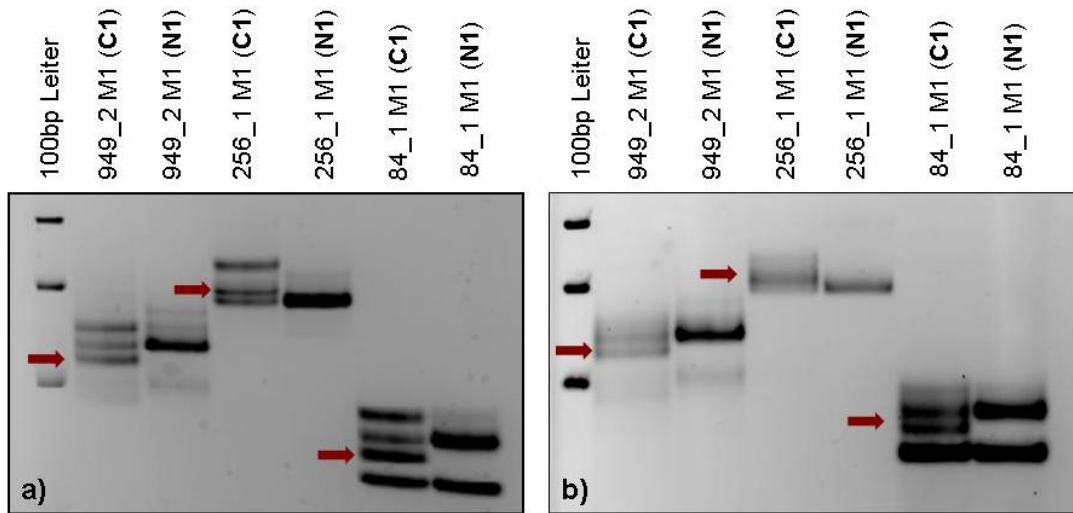


Abb. 30: Gelelektrophoresen der Marker 949_2 M1, 256_1 M1 und 84_1 M1. Getestet wurde die DNA des kolumnaren Pools C1 und des nicht-kolumnaren Pools N1 der Nachkommenschaft ‘A 14’ x ‘Procats’. Die kolumnarspezifische Bande wurde mit einem roten Pfeil markiert. a) zeigt die Amplifikate ohne vorherigen enzymatischen Verdau, b) zeigt das Bandenmuster nach einem S1-Verdau. Die kolumnarspezifische Bande bleibt auch nach der enzymatischen Behandlung bestehen.

2.2 Untersuchung der Marker von Bai et al. (2012)

Die von Bai et al. (2012) veröffentlichten Marker C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519 wurden anhand der unter 2.3 genannten Nachkommenschaften auf ihre Kopplungseigenschaften getestet. Dafür wurden sie zunächst an den DNA Pools C1 und N1 der Nachkommenschaft ‘A 14’ x ‘Procats’ getestet (siehe Material und Methoden, 2.2). Alle getesteten Marker von Bai et al. (2012) amplifizierten bei der erwarteten Bandengröße (siehe Tab. 19) die kolumnarspezifische Bande (Abb. 31).

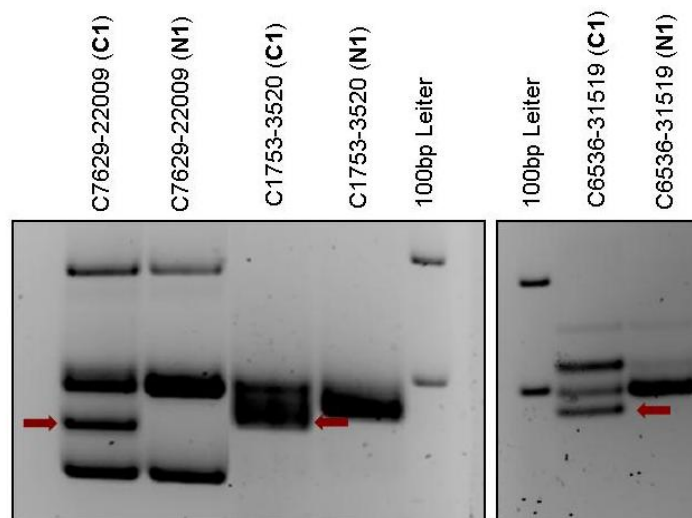


Abb. 31: Gelelektrophoresen der Marker von Bai et al. (2012) C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519. Getestet wurde die DNA des kolumnaren Pools C1 und des nicht-kolumnaren Pools N1 der Nachkommenschaft ‘A 14’ x ‘Procats’. Die kolumnarspezifische Bande wurde mit einem roten Pfeil markiert.

2.3 Untersuchung der Nachkommenschaften

Die DNA der Einzelindividuen aus den Nachkommenschaften wurde mit den drei neu entwickelten SSR Markern 949_2 M1, 256_1 M1 und 84_1 M1 und mit den von Bai et al. (2012) veröffentlichten Markern C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519 untersucht (siehe auch Material und Methoden, 2.1).

Dabei wurden mit dem Marker **C6536-31519** zwei Nachkommen mit Rekombinationsereignissen identifiziert (Tab. 42). Hierbei handelt es sich um die normalwüchsigen Bäume **5.86 N** ('Pomfital' x 'Wellant') und **16.12 N** ('A10-20' x 'Pinova'), welche von dem Marker C6536-31519 als kolumnar detektiert wurden (Abb. 32).

Die Gel- und Kapillarelektrophoresen der Marker 949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1, C1753-3520 und C7629-22009 detektierten die normalwüchsigen Bäume **16.12 N** und **5.86 N** als solche und bestätigten damit die Rekombinationsereignisse des Markers C6536-31519 (Abb. 33, Ergebnisse der Kapillarelektrophorese siehe elektronischer Anhang).

Tab. 42: Übersicht der Untersuchung der Individuen der Nachkommenschaften. Die neu entwickelten SSR Marker 949_2 M1, 256_1 M1 und 84_1 M1 sowie die von Bai et al. (2012) veröffentlichten Marker C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519 wurden an den Einzelindividuen der Nachkommenschaften getestet.

	MARKER					
	949_2 M1	256_1 M1	84_1 M1	C1753- 3520	C7629- 22009	C6536- 31519
Nachkommenschaften	Untersuchte Einzelindividuen					
'A 14' x 'Procats'	144	144	144	28	29	28
'Pomfital' x 'Wellant'	510	295	329	322	320	139
'A10-20' x 'Pinova'	341	/	/	/	65	157
Insgesamt	995	439	473	350	414	324
Rekombinante	0	0	0	0	0	2

Des Weiteren war bei der Untersuchung der Individuen der Nachkommenschaften bei dem Baum **15.67 C** ('A10-20' x 'Pinova') eine Auffälligkeit zu beobachten. Bei der DNA des kolumnaren Baumes 15.67 C konnte zwar mit allen getesteten Markern die kolumnarspezifische Bande detektiert werden, jedoch wurde ein anderes Bandenmuster amplifiziert als bei allen anderen kolumnaren Bäumen derselben Nachkommenschaft (z.B.: Baum 15.62 C, Abb. 32 und Abb. 33). Die kolumnarspezifische Bande des Baumes 15.67 C, die mit den Markern 949_2 M1 und C6536-31519 amplifiziert wurde, wurde sequenziert und eindeutig auf Chromosom 10 zugeordnet. Als Referenzbanden dienten die kolumnarspezifische Bande des Baumes 15.62 C und die nicht-kolumnare Bande (die Bande, die für den nicht-kolumnaren Phänotyp spezifisch ist) des Baumes 5.86 N. Für den Marker 949_2 M1 diente zusätzlich die kolumnarspezifische Bande des kolumnaren Baumes 15.45 N als Referenz. Die Sequenzen sind im elektronischen Anhang aufgeführt.

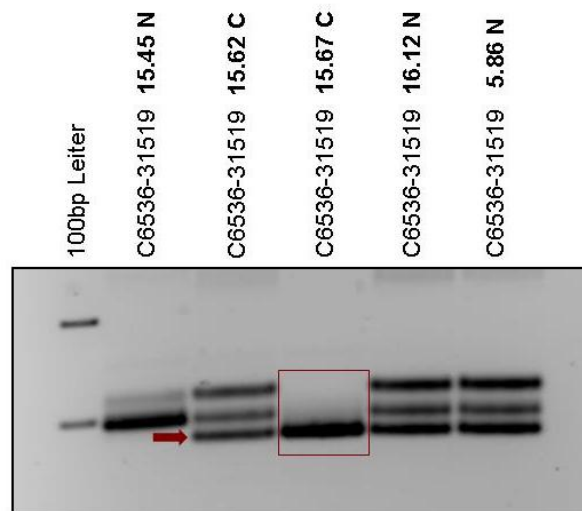


Abb. 32: Gelelektrophorese des Markers C6536-31519 (Bai et al. 2012). Bei den untersuchten Bäumen handelt es sich um die Individuen **15.45 N**, **15.62 C**, **15.67 N**, **16.12 N** ('A10-20' x 'Pinova') und **5.86 N** ('Pomfital' x 'Wellant'). Die kolumnarspezifische Bande ist mit einem roten Pfeil markiert. Bei den normalwüchsigen Individuen 16.12 N und 5.86 N traten Rekombinationsereignisse auf, d.h. sie wurden von dem Marker C6536-31519 als kolumnar detektiert. Bei dem kolumnaren Baum 15.76 C (rot umrahmt) konnte zwar die kolumnarspezifische Bande detektiert werden, jedoch unterscheidet er sich in seinem Bandenmuster von anderen kolumnaren Individuen aus derselben Nachkommenschaft, z.B.: 15.62 C.

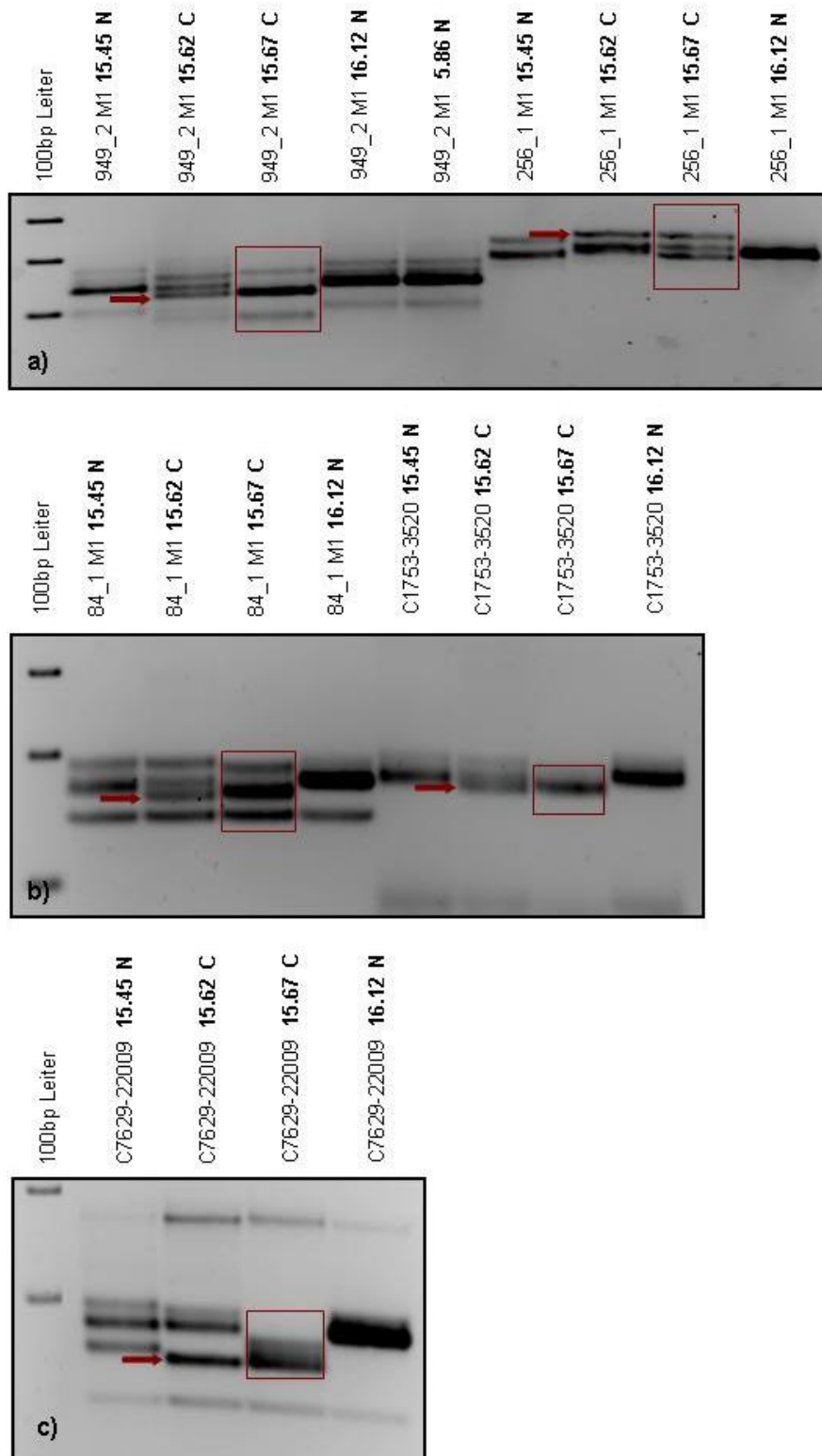


Abb. 33: Gelelektrophoresen der Marker 949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1, C1753-3520 und C7629-22009. Die kolumnarspezifische Bande ist mit einem roten Pfeil markiert. Bei den untersuchten Bäumen handelt es sich um die Individuen 15.45 N, 15.62 C, 15.67 N und 16.12 N ('A10-20' x 'Pinova'). Die DNA dieser Bäume wurde mit den Markern 949_2 M1, 256_1 M1 (a), 84_1 M1, C1753-3520 (b) und C7629-22009 (c) getestet. Mit dem Marker 949_2 M1 (a) wurde zusätzlich ein Baum aus der Nachkommenschaft 'Pomfital' x 'Wellant' getestet: 5.86 N. Die normalwüchsigen Bäume 16.12 N und 5.86 N wurden von allen getesteten Markern als normalwüchsig detektiert. Bei dem kolumnaren Baum 15.76 C (rot umrahmt) konnte zwar mit allen untersuchten Markern die kolumnarspezifische Bande detektiert werden, jedoch unterscheidet er sich in seinem Bandenmuster von anderen kolumnaren Individuen aus derselben Nachkommenschaft (z.B.: 15.62 C).

2.4 Untersuchung der Apfelselektionen und Sorten

Neben den Individuen der Nachkommenschaften wurde die DNA von 23 Apfelselektionen und Sorten (siehe Tab. 43) mit den neu entwickelten SSR Markern 949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1 und den Markern C1753-3520, C7629-22009, C6536-31519 (Bai et al. 2012) bezüglich des Wuchstypes der Bäume untersucht. Die Ergebnisse der Sorten 'McIntosh Wjck', 'McIntosh', 'Topaz', 'Golden Delicious' und der Selektion 'A73-19-97K', welche homozygot das *co*-Gen trägt, wurden mittels Kapillarelektrophorese gewonnen (Qiaxcel, elektronischer Anhang). Die restlichen Sorten wurden mit den Markern 949_2 M1 und C6536-31519 ebenfalls mittels Kapillarelektrophorese und mit den Markern 256_1 M1, 84_1 M1, C1753-3520 und C7629-22009 mittels Gelelektrophorese (siehe Abb. 34) untersucht. Alle Marker amplifizierten bei den normalwüchsigen Sorten 'Topaz' und 'McIntosh' ein kolumnares Bandenmuster. Marker 949_2 M1 und C6536-31519 detektierten die restlichen Sorten entsprechend ihres Phänotyps (Tab. 43). Marker 256_1 M1 detektierte die normalwüchsige Sorte 'Gala' als kolumnar. Marker 84_1 M1 und C7629-22009 konnten den Phänotyp der Sorten 'Pinova' (normalwüchsig) und 'Cordia' (kolumnar) nicht zuordnen. Marker C1753-3520 detektierte bei der kolumnaren Apfelselektion 'A68/173' nicht die kolumnarspezifische Bande (siehe Abb. 34).

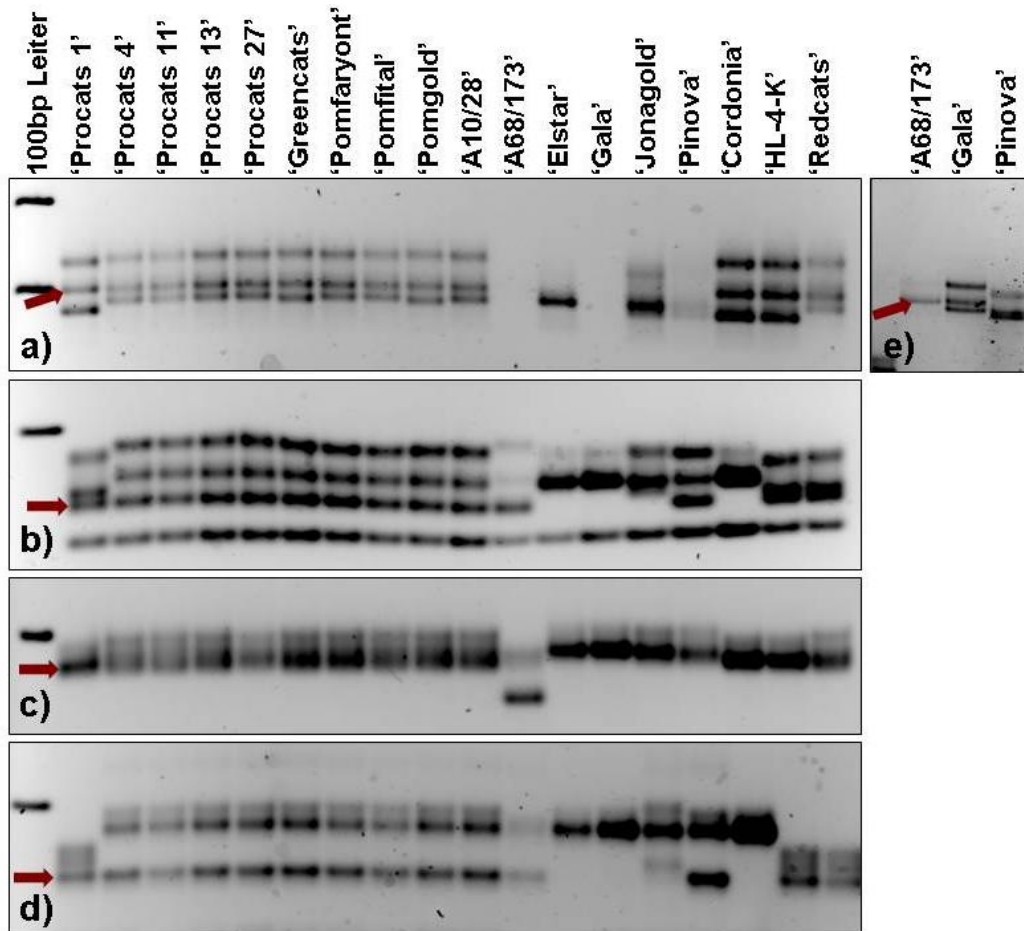


Abb. 34: Gelelektrophoresen der Marker 256_1 M1 a) und e), 84_1 M1 b), C1753-3520 c) und C7629-22009 d). Es wurde die DNA der Apfelselektionen und Sorten 'Procats 1', 'Procats 4', 'Procats 11', 'Procats 13', 'Procats 27', 'Greencats', 'Pomfaryont', 'Pomfital', 'Pomgold', 'A10/28', 'A68/173', 'Elstar', 'Gala', 'Jonagold', 'Cordia', 'HL-4-K' und 'Redcats' getestet. e) Marker 256_1 M1 detektierte bei der normalwüchsigen Sorte 'Gala' die kolumnarspezifische Bande (roter Pfeil). b) Marker 84_1 M1 und d) Marker C7629-22009 konnten den Phänotyp der Sorten 'Pinova' (nicht-kolumnar) und 'Cordia' (kolumnar) nicht zuordnen. c) Marker C1753-3520 konnte bei der kolumnaren Apfelselektion 'A68/173' nicht die kolumnarspezifische Bande detektieren.

Tab. 43: Untersuchung der Apfelselektionen und Sorten mit den Markern 949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1, C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519. Der Phänotyp der Selektionen und Sorten wurde von den untersuchten Markern als kolumnar (c) oder nicht-kolumnar (nc) detektiert. Der Wuchsform entsprechende Detektionen sind grün, nicht entsprechende Detektionen rot angegeben.

		MARKER					
		949_2 M1	256_1 M1	84_1 M1	C1753- 3520	C7629- 22009	C6536- 31519
Sorte/Selektion	Phänotyp						
'McIntosh Wijcik'	c	c	c	c	c	c	c
'A73-19-97K'	c	c	c	c	c	c	c
'McIntosh'	nc	c	c	c	c	c	c
'Topaz'	nc	c	c	c	c	c	c
'Golden Delicious'	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
'Procats 1'	c	c	c	c	c	c	c
'Procats 4'	c	c	c	c	c	c	c
'Procats 11'	c	c	c	c	c	c	c
'Procats 13'	c	c	c	c	c	c	c
'Procats 27'	c	c	c	c	c	c	c
'Greencats'	c	c	c	c	c	c	c
'Pomfaryont'	c	c	c	c	c	c	c
'Pomfital'	c	c	c	c	c	c	c
'Pomgold'	c	c	c	c	c	c	c
'A10/28'	c	c	c	c	c	c	c
'A68/173'	c	c	c	c	nc	c	c
'Elstar'	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
'Gala'	nc	nc	c	nc	nc	nc	nc
'Jonagold'	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
'Pinova'	nc	nc	nc	c	nc	c	nc
'Cordonia'	c	c	c	nc	c	nc	c
'HL-4-K'	c	c	c	c	c	c	c
'Redcats'	c	c	c	c	c	c	c

2.4.1 Untersuchung der Apfelsorte ‘Topaz’

Da bei Gelelektrophoresen aller getesteten Markern bei der normalwüchsigen Sorte ‘Topaz’ die kolumnarspezifische Bande amplifiziert wurde, wurde die DNA vier verschiedener Bäume dieser Sorte mit den Markern 949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1, C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519 getestet. Alle untersuchten Marker amplifizierten bei der normalwüchsigen Sorte ‘Topaz’ ein kolumnares Bandenmuster (siehe Tab. 44 und Abb. 35). Der Baum 1 wurde mittels Gelelektrophorese getestet. Bäume 2, 3 und 4 wurden mittels Kapillarelektrophorese untersucht (Qiaxel, siehe elektronischer Anhang).

Tab. 44: Übersicht der Untersuchung der Sorte ‘Topaz’ mit den Markern 949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1, C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519. Der Phänotyp von ‘Topaz’ ist nicht-kolumnar (nc) und wurde von allen untersuchten Markern als kolumnar (c) detektiert.

‘TOPAZ’		MARKER					
		949_2 M1	256_1 M1	84_1 M1	C1753- 3520	C7629- 22009	C6536- 31519
Sorte	Phänotyp						
‘Topaz’ 1 (Wolf)	nc	c	c	c	c	c	c
‘Topaz’ 2 (GH)	nc	c	c	c	c	c	c
‘Topaz’ 3 (GH)	nc	c	c	c	c	c	c
‘Topaz’ 4 (GH)	nc	c	c	c	c	c	c

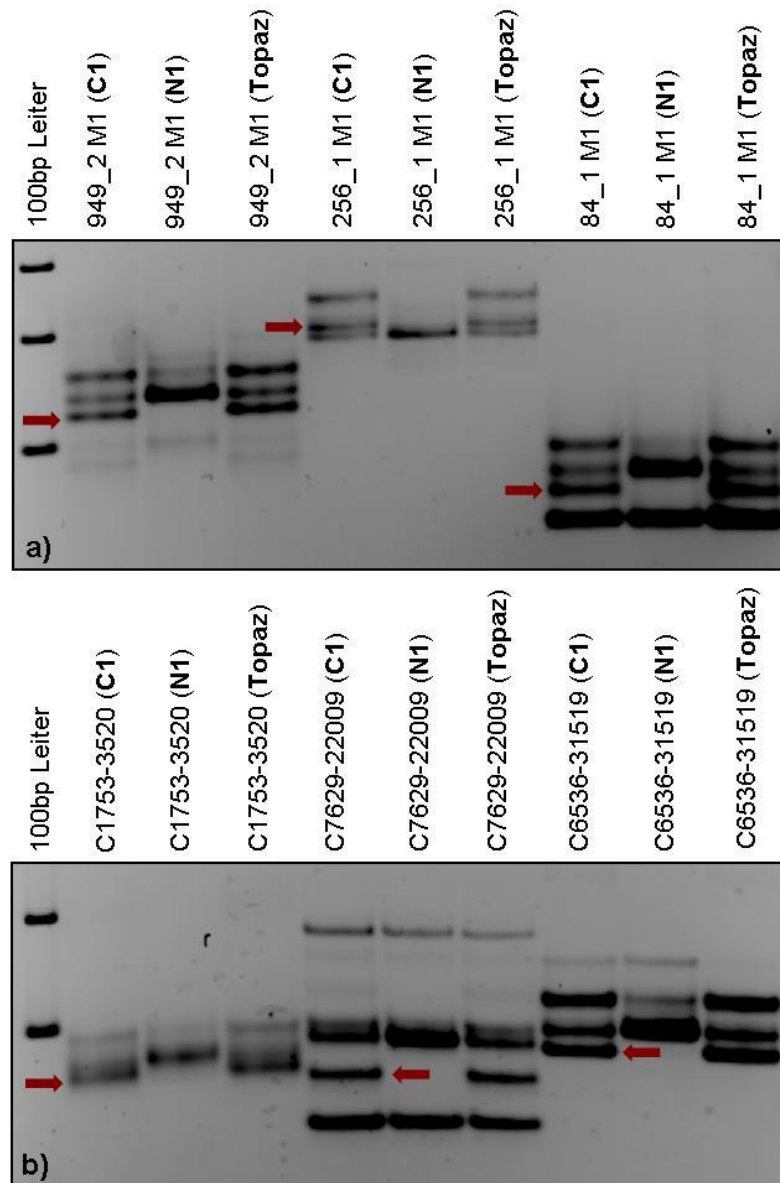


Abb. 35: Gelelektrophoresen der Marker 949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1, C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519 und der Sorte 'Topaz'. Die Marker wurden anhand der DNA Pools C1 und N1 der Nachkommenschaft 'A 14' x 'Procats' sowie der Sorte 'Topaz' getestet. Bei allen Markern wurde bei dem nicht-kolumnaren Baum 'Topaz' die kolumnarspezifische Bande (roter Pfeil) amplifiziert.

D Diskussion

1. Agrobakterien-vermittelte Transformation

Für die Apfelselektion 'A 14' sollte ein Agrobakterien-vermitteltes Transformationsprotokoll adaptiert werden. Das Hauptproblem einer Agrobakterien-vermittelten Transformation sind die niedrigen Transformationseffizienzen (James & Dandekar 1991). Der Apfel stellt dabei eine besonders schwer zu transformierende Spezies dar. Die zu erwartende Transformationsrate ist mit 0,2-15% sehr niedrig (Aldwinckle & Malnoy 2009). Es wurde nach dem Protokoll von Bulley und James (2004) gearbeitet und verschiedene Parameter der Transformation (**Antioxidantien, Bakterien und Vektoren, Ko-Kulturdauer und Verwundungsmethode**) variiert, um einen möglichen positiven Einfluss auf die **Transformationseffizienz** zu untersuchen (siehe Ergebnisse, 1.3). Die im Rahmen von Transformationsversuchen erzeugten Regenerate wurden je nach Vektorkonstrukt mikroskopisch auf eGFP-Fluoreszenz bzw. mittels GUS-Test bezüglich ihrer Transgenität untersucht. Zusätzlich wurde von ausgewählten Regeneraten die DNA bezüglich Insertion der transformierten Gene mittels PCR untersucht. Es konnte dabei keine eGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden, der GUS-Test fiel ebenfalls negativ aus. Da auch molekulargenetisch keine Transgenität an den untersuchten Regeneraten festgestellt werden konnte, handelte es sich bei allen untersuchten Regeneraten um „**Escapes**“. Die Bildung von „Escapes“ stellt bei der Transformation des Apfels eine sehr häufige Erscheinung dar. James et al. (1989) berichteten von einer „Escape“ Regeneration in Höhe von 40-95%, in Bezug auf alle erhaltenen Regenerate einer Transformation. Dies weist auf die Notwendigkeit eines stringenten Selektionssystems hin.

Unter selektiven Bedingungen im Medium sterben aber nicht-transgene Zellen ab und schaffen eine toxische Umgebung. In dieser ist es für wenige, eventuell transgene Zellen sehr schwer zu überleben. Daher wurde bei folgenden Transformationsversuchen auf ein Selektionsantibiotikum im Selektionsmedium verzichtet. Die Auswertung der Regenerate stellt sich dabei zwar als sehr umfangreich dar, gibt aber einen genauen Aufschluss über sämtliche Transformationsereignisse und **Transgenität**. Des Weiteren wurde bei diesen Transformationsversuchen das Regenerationssystem optimiert. Eine der wichtigsten Voraussetzungen für ein erfolgreiches Agrobakterien-vermitteltes Transformationssystem beim Apfel ist die Erhöhung der **Regenerationseffizienz** (Klee & Rogers 1989). Um diese zu

optimieren, wurden die Genotypen ‘A 14’ und ‘Procats’ transformiert und dabei verschiedene Parameter variiert (**Antioxidantien, Bakterien und Vektoren, Ko-Kulturdauer** und **Verwundungsmethode**, für die Apfelselektion ‘A 14’ zusätzlich der **Explantattyp**). Anschließend wurde der Einfluss der Parameter auf die Regenerationseffizienz untersucht (siehe Ergebnisse, 1.4).

Bei der Optimierung der Regenerationseffizienz des Genotyps ‘A 14’ unter Transformationsbedingungen, gelang es mit dem Stamm EHA105 und dem Vektor pCambia1305.1 GUS-positive Zellen an Explantat und Kalli zu erzeugen (siehe Ergebnisse 1.4.1). Ausgehend von diesen ermittelten GUS-positiven Zellen war es Ziel, die Anzahl GUS-positiver Blattexplantate deutlich zu optimieren, um die Wahrscheinlichkeit transgener Ereignisse an den Regeneraten zu erhöhen. Dazu wurden die einzelnen Parameter (**Vektor, Verwundung, Ko-Kultur, OD, Inokulationsdauer, Acetosyringon** und **Blattalter**) einer Transformation variiert und deren Einfluss auf die Anzahl GUS-positiver Blattexplantate untersucht (siehe Ergebnisse, 1.5)

Anhand der ermittelten Parameter für die Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate für ‘A 14’ wurden Transformationen durchgeführt (siehe Ergebnisse, 1.6). Da die Regeneration von transformierten Pflanzen schwierig und abhängig vom Genotypen ist (Maximova et al. 1998), wurde zusätzlich die Sorte ‘Jonagold’ nach dem Protokoll von Viss et al. (2003) transformiert (siehe Ergebnisse 1.7). Bei den Transformationen mit ‘A 14’ und ‘Jonagold’ wurde auf ein Selektionsagens verzichtet und verschiedene Parameter (Blattalter für ‘A 14’, Ko-Kulturdauer für ‘Jonagold’) variiert, um die **Regenerationseffizienz** zu optimieren und um zusätzlich ein möglichst hohen Anteil **GUS-positiver Blattexplantate** zu erreichen. Die Explantate wurden im Verlauf der Kultivierung und die erzielten Regenerate auf ihre **Transgenität** untersucht. Bei der Apfelselektion ‘A 14’ gelang es, GUS-positive Stellen an Kallus und Explantaten, bei der Sorte ‘Jonagold’ zusätzlich an den Regeneraten, zu erzeugen (siehe Tab. 39 und Tab. 40)

Des Weiteren wurde der Chromosomensatz der Apfelselektion ‘Procats’ (diploid) und der Sorte ‘Jonagold’ (triploid) mittels Flowzytometrie ermittelt (siehe Ergebnisse, 1.1), da es bei der Agrobakterien-vermittelten Transformation zu Abweichungen des Chromosomensatzes der Regenerate kommen kann. Sedira (2006) konnte bei einer transgenen Linie der diploiden Apfelsorte ‘Jork 9’ nachweisen, dass aufgrund polysomatischer Explantate der Chromosomensatz der Regenerate tetraploid war. Um eine Aussage über eine mögliche Polysomie der Explantate und etwaiger Transformanden zu treffen, ist es daher wünschenswert, den ursprünglichen Chromosomensatz zu kennen.

1.1 Einfluss der Parameter einer Transformation

Im Folgenden werden die verschiedenen getesteten Parameter einer Transformation und deren möglicher Einfluss auf die **Transformationseffizienz** (siehe Ergebnisse, 1.3) und auf die **Anzahl GUS-positiver Blattexplantate** (siehe Ergebnisse, 1.5) der Apfelselektion ‘A 14’ diskutiert. Der Einfluss der Parameter auf die **Regenerationseffizienz** von ‘A 14’ und ‘Procats’ (siehe Ergebnisse, 1.4) wird ebenfalls beschrieben. Zusätzlich wird der Einfluss der Parameter auf die **Transgenität** der Regenerate diskutiert, die bei der Optimierung der Regenerationssysteme und Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘A 14’ (Ergebnisse, 1.4 und 1.6) und ‘Jonagold’ (siehe Ergebnisse, 1.7) erhalten wurden.

1.1.1 Bakterienstamm und Vektoren

Als ein wichtiger Parameter stellt sich der zur Transformation verwendete **Bakterienstamm** dar. Für die Gattung *Malus* wird der *A. tumefaciens* Stamm LBA4404 in 50% der veröffentlichten Transformationsprotokolle verwendet und ist damit der gebräuchlichste Bakterienstamm. Danach folgen die Stämme EHA105, EHA101, AGLO, GV3101, CBE31, MP90 und C58C1 (Aldwinckle & Malnoy 2009). Ein möglicher positiver Einfluss der Bakterienstämme auf die **Transformationseffizienz** von ‘A 14’ wurde weder bei Transformationen mit den Bakterienstämmen LBA4404, noch mit dem hypervirulenten Stamm EHA105 beobachtet, da bei sämtlichen Transformationen keine Transformanden erzielt werden konnten (siehe Ergebnisse, 1.3). Die Auswahl des richtigen **Vektorsystems** scheint von großer Bedeutung zu sein. Bei der **Optimierung des Regenerationssystems** unter Transformationsbedingungen für ‘A 14’ konnten ausschließlich bei Transformationen mit dem Vektor pCambia1305.1 transgene Stellen am Kallus und am Explantat nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse, 1.4.1). Dies war unabhängig von anderen Parametern (Kokulturdauer und Verwundung) der einzelnen Transformationen (siehe Tab. 28). Bei der Transformation mit dem Vektor pCambia2305.1 wurden allerdings die höchsten **Regenerationseffizienzen** erreicht, im Vergleich zu Transformationen mit den Vektoren pCambia1301 und pCambia1305.1 (siehe Ergebnisse 1.4.1, b). Dies zeigt, dass hohe Regenerationseffizienzen nicht unbedingt zu transgenen Ereignissen führen müssen. Bei der Optimierung der **Anzahl GUS-positiver Blattexplantate** unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘A 14’ konnten ausschließlich mit dem Vektor pCambia1305.1 GUS-positiv Blattsegmente erzielt werden. Mit dem Vektor pCambia2305.1 dagegen, konnten

unter denselben Transformationsbedingungen keine GUS-positiven Blattexplantate beobachtet werden (siehe Ergebnisse, 1.5). Um auszuschließen, dass der Vektor nicht funktionsfähig ist, wurde eine Positivkontrolle durchgeführt und mit diesem Vektor erfolgreich Tabak transformiert (Stoye 2012).

Bei der Optimierung des Regenerationssystems unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘**Procats**’ gelang es, bei Transformationen mit dem Stamm LBA4404 Regenerate zu erzeugen (siehe Ergebnisse, 1.4.2). Transgene Ereignisse konnten aber nicht nachgewiesen werden. Bei Transformationen des Genotyps ‘Procats’ mit dem Stamm EHA105 konnten keine Regenerate erzielt werden (siehe Tab. 29). Da aber auch die Kontrollen (untransformierte Blattsegmente) nicht regenerierten, ist davon auszugehen, dass die ausbleibende Regeneration nicht an dem hypervirulenten Stamm lag, sondern daran, dass die Apfelselektion ‘Procats’ generell die Eigenschaft verloren hatte, auf dem Medium Nr. 36 (Tab. 5) zu regenerieren. Durch die Medienbedingungen könnte sich der physiologische Status von ‘Procats’ sich dahingehend geändert haben, dass der Genotyp neue Bedingungen im Medium braucht, um zu regenerieren. Denkbar wäre, dass dies durch den hohen Cytokinengehalt im Medium und einer damit verbundenen Anreicherung des Hormons in der Pflanze ausgelöst wurde. Cytokine sind dafür bekannt, einen großen Einfluss auf die Physiologie von Pflanzen zu haben und können bei einer zu großen Anreicherung sogar Mutanten hervorbringen (Binns 1994).

Die ausbleibende Regeneration bei Blattexplantaten von ‘Procats’ macht die große Bedeutung eines gut funktionierenden Regenerationssystems als Voraussetzung für ein erfolgreiches Transformationssystem deutlich. Bei Transformationen anschließender Arbeiten des Genotyps ‘Procats’ wurde daher mit dem Regenerationsmedium Nr. 25 (Tab. 5) gearbeitet und erfolgreich Regenerate erzeugt (Stoye 2012). Eine Transgenität konnte an diesen Regeneraten aber nicht festgestellt werden (Schwan, unveröffentlicht).

1.1.2 Antioxidantien

Da bei den Transformationen der Apfelselektion ‘A 14’ mit dem Antioxidans Liponsäure in Ko-Kultur- und Selektionsmedien keine Transformanden erzeugt wurden, bestätigte sich ein förderlicher Einfluss von Antioxidantien auf die **Transformationseffizienz** von ‘A 14’ nicht (siehe Ergebnisse, 1.3). Da unter selektiven Bedingungen im Medium die nicht-transgenen Zellen absterben, ist es möglich, dass durch die erzeugte toxische Umgebung die wenigen transgenen Zellen ebenfalls absterben. Dan et al. (2009) stellten fest, dass Liponsäure sich steigernd auf die Transformationsrate bei Tomaten, Getreide, Baumwolle und Sojabohnen

auswirkt, indem das Antioxidans Nekrosen an transformierten Geweben reduziert und damit die Überlebensrate von transformierten Zellen steigert. Zusätzlich soll der Einsatz von Liponsäure die Differenzierung, Teilung und Regeneration der transformierten Zellen begünstigen. Ein positiver Einfluss von Antioxidantien auf die **Regenerationseffizienz** konnte für die Apfelselektion 'A 14' ebenfalls nicht bestätigt werden, da bei T7 beobachtet wurde, dass mit steigender Liponsäurekonzentration die Anzahl der Regenerate abnahm und das Wachstum der Sprosse sich verzögerte (siehe Abb. 17).

Eine Alternative zu Liponsäure könnte die Verwendung von Silbernitrat im Medium darstellen. Eine Zugabe von **Silbernitrat** (AgNO_3) in das Selektionsmedium erhöhte für die Apfelsorte 'Fuji' signifikant die Transformations- und Regenerationseffizienz, indem es die Ethylenproduktion erhöht, welche einen fördernden Einfluss auf Kallusbildung und Sprossregeneration hat. Bei der Sorte 'Gala' konnte durch Silbernitratzugabe lediglich die Regenerationseffizienz gesteigert werden (Seong et al. 2005).

1.1.3 Acetosyringon

Ein weiterer Parameter, der zur Verbesserung der Transformation beitragen kann, stellen Substanzen dar, die bei der Verwundung der Pflanzelle von ihr abgesondert werden (Phenole) und durch Aktivierung von *virA* die Virulenz der Bakterien erhöhen. Viele Pflanzen sind trotz der Synthese von phenolischen, *vir*-Gen-induzierenden Substanzen (Acetosyringon) schwer zu transformieren (Messens et al. 1990, Nam et al. 1997, Vijayachandra et al. 1995). Es gibt aber zahlreiche Protokolle, die die Zugabe von *vir*-Gen-induzierenden Komponenten für eine effiziente Transformation brauchen (Davis et al. 1991, Jacq et al. 1993, Shen et al. 1993). Costa et al. (2006) konnten bei der Mandel durch Zugabe von 150 μM Acetosyringon in das Ko-Kultur- und Selektionsmedium, sowie durch ein verbessertes Selektionsverfahren, die Transformationseffizienz um das 100-fache steigern. Dieser Effekt konnte in dieser Arbeit nur zum Teil bestätigt werden. Bei der Optimierung der **Anzahl GUS-positiver Blattexplantate** unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion 'A 14' konnte mit dem Agens im Ko-Kulturmedium nur ein leicht höherer Anteil GUS-positiver Blattsegmente (39,79%) gegenüber Transformationen ohne Acetosyringon (39,58%) festgestellt werden (siehe Ergebnisse, 1.5, Tab. 36). Auch führten Transformationen der Apfelselektion 'A 14' mit dem Agens im Medium (siehe Ergebnisse, 1.6) nicht zu transgenen Ereignissen am Regenerat. Dies deckt sich mit den Behauptungen von Ritchie et al. (1993). Sie stellten fest, dass eine zusätzliche Zugabe dieser Substanzen vor oder während der Ko-Kultur nicht die Transformationseffizienz steigerte.

1.1.4 Verwundungsmethoden

Da in der Literatur verschiedene **Verwundungsmethoden** der Explantate angegeben sind, wurde der Einfluss der Verwundungsmethode auf die **Transformationseffizienz** von ‘**A 14**’ untersucht (siehe Ergebnisse, 1.3). Dazu wurden die Blattexplantate entweder gedrittelt, genadelt, oder „gecrusht“. Letztere Methode sollte laut Norelli et al. (1996) die Transformationseffizienz beim Apfel erheblich steigern. Da bei den Transformationen keine Transformanden erzeugt wurden, kann dieser Befund nicht unterstützt werden. Bei der Untersuchung des Einflusses der Verwundungsmethode auf die **Anzahl GUS-positiver Blattexplantate** der Apfelselektion ‘**A 14**’ (siehe Ergebnisse, 1.5) zeigte sich ebenfalls, dass das „Crushen“ nach Norelli et al. (1996) sich nicht am effektivsten auf die Transformation der Blattexplantate auswirkt (Tab. 31). Allerdings sind die Ergebnisse von Norelli et al. (1996) nur zum Teil auf die Ergebnisse dieser Arbeit übertragbar. Norelli et al. (1996) untersuchten einen anderen Genotyp (‘Royal Gala’) und verwendeten ein anderes Vektorkonstrukt.

Als effektivste Verwundungsmethode erwies sich bei dieser Arbeit das Dritteln der Blätter nach Bulley und James (2004) (siehe Tab. 31). Durch zusätzliches Zerkratzen oder Zerstechen der Blattoberfläche und anschließendes Dritteln der Explantate konnte der Anteil GUS-positiver Segmente zwar gesteigert werden, jedoch reduzierte sich die Vitalität der Blattexplantate durch den zusätzlichen Verwundungsstress deutlich. Für eine erfolgreiche Transformation und Regeneration müssen aber die Explantate eine möglichst hohe Vitalität aufweisen. Bei der Untersuchung des Einflusses der Verwundungsmethode auf die **Regenerationseffizienz** von ‘**A 14**’ (siehe Ergebnisse, 1.4.1 d)) wurde festgestellt, dass bei Transformationen mit 2-tägiger Ko-Kultur die höchsten Regenerationseffizienzen erreicht werden konnten, wurde das Blattmaterial genadelt. Ein vorheriges Dippen des Nadelstempels stellte sich als reduzierend auf die Transformationseffizienz dar. Bei Transformationen mit 3-tägiger Ko-Kultur wurden die höchsten Regenerationseffizienzen erreicht, wurde das Blattmaterial „gecrusht“. Das zeigt, dass die Untersuchung eines Parameters in Abhängigkeit von weiteren Parametern stehen kann. Dadurch konnte abschließend nicht geklärt werden, welche Verwundungsmethode sich am effektivsten auf die Regenerationseffizienz auswirkt. Die Rolle der Verwundung der Explantate wird in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert. Zum einen soll die Verwundung der Explantate absolut notwendig sein, da sie eine Phenolausschüttung der Pflanzenzelle induziert. Durch die freigesetzten Phenole werden die Agrobakterien angelockt und die Produktion der *vir*-Gene aktiviert. Außerdem ermöglicht sie ein Eindringen der Bakterien in das Explantat. Bei Tabaksämlingen konnte allerdings beobachtet werden, dass auch ohne deren Verwundung eine *vir*-Gen Expression in den

Agrobakterien und eine Transformation stattfinden kann (Brencic et al. 2005, Escudero & Hohn 1997). Als Eintrittsmöglichkeit für die Agrobakterien könnte die Stomata dienen (Escudero & Hohn 1997). Diese Thesen stehen im Widerspruch zu McCullen und Binns (2006), welche die Verwundung und die Ausschüttung von Phenolen als essentiell für die *vir*-Gen Aktivierung deklarieren. Braun (1952) behauptete ebenso, dass die Zellteilung der verwundeten Explantatzellen eine essentielle Komponente der Wundantwort darstellt und somit für eine erfolgreiche Transformation notwendig ist. Anschließende Studien belegen, dass sich teilende Zellen effizienter transformieren lassen als sich nicht-teilende Zellen (Sangwan et al. 1992).

1.1.5 Explantattyp

Um den Einfluss des **Explantattypes** auf die **Regenerationseffizienz von 'A 14'** zu untersuchen, wurden fragmentierte Sprossspitzen transformiert und mit den Regenerationseffizienzen transformierter Blätter verglichen (siehe Ergebnisse, 1.4.1 e)). Bei den meisten Transformationen beim Apfel werden Blätter als Explantate verwendet. Wu et al. (2011) verwendeten jedoch fragmentierte Sprossspitzen. Neben einer hohen Kallus- und Sprossregeneration wurde eine Transformationseffizienz von 5,8% erreicht. Die Beobachtung der hohen Sprossregeneration konnte in dieser Arbeit bei Transformationen von fragmentierten Sprossspitzen ebenfalls gemacht werden. Die Regenerationseffizienz betrug zwischen 96,44% und 100% (T87/102 und T75, siehe Tab. 28). Wurden unter den gleichen Transformationsbedingungen Blätter als Explantate verwendet, konnten lediglich Regenerationseffizienzen von 9,47% bis 17,02% erreicht werden (T32/34/36 und T38/40, siehe Tab. 28). Ebenso konnte ein Einfluss des Explantattypes auf die **Transgenität** beobachtet werden. Wurden Sprossspitzen transformiert, konnten erstmals bei der Apfelselektion 'A 14', zusätzlich zu Kalli und Explantat, transgene Stellen auch am Regenerat nachgewiesen werden (siehe Tab. 28 und Abb. 22). Der durch Agrobakterien zu transformierende **Explantattyp** kann beispielsweise einen Einfluss auf das Ausmaß der T-DNA Integration haben. Grevelding et al. (1993) zeigten bei *Arabidopsis*, dass bei der Verwendung von Wurzeln als Explantate die T-DNA als „single copy“ vorliegt, bei der Verwendung von Blattexplantaten häufig eine „multicopy“ Integration festzustellen war. Mysore et al. (2001) fanden ebenso heraus, dass bei *Arabidopsis* die Wurzelexplantate nur schwer stabil zu transformieren waren, durch Blütenvakuuminfiltration eine stabile Transformation jedoch leicht umzusetzen war.

1.1.6 Blattalter

Um den Einfluss des **Blattalters** zu untersuchen, wurden Blattexplantate von 4 und 6 Wochen alten Sprossen transformiert. Das Alter der zu verwendenden Blattexplantate wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zhang et al. (2006) transformierten die jüngsten entfalteten Blätter 6 Wochen alter Kulturen. Laut De Bondt et al. (1996) beträgt ein optimaleres Blattalter 4 Wochen. Auch Sriskandarajah et al. (1994) verwendeten 4 Wochen alte, vollständig entfaltete Blätter. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Blattalters auf die **Anzahl GUS-positiver Blattexplantate** unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘A 14’ untersucht (siehe Ergebnisse, 1.5). Transformationen von 4 Wochen alten Blattexplantaten erreichten einen höheren Anteil GUS-positiver Blattexplantate (34,26%), als Transformationen von 6 Wochen alten Blattexplantaten (26,85%, siehe Tab. 37). Bei der Optimierung des Regenerationssystems und Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion ‘A 14’ (siehe Ergebnisse 1.6, Tab. 39) konnte gezeigt werden, dass sich der Anteil der Blattexplantate mit GUS-positiven Zellen zwischen den **Blattaltern** der Explantate nicht signifikant unterscheidet. Sowie direkt nach der Ko-Kultur (43,24% bei 4 Wochen alten Blattexplantaten, gegenüber 39,19% bei 6 Wochen alten Blattexplantaten), als auch im Verlauf der Kultivierung (73,91% bei 4 Wochen alten Blattexplantaten, gegenüber 77,77% bei 6 Wochen alten Blattexplantaten). Die **Regenerationseffizienz** war mit 32,34% bei Transformationen von Blattexplantaten von 6 Wochen alten Kulturen höher als bei Transformationen von Blattexplantaten von 4 Wochen alten Kulturen (26,19%, siehe Tab. 39). GUS-positive Stellen konnten lediglich an Kalli und Explantat erreicht werden, unabhängig vom Blattalter der verwendeten Explantate (siehe Abb. 27).

1.1.7 Ko-Kulturdauer

Die **Ko-Kulturdauer** stellt in der Agrobakterien-vermittelten Transformation einen kritischen Parameter dar. Sie muss lange genug andauern, um den Gentransfer zwischen Bakterien und Pflanzen zu gewährleisten. Andererseits muss sie so kurz wie möglich gewählt werden, um eine Überwucherung der Agrobakterien über das Pflanzenmaterial zu vermeiden. Ein Einfluss der Ko-Kulturdauer (2 bis 20 Tage) auf die **Transformationseffizienz** von ‘A 14’ konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da keine Transformanten erzeugt wurden (siehe Ergebnisse, 1.3). Um den Einfluss der Ko-Kulturdauer auf die **Regenerationseffizienz** von ‘A 14’ zu testen, wurde sie bei Transformationen von 2 auf 3 Tagen erhöht. Dabei konnten sowohl gesteigerte Regenerationseffizienzen als auch eine Reduktion der Regenerationseffizienz festgestellt werden (siehe Ergebnisse, 1.4.1 c)).

Bei der Untersuchung des Einflusses der Ko-Kulturdauer auf die **Anzahl GUS-positiver Blattexplantate** unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion 'A 14' konnte beobachtet werden, dass Blattexplantate erst nach 4 Tagen GUS-positive Stellen aufwiesen (siehe Ergebnisse, 1.5, Abb. 26). Bei einer Ko-Kulturdauer von 2 und 3 Tagen konnten keine transgenen Explantate erzielt werden (siehe Tab. 33). Dies steht im Gegensatz zu Yao et al. (1995). Sie stellten bei einer Ko-Kulturdauer von 2, 3, 4 und 5 Tagen keinen Unterschied auf den Gentransfer, d.h. auf die Anzahl GUS-positiver Blattexplantate, fest. Bei der Optimierung des Regenerationssystems und Optimierung der Anzahl GUS-positiver Blattexplantate für die Sorte 'Jonagold' (siehe Ergebnisse, 1.7) konnte beobachtet werden, dass nach 3-tägiger Ko-Kultur keine **GUS-positiven Blattexplantate** zu verzeichnen waren (siehe Tab. 40). Bei Transformationen dagegen mit einer 5-tägigen Ko-Kultur waren 77,50% der Blattexplantate GUS-positiv. Deswegen wurden weitere Blattexplantate der Transformation mit 3-tägiger Ko-Kultur im Verlauf der Kulturvierung (17 Tage nach der Inokulation) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass 43,48% der untersuchten Explantate GUS-positiv waren (siehe Tab. 40). Dies spricht dafür, dass auch nach dem Abtöten der Agrobakterien noch Bakterien an den Explantaten haften und die Transformation weiterhin stattfindet. Laut Janssen und Gardner (1990) stammt eine GUS-Aktivität nach 5 Tagen Ko-Kultur hauptsächlich von einer transienten Expression, eine GUS-Aktivität nach 21 Tagen dagegen sollte von einer stabilen Transformation stammen.

Eine Erhöhung der Ko-Kultur von 3 auf 5 Tage reduzierte die **Regenerationseffizienz** bei Transformationen von 'Jonagold' von 62,50% auf 24,02% (siehe Tab. 40). Sowohl bei Transformationen mit 3 Tagen Ko-Kultur, als auch bei Transformationen mit 5 Tagen Ko-Kultur, konnten transgene Stellen im Kallus, Explantat und Regenerat erreicht werden (siehe Abb. 28 und Abb. 29). Jedoch konnten bei der Transformation mit 5 Tagen Ko-Kultur ein fast komplett transgener Spross erzeugt werden. Wie schon unter 1.1.1 beschrieben, wird auch bei diesem Ergebnisse deutlich, dass eine höhere Regenerationseffizienz nicht unbedingt zu einem transgenen Ergebnis führen muss.

1.1.8 Medienkomponenten

In der Literatur werden weitere Parameter einer Transformation diskutiert, die einen möglichen kritischen Parameter in dem Transformationsprozess darstellen können. Ein viel diskutierter Parameter stellen die **Medienkomponenten** dar, wie beispielsweise der Zucker. Dieser Komponente wird eine große Bedeutung zugetragen, da eine Verwundung der Pflanzenzelle, zusätzlich zu der Phenolausschüttung und Induzierung eines niedrigen pH-

Wertes, eine **Zuckerausschüttung** auslöst (Baron & Zambryski 1995). Cangelosi et al. (1990) und Shimoda et al. (1990) messen einem den Medien zugegebenen Zucker eine zweifache Bedeutung zu. Zum einen wird das *virA/virG* System bei signifikant niedrigeren Phenolkonzentrationen aktiviert, zum anderen erhöht sich die maximale *vir*-Gen Induktion bei gesättigter Phenolkonzentration um das 5 bis 10-fache. Saccharose und Glukose sollen die besten Kohlenstoffquellen für eine Apfeltransformation darstellen. Fruktose und Galaktose üben dagegen einen nachteiligen Effekt auf die Transformation aus (De Bondt et al. 1994). Sorbit in Kombination mit Saccharose oder allein soll die Transformationseffizienz beim Apfel steigern (Borejsza-Wysocka et al. 1998, Caboni et al. 2000; Szankowski et al. 2009). Ein solcher positiver Effekt konnte bei der Transformation der Apfelselektion 'A 14' (siehe Ergebnisse, 1.3) nicht beobachtet werden, da Sorbit als Kohlenstoffquelle in den Ko-Kultur und Selektionsmedien verwendet wurde und keine Transformanden erzeugt wurden. Auch sind die Medienkomponenten und deren Beitrag für eine effiziente Transformation vom zu transformierenden Genotyp abhängig. De Bondt et al. (1996) fanden heraus, dass, wenn bei Transformationen der Apfelsorte 'Jonagold' als **Festigungsagens** Gelrite verwendet wurde, höhere Transformationseffizienzen erreicht wurden, als wenn das Medium mit Agar versehen wurde. Für die Apfelsorte 'Golden Delicious' dagegen, stellte sich Agar förderlicher für die Transformationseffizienz heraus (Sriskandarajah et al. 1994).

1.1.9 Temperatur

Laut Gelvin (2003) ist ein weiterer wichtiger Parameter für die Transformation, die **Temperatur** Labilität des bakteriellen Pilus (siehe Einleitung, 8. *Agrobacterium tumefaciens*). Obwohl die *vir*-Gen Induktion ihr Maximum bei 25°C bis 27°C erreicht (Alt-Moerbe et al. 1988), ist der Pilus einiger Agrobakterienstämme bei niedrigeren Temperaturen (18°C bis 20°C, Fullner & Nester 1996, Lai et al. 2000) stabiler. Baron et al. (2001) belegten dies unter anderem für den Bakterienstamm A281. Nach der Induktion der *vir*-Gene bildeten die Bakterien, die bei 28°C auf Agarplatten angezogen wurden, keine Pili. Die Bakterien, die bei 20°C kultiviert wurden, bildeten zahlreiche Pili. Da der Bakterienstamm EHA105 ein Derivat der Stammes A281 ist, wäre es folglich in Betracht zu ziehen, bei zukünftigen Versuchen die Ko-Kultur der Agrobakterien und der Pflanzenzellen bei niedrigeren Temperaturen als bisher (25°C) zu vollziehen.

1.1.10 Genotyp

Alle durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass der Erfolg einer Transformation von vielen verschiedenen Parametern und Faktoren abhängig ist. Das liegt vermutlich daran, dass eine Transformation immer ein Zusammenspiel aus vielen verschiedenen Parametern ist, die sich untereinander und damit den Erfolg einer Transformation beeinflussen. Auch ist die Bedeutung vieler Parameter nicht vollständig geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In dieser Arbeit hat sich als eine der wichtigsten Einflussgrößen der zu transformierende **Genotyp** herausgestellt. Die Effizienz der Regeneration und Transformation ist in hohem Maße von dem genetischen Hintergrund der zu transformierenden Pflanze abhängig (De Bondt et al. 1994, Norelli et al. 1996) und unterscheidet sich stark zwischen den Sorten (Yao et al. 1995). Die signifikanten Unterschiede in den Sorten sieht man beispielsweise in den verschiedenen Medienzusammensetzungen, die die einzelnen Genotypen für eine effiziente Regeneration benötigen. Die Medien für die einzelnen Genotypen unterscheiden sich signifikant in der Konzentration der verwendeten Hormone (siehe Tab. 6). Bei **'Procats'** ist das verwendete Auxin (NAA) mehr als zehn Mal so hoch konzentriert als bei **'A 14'**. Das verwendete Cytokinin (BA) ist mehr als drei Mal so hoch dosiert. Dies deckt sich auch mit den Behauptungen von Lane et al. (1982) und Sarwar et al. (1998), dass kolumnare Apfel *in vitro* Kulturen sehr gut hohe Dosen an Cytokinin tolerieren. Hohe Cytokininkonzentrationen werden auch für den Kolumnarwuchs verantwortlich gemacht (Looney & Lane 1983, Watanabe et al. 2004, Watanabe et al. 2006). Ein weiterer großer Einfluss des Genotyps sieht man daran, dass, wenn bei Transformationen der Apfelselektion 'A 14' Blattexplantate transformiert wurden, lediglich transgene Ereignisse an Explantat und Kallus hervorgerufen werden (siehe Ergebnisse, 1.6). Bei Transformationen der Sorte 'Jonagold' wurde dagegen ein fast vollständig transgener Spross regeneriert, welcher wenige, nicht-transgene Bereiche an den Blättern aufwies (siehe Ergebnisse, 1.7, Abb. 29).

1.2 Transgenität an Sprossregeneraten

Bei der Optimierung des Regenerationssystems unter Transformationsbedingungen für die Apfelselektion 'A 14' gelang es, GUS-positive Stellen an den Regeneraten zu erzeugen, wenn Sprossspitzen als Explantate verwendet wurden (siehe Ergebnisse, 1.4.1). Bei der Optimierung des Regenerationssystems unter Transformationsbedingungen für die Sorte

‘Jonagold’ gelang es, ein fast vollständig GUS-positives Regenerat zu erzeugen (siehe Ergebnisse, 1.7, Abb. 29). Eine molekulargenetische Untersuchung auf Insertion der Gene (*GUSPlus* und *Hyg*) war für die Regenerate beider Genotypen möglich. Allerdings konnten bei der Apfelselektion ‘A 14’ auch *virG* und *virD* nachgewiesen werden. Da diese Gene nur in den Agrobakterien vorkommen, lässt sich daraus schließen, dass an den untersuchten Regeneraten noch Bakterien hafteten. Dadurch kann die Herkunft von *GUSPlus* und *Hyg* sowohl pflanzlich als auch bakteriell sein. Um auszuschließen, dass die GUS-positiven Signale von einer **endogenen**, pflanzlichen **Glucuronidase** stammen, wurden parallel untransformierte Regenerate bzw. Explantate einem GUS-Test unterzogen. Diese wiesen keine GUS-positiven Signale auf (siehe Abb. 21, Abb. 22 und Abb. 29). Außerdem sollte bei dem pH-Wert (7,0) der verwendeten GUS-Färbelösung nur Signale der Glucuronidase aus *E. coli* detektiert werden. Diese bakterielle Glucuronidase hat ihr pH-Optimum bei 7,0, was im Kontrast zu dem saureren pH-Optimum der endogenen Glucuronidase steht (Jefferson 1987). Hodal et al. (1992) konnten histochemisch bei Weizen, Kartoffel, Rettisch, Raps, Zuckerrübe, Roggen und Apfel eine endogene Glucuronidaseaktivität nachweisen, betrug der pH-Wert der Färbelösung zwischen 4,5-5. Bei einem pH-Wert von 7,0 war dies nicht mehr möglich. Da aber nicht auszuschließen ist, dass die Vakuolensäfte der zu färbenden Objekte den pH-Wert der Färbelösung senken, wurde das Färbeprotokoll optimiert. Dazu wurde die Färbelösung auf 55°C erhitzt (siehe Material und Methoden, 1.6). Die Glucuronidase aus *E. coli* hat eine Halbwertszeit von 2 h bei 55°C (Jefferson 1987), wohingegen die Halbwertszeit der pflanzlichen Glucuronidase schon nach 10 Minuten bei 50°C erreicht wird (Alwen et al. 1992). Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei den GUS-positiven Stellen bei den Regeneraten von ‘A 14’ um transgene Pflanzenzellen handelt. Da bei den Regeneraten von ‘Jonagold’ *virG* und *virD* nicht molekulargenetisch nachgewiesen wurden, sprechen die GUS-positiven Bereiche eindeutig für transformierte Pflanzenzellen.

Da es aber an den untersuchten Regeneraten Bereiche gab, die nicht GUS-positiv waren, war die *GUS*-Expression histochemisch nicht homogen nachweisbar. Die Begründungen hierfür können vielfältig sein. Eine Ursache kann laut Ko et al. (1998) in einer möglichen **Agrobakterienkontamination** des zu untersuchenden Gewebes liegen, wodurch es zu falschen GUS-positiven Signalen kommen kann. Dies kann für diese Arbeit ausgeschlossen werden, da das verwendete binäre Vektorsystem pCambia1305.1 über ein Intron innerhalb der *GUS*-Sequenz verfügt. Da Agrobakterien nicht die Fähigkeit zum „Splicing“ besitzen, sollten demnach keine Proteine gebildet werden.

Des Weiteren kann eine nicht-homogene *GUS*-Expression durch den **Prozess der GUS-Färbung** ausgelöst werden, es kann ein **Gen „Silencing“** stattgefunden haben, oder es kann sich bei dem untersuchten Regenerat um eine **Chimäre** handeln (Malnoy et al. 2010). Wenn während des Färbeprozesses das Substrat X-Gluc in der Färbelösung nicht in alle Bereiche des Regenerats diffundieren kann, kommt es zu einer nicht-homogenen *GUS*-Expression. Dies kann aber weitestgehend ausgeschlossen werden, da durch Vakuuminfiltration sichergestellt wurde, dass die Regenerate vollständig von der Flüssigkeit bedeckt waren (siehe Material und Methoden, 1.6).

Eine weitere These ist, dass die Promotor Region die Expression des Gens beeinflussen kann (Mitsuhara et al. 1996). Der CaMV-35S Promoter ist ein häufig verwendeter Promoter, der ein hohes Maß an transkriptioneller Aktivität in den meisten Geweben und bei den meisten Pflanzenspezies aufweist (Benfey & Chua 1990). Beim Apfel wird in Verbindung mit dem CaMV-35S Promoter eine gewebespezifische Expression des *GUS*-Gens vermutet. Da bei den untersuchten Regeneraten dieser Arbeit eine nicht-homogene *GUS*-Expression innerhalb eines Gewebetypes (Blattgewebe, siehe Abb. 29) beobachtet wurde, kann eine gewebespezifische Abschaltung des Promotors als Grund ausgeschlossen werden. Obwohl der CaMV-35S Promotor ein konstitutiver Promotor sein soll, diskutieren Benfey et al. (1989) und Schnurr & Guerra (2000), dass seine Expression von Faktoren wie Photoperiode, Temperatur und Entwicklungszustand des Gewebes moduliert werden kann. Er kann beispielsweise "gesilenced" werden, indem Methylierung innerhalb der Promotor Region stattfindet (Ottaviani et al. 1993, Pua 1994). Da aber die nicht-homogene *GUS*-Expression innerhalb desselben Regenerates beobachtet wurde (siehe Abb. 29), ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese genannten Faktoren die Aktivität des Promotors beeinflussten, weitestgehend auszuschließen.

Die nicht-homogene *GUS*-Expression kann auch durch das Vorhandensein einer Chimäre, also einem Mix aus transformierten und untransformierten Zellen, erklärt werden. Es wird zwischen Periklinal-, Sektorial- und Meriklinalchimären unterschieden. Für eine genaue Zuordnung, um welchen Typ es sich handelt, sind Gewebeschnitte notwendig. Chimären kommen bei der Transformation des Apfels häufig vor (Rugini & Mugano 1998) und der Ursprung eines chimärischen Regenerats ist multizellulär (Yao et al. 1995) und beim Apfel resultieren Chimäre meist aus der direkten Sprossregeneration (Rugini & Mugano 1998), wie sie auch in dieser Arbeit bei den Genotypen 'A 14' und 'Jonagold' beobachtet werden konnte. Um diese Problematik zu umgehen und homogene transgene Regenerate zu erhalten, kann nach der Transformation transgener Kallus zur Sprossregeneration angeregt werden. Dies ist

derzeit Gegenstand der Untersuchung (Schwan, unveröffentlicht). Chimärische Regenerate werden häufig bei Transformationen ohne ein Selektionsagens im Medium beobachtet (Maximova et al. 1998). Eine Unterscheidung der transformierten und untransformierten Zellen, d.h. eine Untersuchung auf Insertion der Zielgene in das Pflanzenzellgenom innerhalb der GUS-negativen und GUS-positiven Bereiche am Spross, war nicht möglich, um endgültig zu klären, ob es sich bei dem Regenerat um eine Chimäre handelt. Die zu untersuchenden Bereiche am Regenerat waren zu klein, um eine exakte Trennung und damit eine sichere molekulargenetische Unterscheidung zuzulassen.

Bei Transformationen der Apfelselektion 'A 14' wurde eine Bildung von Escapes beobachtet (siehe Ergebnisse, 1.3). Um dies zu vermeiden, hätte die Antibiotikakonzentration erhöht werden müssen, um die Selektion stringenter ausfallen zu lassen. Da aber bei einer Selektion die nicht-transgenen Zellen absterben und somit eine toxische Umgebung für die wenigen, transformierten Zellen schaffen, wurden gezielt Transformationen ohne ein Selektionsagens im Medium durchgeführt (siehe Ergebnisse, 1.4, 1.6 und 1.7). Dadurch sollten sämtliche Transformationsereignisse erfasst werden. Eine Alternative dazu stellt beispielsweise eine spätere Selektion dar. Sie erlaubt den transformierten Zellen sich zu teilen, wodurch sie als Zellkluster eher in der Lage sind, der toxischen Umgebung absterbender nicht-transgener Zellen standzuhalten (Yao et al. 1995). Basierend auf der hohen Sensitivität des Apfels gegenüber Antibiotika wurde daher in zahlreichen Protokollen die Selektion mit geringen Konzentrationen von Kanamycin gestartet und dann kontinuierlich gesteigert (Welander et al. 1998, Murata et al. 2000, Wilson & James 2003, Dolgov et al. 2003). Eine solche „schrittweise Selektion“ ist zurzeit in Untersuchung (Schwan, unveröffentlicht).

1.3 Kritische Schritte einer Agrobakterien-vermittelten Transformation und Möglichkeiten zur Verbesserung der Transformation

Ein vollständig transgenes Regenerat wurde trotz der Variation und Optimierung der Parameter einer Transformation nicht erhalten und bestätigt die Aussagen der Literatur, dass der Apfel eine schwer zu transformierende Spezies darstellt. Die Ursachen dafür sind komplex und werden deutlich, wenn man sich die einzelnen Schritte einer Agrobakterien-vermittelten Transformation näher betrachtet. Gelvin (2000) definiert folgende Schritte als kritisch für eine erfolgreiche Transformation: Die Synthese von **phenolischen vir-Gen-**

induzierenden Substanzen der Pflanzen (siehe 1.1.3, Acetosyringon) sowie die **Anlagerung der Bakterien an die Pflanze**, wie von Nam et al. (1997) an dem schwer transformierbaren *Arabidopsis* Wildtyp Bl-1 demonstriert wurde. Weitere kritische Schritte sind der **T-DNA Transfer** in das pflanzliche Zytoplasma, der **Transport der T-DNA** in den Zellkern und die **Integration der T-DNA** in das Pflanzengenom. Für die meisten Spezies aber stellt die **T-DNA Integration** den limitierenden Faktor der Transformation dar. Dies zeigt sich daran, dass viele Spezies, die schwer stabil zu transformieren sind, relativ effizient transient zu transformieren sind (Gelvin 2000). Für den Apfel zeigte Maximova et al. (1998) anhand eines fluoreszierenden Proteins *in vivo*, dass gegenüber der anfänglichen nachgewiesenen (transienten) Transformation, 48 h nach der Infektion am Explantat und später am Kallus, sich die stabile Transformation um das 10000-fache reduzierte. **Fortschritte** bei der Transformation von verschiedenen Pflanzen wurden bisher weitestgehend durch die Auswahl geeigneter Agrobakterienstämme für das jeweilige Pflanzengewebe gemacht. Auch durch genetische Modifikationen von Agrobakterien sowie durch Fortschritte in der Selektion transgener Pflanzen konnte die Agrobakterien-vermittelte Transformation optimiert werden (Herrera-Estrella et al. 2005). Neuere Ansätze in der Verbesserung der Transformationseffizienz von schwer transformierbaren Pflanzen, bestehen dagegen in der genetischen Manipulation des Wirtsgenoms (Gelvin 2000). Ein Ansatz zur **Verbesserung der T-DNA Integration** und damit zur stabilen Transformation stellt dar, die Gene, die für die T-DNA Integration verantwortlich sind, im Wirtsgenom zu überexprimieren. Mysore et al. (2000) identifizierten das **rat5-Gen** (resistent to *Agrobacterium* transformation, kodierend für Histon H2A) aus *Arabidopsis*, welches wichtig für die T-DNA Integration, nicht aber für deren Transfer in das pflanzliche Zytoplasma ist. *Arabidopsis* Rat 5 Mutanten konnten transient genauso erfolgreich transformiert werden wie der Wildtyp. Die stabile Transformation einiger Eigenschaften (z.B. *GUS*-Expression) stellte sich dabei als sehr ineffizient dar (Mysore et al. 2000, Nam et al. 1999). Die Überexpression dieses Gens jedoch erhöhte die stabile Transformation um das zwei- bis dreifache. Dafür musste das Gen nicht unbedingt in das Wirtsgenom integriert werden, sondern die stabile Transformation wurde auch erhöht, wenn das Gen von der T-DNA des binären Vektors expremiert wurde (Mysore et al. 2000).

Des Weiteren wurden Proteine identifiziert, deren Überexpression die Empfindlichkeit der zur transformierenden Spezies gegenüber der Agrobakterien-vermittelten Transformation erhöhen. Das sind das VIP1-Protein beim Tabak, das essentiell für den T-DNA Transport in

den Zellkern ist (Tzfira et al. 2001) und das Protein VIRB2 bei *Arabidopsis*, welches mit dem bakteriellen T-Pilus interagiert (Hwang & Gelvin 2004).

Ein Problem der Überexpression von pflanzlichen Genen, die für die Transformation förderlich sind, ist, dass eine Agrobakterium-vermittelte Transformation dieser Gene für Pflanzen, die mittels Agrobakterien schwer zu transformieren sind, kaum eine Option darstellt. Eine Alternative könnte das Mikrobombardement darstellen (Tzfira & Citovsky 2006). Eine weitere und bessere Möglichkeit stellt aber dar, Agrobakterien für die Expression und Lieferung von Wirtsproteinen in die Wirtszelle während des Transformationsprozesses zu benutzen. Dabei macht man sich die Fähigkeit der Agrobakterien zu nutze, einige vir-Proteine unabhängig von der T-DNA in die Pflanzenzelle zu transportieren (Vergunst et al. 2000). Ein weiterer Schritt in diese Richtung war die Identifikation von relativ kurzen Exportsignalen, die für diesen Transport benötigt werden (Vergunst et al. 2005). Diese Entdeckungen bieten die Basis für eine Technologie, bei der Wirtsfaktoren mit dem in Agrobakterien expremierten Exportsignal fusionieren und von den Agrobakterien in den Wirt gleichzeitig mit der T-DNA geschleust werden. Vergunst et al. (2005) fanden beispielsweise heraus, dass die chimärische Cre Rekombinase mit dem virF-Protein Exportsignal fusioniert.

Obwohl die *vir*-Gene, die auf dem Ti-Plasmid liegen, eine primäre Rolle für die Transformation spielen, weiß man heute, dass auch **chromosomale Gene** des Agrobakteriums essentiell für den Transformationsprozess sind. Dabei spielen Gene für Produktion, Modifikation und Sekretion von Exopolysacchariden (*pscA/exoC*, *chvA*, *chvB*, Cangelosi et al. 1989, Cangelosi et al. 1990, Douglas et al. 1982, Douglas et al. 1985, Thomashow et al. 1987) und Gene, die für die bakterielle Anlagerung an Pflanzenzellen wichtig sind, eine große Rolle (*att*-Gene, Matthyse et al. 1996). Ebenso von Bedeutung sind Zuckertransporter, die für die Koinduktion der *vir*-Gene verantwortlich sind (*chvE*, Doty et al. 1993, Kemner et al. 1997) sowie Gene für die Regulation der *vir*-Gen Induktion (*chvD*, Liu et al. 1999) und Gene für den T-DNA Transport (*acvB*, Wirawan & Kojima 1996).

2. Markeranalysen

2.1 Kopplungsanalysen der Marker und Definition der *co*-Region

Ein Ziel dieser Arbeit war es, neue SSR Marker zu etablieren, die mit dem Kolumnarwuchs korrelieren. Anhand der Genomdaten von ‘Golden Delicious’ (Velasco et al. 2010) wurden die Sequenzbereiche auf dem Chromosom 10 zwischen 18,6 und 19,0 Mbp nach Mikrosatelliten untersucht und Primer generiert, die diese überspannen. Mittels BSA wurden diese Primer zunächst auf Polymorphismen zwischen kolumnaren und nicht-kolumnaren DNA-Pools untersucht. Wurden diese detektiert, wurden die SSR Marker an Einzelindividuen drei verschiedener Nachkommenschaften bezüglich ihrer Kopplungseigenschaften überprüft. Diese Nachkommenschaften entstanden aus drei Kreuzungspopulationen: ‘A 14’ x ‘Procats’ (144 Individuen), ‘Pomfital’ x ‘Wellant’ (521 Individuen) und ‘A10-20’ x ‘Pinova’ (416 Individuen). Es gelang, drei SSR Marker zu entwickeln, **949_2 M1**, **256_1 M1** und **84_1 M1**, welche an allen getesteten Individuen der Nachkommenschaften (siehe Material und Methoden, Tab. 17) kolumnarwüchsige Bäume von nicht-kolumnaren Bäumen unterscheiden können. Ihre Position auf dem Chromosom 10 ist in der Abbildung 36 ersichtlich.

Zusätzlich wurden die von **Bai et al. (2012)** veröffentlichten Marker bezüglich ihrer Kopplungseigenschaften an den oben genannten Nachkommenschaften untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Sequenz des Markers C18470-25831 mit der des Markers 84_1 M1 übereinstimmt, weshalb der Marker C18470-25831 nicht weiter untersucht wurde. Anhand der Geisenheimer Nachkommenschaften konnten mit den Markern **C1753-3520** und **C7629-22009** (Bai et al. 2012) in dieser Arbeit keine Rekombinanten identifiziert werden. Bai et al. (2012) identifizierten mit dem Marker C1753-3520 zwei Rekombinanten und mit dem Marker C7629-22009 eine Rekombinante. Das bedeutet, dass die von Bai et al. (2012) gefundene Eingrenzung des *co*-Lokus auf 193 kb zwischen 18,905 Mbp und ca. 19,096 Mbp in dieser Arbeit nicht unterstützt werden konnte. Der Marker von **C6536-31519** (Bai et al. 2012) bei 19,656 Mbp wurde in dieser Arbeit an insgesamt 324 Individuen getestet. Es gelang, zwei Rekombinanten zu identifizieren, wodurch das Ergebnis von Bai et al. (2012) bezüglich dieses Markers bestätigt werden konnte.

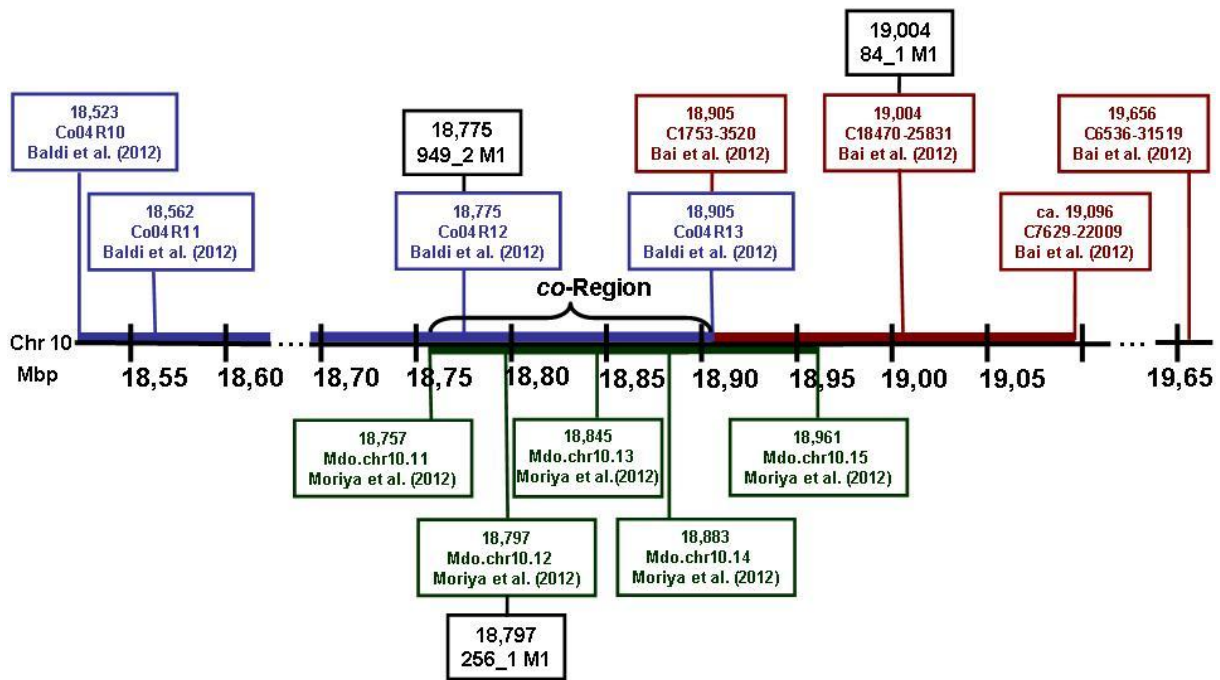


Abb. 36: Übersicht der Positionierung der Marker von **Bai et al. (2012)** (rot), **Moriya et al. (2012)** (grün), **Baldi et al. (2012)** (blau) und der in dieser Arbeit entwickelten Marker **949_2 M1**, **256_1 M1** und **84_1 M1** (schwarz) auf dem Chromosom 10. Die „linke“ Begrenzung der *co*-Region wird vermutlich von dem Marker Mdo.chr10.11 (Moriya et al. (2012)) bei 18,757 Mbp definiert, die „rechte“ Begrenzung von den Markern Co04R13 (Baldi et al. (2012)) und C1753-3520 (Bai et al. (2012)) bei 18,905 Mbp. Somit erstreckt sich die potentielle *co*-Region über 148 kb.

Während der Durchführung dieser Arbeit wurden zwei weitere Publikationen veröffentlicht, die ebenfalls eine unterschiedliche Eingrenzung des *co*-Lokus, als die von Bai et al. (2012) aufzeigen. **Moriya et al. (2012)** testeten an 1000 Nachkommen aus 31 Kreuzungspopulationen 13 SSR Marker. Es gelang ihnen, drei Marker zu identifizieren, die zu 100% mit dem Kolumnarwuchs kosegregieren: **Mdo.chr10.12**, **Mdo.chr10.13** und **Mdo.chr10.14**. Bei der Überprüfung der Markersequenzen stellte sich heraus, dass der Marker 256_1 M1 denselben Mikrosatelliten wie der Marker Mdo.chr10.12 detektiert. Daher unterstützt die Kosegregation des Markers 256_1 M1 das Ergebnis von Moriya et al. (2012), bezüglich der Kosegregation des Markers Mdo.chr10.12. Dadurch kommen diese Arbeit und Moriya et al. (2012) zu einem anderen Ergebnis, bezüglich der „linken“ Begrenzung des *co*-Lokus von Bai et al. (2012).

Wahrscheinlicher ist es, dass der Marker C1753-3520 die „rechte“ Begrenzung der *co*-Region definiert. Die Publikation von **Baldi et al. (2012)** unterstützt diese „rechte“ Grenze, da der Marker **Co04R13** dem Marker C1753-3520 (Bai et al. (2012)) entspricht (sie detektieren denselben Mikrosatelliten) und Baldi et al. (2012) zwei Rekombinanten identifizieren konnten. Die Marker **Co04R12** und der Marker 949_2 M1 detektieren ebenfalls denselben Mikrosatelliten. Dadurch unterstützt die Kosegregation des Markers 949_2 M1 in dieser

Arbeit die des Markers Co04R12. Baldi et al. (2012) definieren die „linke“ Begrenzung der *co*-Region mittels des Markers **Co04R10** bei 18,523 Mbp, da die Sequenz des Markers **Co04R11** (bei 18,562 Mbp) nicht eindeutig innerhalb des ‘Golden Delicious’ Genoms zugeordnet werden konnte. Bai et al. (2012) stellten ebenfalls ein Assemblierungsfehler bei den Sequenzdaten des ‘Golden Delicious’ Genoms fest. Ein 100 kb großes Segment wurde fälschlicherweise dem Chromosom 10 zugeordnet. Die darin enthaltenen Marker (C7156.181-1 und C19509.316) konnten aber bei ‘PI 613988’ der Kopplungsgruppe 15 zugeordnet werden (Wang et al. 2012). Dies zeigt, dass die Sequenzdaten des ‘Golden Delicious’ Genoms zwar eine wertvolle und geeignete Quelle zur Markergenerierung darstellen, die Daten aber nicht fehlerfrei sind und vor der Verwendung unbedingt überprüft werden sollten. Die in dieser Arbeit entwickelten Marker 949_2 M1, 256_1 M1 und 84_1 M1 wurden daher sequenziert und mittels „Blast“-Suche eindeutig dem Chromosom 10 zugeordnet.

Die **“linke“ Begrenzung der *co*-Region** wird nach diesen Untersuchungen am ehesten von dem Marker von Moriya et al. (2012), **Mdo.chr10.11**, definiert (siehe Abb. 36). Sie identifizierten mit diesem Marker eine Rekombinante unter 1000 Nachkommen aus insgesamt 31 Kreuzungspopulationen. Entgegen des Ergebnisses von Moriya et al. 2012 wurde dieser Marker nicht bei 18,766 Mbp lokalisiert. Im Rahmen dieser Arbeit ergab eine Überprüfung der Lage dieses Markers mittels „Blast“-Suche gegen das ‘Golden Delicious’ Genom, dass dieser bei **18,757 Mbp** auf Chromosom 10 liegt.

Die **„rechte“ Begrenzung der *co*-Region** wird vermutlich von den Markern von Baldi et al. (2012) (**Co04R13**) und Bai et al. (2012) (**C1753-3520**) bei **18,905 Mbp** definiert, wodurch die potentielle *co*-Region auf **148 kb** eingegrenzt werden kann (siehe Abb. 36). Diese „rechte“ Grenze konnte an den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nachkommenschaften nicht bestätigt werden. Der Marker C1753-3520 (Bai et al. 2012) wurde in dieser Arbeit an 350 Individuen der drei Nachkommenschaften getestet und es konnten keine Individuen mit Rekombinationsereignissen identifiziert werden (siehe Tab. 42). Bai et al. (2012) testeten den Marker jedoch an 818 Individuen (528 Individuen aus vier Nachkommenschaften und 290 Sorten) und Baldi et al. (2012) untersuchten den Marker Co04R13 anhand 1551 Individuen aus 5 Nachkommenschaften von vier Kreuzungspopulationen. Beide Publikationen konnten jeweils zwei Rekombinanten detektieren. D.h., eine Untersuchung einer höheren Anzahl an Individuen aus der Nachkommenschaft mit dem Marker C1753-3520, im Rahmen dieser Arbeit, hätte noch Rekombinationsereignisse aufzeigen können. Die „rechte“ Begrenzung wird von Baldi et al. (2012) zusätzlich unterstützt, indem sie mit dem kosegrigierenden Marker von Bai et al. (2012) C18470-25831 drei Rekombinanten detektieren konnten. Da

dieser Marker dem Marker 84_1 M1 entspricht, wurde der Marker demnach an insgesamt 1291 Nachkommen aus sieben (vier von Bai et al. (2012), drei aus dieser Arbeit) verschiedenen Kreuzungspopulationen untersucht. Er wurde in dieser Arbeit an 473 Individuen (siehe Tab. 42) und von Bai et al. (2012) an 818 Individuen getestet, ohne dass Rekombinationsereignisse auftraten. Baldi et al. (2012) testeten den Marker an mehr Bäumen, nämlich an 1551 Individuen (aus 5 Nachkommenschaften vierer Kreuzungspopulationen). D.h., eine Untersuchung einer höheren Anzahl an Individuen mit dem Marker 84_1 M1 oder C18470-25831 (Bai et al. 2012), im Rahmen dieser Arbeit, hätte wahrscheinlich noch Rekombinationsereignisse aufzeigen können.

Moriya et al. (2009) stellten fest, dass eine große Anzahl an Bäumen wichtig ist, um eine Feinkartierung des *co*-Lokus vorzunehmen, eine eindeutige Mindest-Populationsgröße für die Feinkartierung aber schwer zu definieren ist. Beim Apfel wurde die Feinkartierung mehrerer Zielgene, beispielsweise für Resistenzgene gegen Krankheiten oder Schädlinge (Patocchi et al. 1999, Cevik & King 2002, Galli et al. 2010, Parravicini et al. 2011) und für Gene für die Fruchtqualität (Xu et al. 2012) bereits vollzogen. Die Populationsgröße und physikalische Größe der eingegrenzten Regionen variierten aber zwischen diesen Publikationen, da die Rekombinationshäufigkeit innerhalb der Zielregion die Effizienz der Feinkartierung und Eingrenzung der Region des Zielgens beeinflusst.

2.2 Bonitur des kolumnaren Phänotyps

Eine zuverlässige Bonitur der Bäume der zu untersuchenden Nachkommenschaften stellt eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Entwicklung einer MAS und die Eingrenzung der *co*-Region dar. So basiert die vermutliche „linke“ Begrenzung des *co*-Lokus auf einem einzigen Baum mit einem Rekombinationsereignis (Moriya et al. 2012, Marker Mdo.chr10.11) und macht deutlich, welche große Rolle eine exakte Bonitur spielt. Dabei erfolgt die Evaluierung der kolumnaren Phänotypen je nach Arbeitsgruppe nach unterschiedlichen Kriterien. Moriya et al. (2009) diskutierten daher, dass die Entwicklung einheitlicher Kriterien zur Unterscheidung der Phänotypen für die Lokalisierung der *co*-Region von großer Bedeutung ist.

Beispielsweise spielt das Alter der zu untersuchenden Bäume eine entscheidende Rolle in der Zuverlässigkeit der Bonitur. Der kolumnare Phänotyp wird erst nach mehreren Jahren

vollständig ausgeprägt (Kim et al. 2003, Tian et al. 2005) und ist bei Bäumen unter zwei Jahren nur sehr schwer zu bestimmen (Hemmat et al. 1997). Das Alter der bonitierten Bäume, die für die Arbeit verwendet wurden, betrug vier Jahre ('A 14' x 'Procats', 'A10-20' x 'Pinova', 'Pomfital' x 'Wellant'). Für die Markeranalysen dieser Arbeit wurden nur Bäume miteinbezogen, deren Phänotyp eindeutig kolumnar oder nicht-kolumnar war. Hemmat et al. (1997) und Kim et al. (2003) beschreiben in ihren Arbeiten den sogenannten intermediären Phänotyp. Hemmat et al. (1997) konnten bei einer vierjährigen Nachkommenschaft bei einem Drittel der Bäume den intermediären Phänotyp detektieren. Auch Baldi et al. (2012) fanden bei Nachkommenschaften aus den Kreuzungspopulationen 'Golden Delicious' x 'McIntosh Wjick' selbst im dritten Jahr noch eine hohe Anzahl an intermediären Phänotypen und unterstützen damit die These, dass das Pflanzenalter ganz entscheidend die Ausprägung des kolumnaren Phänotyp beeinflusst. Moriya et al. (2009) beobachteten den intermediären Phänotyp nur bei der jüngsten untersuchten Nachkommenschaft und setzen den intermediären Wuchstyp mit einer noch nicht ausgewachsenen, unklaren Baumarchitektur gleich, der sich mit fortschreitendem Baumalter „verwachsen“ soll. Die Problematik der uneinheitlichen Bonitur verschiedener Arbeitsgruppen macht deutlich, dass die Feinkartierungen des *co*-Lokus unter Vorbehalt betrachtet werden sollte. In dieser Arbeit wurde die Ermittlung der Rekombinationsereignisse des Markers C6536-31519 (Bai et al. 2012) anhand der nicht-kolumnaren Bäume 5.86 N und 16.12 N doppelt abgesichert. Zunächst wurden diese beiden Bäume erneut bonitiert und nochmals von ihnen DNA isoliert. Anschließend wurden die beiden Bäume mit allen Markern (949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1 und die Marker von Bai et al. (2012) C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519) bezüglich ihres Wuchtypes untersucht. Alle Marker, bis auf C6536-31519, konnten bei beiden Bäumen den Phänotyp als eindeutig nicht-kolumnar detektieren. Somit sollten die Rekombinationsereignisse des Markers C6536-31519 als gesichert gelten.

2.3 Markeranalysen der Apfelselektionen und Sorten sowie des Baumes 15.67 C

Die in dieser Arbeit entwickelten Marker 949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1 und die Marker von Bai et al. (2012) C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519 wurden bezüglich ihrer Korrelation mit dem entsprechenden Wuchstyp untersucht. Dafür wurde die DNA 23 verschiedener Apfelselektionen und Sorten (16 kolumnare, 7 nicht-kolumnare) mit den Markern getestet (siehe Tab. 43). Nur die Marker 949_2 M1 und C6536-31519 detektieren die untersuchten Sorten entsprechend ihres Phänotyps. Eine Ausnahme bildeten die nicht-kolumnaren Sorten 'McIntosh' und 'Topaz'. Alle untersuchten Marker amplifizieren bei diesen Sorten ein Bandenmuster, welches typisch für einen kolumnaren Phänotyp ist. Um eine Kontamination der DNA-Probe von 'Topaz' als Ursache für die falsche Detektion sämtlicher Marker auszuschließen, wurden vier verschiedene Bäume von unterschiedlichen Standorten untersucht (siehe Tab. 44). Die Amplifikation einer Bande, die für kolumnare Phänotypen typisch ist, bei den nicht-kolumnaren Sorten 'McIntosh' und 'Topaz' kann in der Markerentwicklung selbst begründet liegen. Diese erfolgte anhand der Sequenzdaten des haploiden 'Golden Delicious' Genoms und die Marker könnten Bereiche in kolumnaren Sorten detektierten, die von 'McIntosh' stammen. Das heißt, man erhält Marker, die nicht den Kolumnarwuchs, sondern Sequenzbereiche der Sorte 'McIntosh' nachweisen. Im Genom von 'Topaz' muss es folglich auch einen Sequenzbereich geben, der von 'McIntosh' stammt. Um Marker zu entwickeln, die sortenunabhängig den Kolumnarwuchs detektieren können, wäre es daher notwendig, diese anhand der Sequenzdaten von 'McIntosh Wjczik', die ausschließlich die Mutation betreffen, zu entwickeln.

Die Markeranalyse des kolumnaren Baumes 15.67 C ('A10-20' x 'Pinova') zeigt, dass alle getesteten Marker (949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1 und die Marker von Bai et al. (2012) C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519) ein unterschiedliches Bandenmuster bei diesem Baum, als bei allen anderen kolumnaren Bäume derselben Nachkommenschaft amplifizieren (siehe Abb. 32 und Abb. 33). Dieses unterschiedliche Bandenmuster kolumnarer Bäume innerhalb einer Nachkommenschaft könnte in einem ungewöhnlichen Rekombinationsereignisses des Baumes 15.67 C begründet liegen. Dieses Rekombinationsereignis beeinflusst aber nicht die Spezifität der Marker, da sie die kolumnarspezifische Bande eindeutig detektieren können. Zur Absicherung, dass es sich bei der detektierten Bande des Baumes 15.67 C tatsächlich um die kolumnarspezifische Bande

handelt, wurde diese sequenziert und mittels „Blast“-Suche eindeutig dem Chromosom 10 zugeordnet. Als Referenzbanden dienten die kolumnarspezifische Bande des Baumes 15.62 C und die nicht-kolumnare Bande (die Bande, die für den nicht-kolumnaren Phänotyp spezifisch ist) des Baumes 5.86 N, die ebenfalls sequenziert und dem Chromosom 10 zugeordnet werden konnten.

2.4 Sequenzanalysen der *co*-Region

Otto et al. (2013) vollzogen SNP Analysen anhand der genomischen DNA von *in vitro* Kulturen der Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats’. Dabei wurden 24 Gene identifiziert, die bei der kolumnaren Apfelselektion ‘Procats’ Punktmutationen hatten, welche zum Austausch von Aminosäuren führten. Davon lagen vier Gene in der potentiellen *co*-Region (zw. 18,757 Mbp und 18,905 Mbp, siehe Abb. 36). Eine Überprüfung der SNPs an DNA-Pools von ‘A 14’ und ‘Procats’ beziehungsweise an DNA anderer Apfelsorten fanden dagegen keinerlei SNPs mehr zwischen kolumnaren und nicht-kolumnaren Sorten (Romina Petersen, persönliche Mitteilung). Zusätzlich wurden im Rahmen von Promotionsarbeiten BAC-Klone der *co*-Region von ‘Procats’ hergestellt (Otto, unveröffentlicht) und die Sequenzdaten als Referenz für das Mapping genomischer Illumina Daten von ‘McIntosh’ und ‘McIntosh Wijcik’ genommen (Petersen, unveröffentlicht). Dabei wurden in der *co*-Region zwischen ‘McIntosh’ und ‘McIntosh Wijcik’ keinerlei SNPs gefunden (Romina Petersen, persönliche Mitteilung). Der einzige Unterschied in den Sequenzdaten ist eine Integration eines Retrotransposons bei ‘McIntosh Wijcik’, welches bei ‘McIntosh’ nicht vorhanden war. Dabei handelt es sich um ein Long Terminal Repeat Retrotransposon, welches zu den Gypsy-typ Retrotransposons gehört (Romina Peterson, persönliche Mitteilung).

Transposons sind parasitäre, repetitive, mobile Elemente, die durch das ganze Genom verteilt sind und in DNA-Transposons (transponiert über ein DNA “cut-and-paste” Mechanismus) oder Retrotransposons unterschieden werden (transponiert über ein RNA-Zwischenprodukt) (Kazazian & Moran 1998). Transposable Elemente (TEs) machen einen erheblichen Anteil der meisten Pflanzengenome aus (Lisch 2009). So sind zum Beispiel Retrotransposons in einer hohen Kopienzahl in den meisten Pflanzen enthalten: zwischen 5.5% des *Arabidopsis thaliana* Genoms (Arabidopsis Genom Initiative 2000) bis hin zu mehr als 50% des genomischen Gehalts von *Zea mays* (SanMiguel et al. 1996). Abhängig von der Existenz

eines LTR (Long Terminal Repeat) und strukturellen Charakteristika werden Retrotransposons in LTR-Retrotransposons (LTR-RTs) und nicht-LTR-Retrotransposons unterteilt (Xiong & Eickbush 1990). LTR-RTs enthalten zwei LTRs, die mit 5'-TG-3' starten, mit 5'-CA-3' enden und Promoter- und Terminatorsequenzen beherbergen. Downstream des 5'-LTR und upstream des 3'-LTR befinden sich Primerbindestellen (Primer Binding Site, PBS) und ein Polypurintrakt (PPT) (Wicker & Keller 2007). Zusammen mit den Promoter- und Terminatorsequenzen stellen sie *cis*-regulatorische Elemente dar, welche essentiell für die Initiation der Transkription und Replikation eines LTR-RT sind. Zwischen der PBS und dem PPT befinden sich proteinkodierende Regionen: das gruppenspezifische Antigen (*GAG*), welches für ein „capsid-like“ Protein kodiert und die Polymerasegene (*Pol*), welche für Protease, Integrase, Reverse Transkriptase und RNaseH kodieren. Sie sind verantwortlich für die Retrotransposition und Integration der LTR-RTs in das Genom (Zhao & Ma 2013).

Die LTR-Retrotransposons werden weiter in die Ty1-*copia* und Ty3-*gypsy* Gruppe unterteilt. Sie unterscheiden sich in ihrem Grad der Sequenzähnlichkeit (Xiong & Eickbush 1990) und der Anordnung der Genprodukte, für die sie kodieren (Kumar & Bennetzen 1999).

Bei 'McIntosh Wijcik' konnte im Rahmen der Promotion von Romina Petersen die Transkription des LTR-RT nachgewiesen werden. Bei einem Abgleich mit der Datenbank konnten allerdings keine Treffer für *GAG* und eine *Reverse Transkriptase* ermittelt werden. Vielmehr wurde entdeckt, dass das LTR-RT in dem LTR eines anderen Retrotransposons lokalisiert ist (Romina Peterson, persönliche Mitteilung). Das spricht dafür, dass es sich bei dem LTR-RT von 'McIntosh Wijcik' um ein nicht-autonomes Transposon handelt, welches von einem anderen, autonomen Transposon mobilisiert wird und schon bei Reis beobachtet werden konnte (Jiang et al. 2002).

Bislang ist es weitestgehend ungeklärt, inwieweit die Insertion LTR-RT in das Genom von 'McIntosh Wijcik' die Ausbildung des Kolumnarwuchs verursacht. Eine Insertion in die kodierende Region eines Genes könnte eine Genfunktion aufheben (Grandbastien et al. 1989). Auch ist es denkbar, dass das Transposon selbst als Gen fungiert (Jiang et al. 2004) und somit den Phänotyp beeinflusst. Die Region, in der das LTR-RT bei 'McIntosh Wijcik' gefunden wurde, ist jedoch eine genarme Region. Ein Abgleich mit der Datenbank im Rahmen der Promotion von Romina Petersen konnte kein Gen identifizieren, welches durch die Integration des LTR-RT seine Funktion hätte verlieren können oder für die das LTR-RT kodiert (Romina Petersen, persönliche Mitteilung). Die Ausbildung des kolumnaren Phänotyps durch die Integration des LTR-RT kann aber auch erfolgen, indem es die Expression benachbarter Gene beeinflusst. Es ist bekannt, dass durch Insertionen von TEs in

Gennähe die Genregulation dieser Gene verändert werden kann (Cheng et al. 2006). Dabei können Transposons beispielsweise die Genexpression beeinflussen, indem sie Promotoren, Enhancer oder Silencer bereitstellen oder diese zerstören (Yao et al. 2001, Kobayashi et al. 2004, Studer et al. 2011). Denkbar wäre auch, dass die Integration des LTR-RT zu einer Strukturveränderung des Chromosoms führt und dies wiederum epigenetische Effekte auf benachbarte Gene hat.

Vermutlich ist der kolumnare Wuchstyp daher die Konsequenz der Integration des LTR-RT, welche ein anderes Genexpressionsmuster als bei nicht-kolumnaren Bäumen auslöst. Um welche Gene es sich dabei handelt, ist weitestgehend ungeklärt. Transkriptomanalysen zwischen kolumnaren und nicht-kolumnaren Bäumen zeigen, dass die Expression einer Vielzahl von Genen bei kolumnaren Bäumen entweder hoch oder runterreguliert ist. Krost et al. (2012) beschreiben, dass Gene für Lichtreaktionen, mitochondriellen Elektronentransport, Fettstoffwechsel und Zellwandmodifikationen (Expansin und Xyloglucan Endotransglucosylasen/Hydrolasen) in kolumnaren Phänotypen runterreguliert sind. Andere Gene, die für die Zellwandmodifikation verantwortlich sind, wie Gene für Terpenoid- und Tryptophan-Synthese (Ausgangsstoffe für die IAA-Biosynthese), wurden hochreguliert. Gene, die bei der DNA- und Protein-Synthese sowie bei der RNA-Prozessierung eine Rolle spielen, wurden runterreguliert. Das würde auch mit dem reduzierten Wachstum kolumnarer Pflanzen einhergehen. Gene für Proteintransport und -modifikation wurden dagegen hochreguliert. Auf Phytohormonebene wurden Gene für die Biosynthese und Signaltransduktion von IAA und Jasmonaten induziert, die für Giberillinsynthese dagegen nicht. Zusätzlich fanden Krost et al. (2012) Hinweise für die Blockierung des Zellzyklus in der G2-Phase bei kolumnaren Bäumen, was zu einer reduzierten Zellanzahl führen würde und mit dem kolumnaren Phänotyp einhergehen könnte. Krost et al. (2013) diskutieren, dass eine Kombination des Anstiegs von IAA und dem basipetalen IAA-Transport verantwortlich für das hohe Maß der Apikaldominanz und apikaler Kontrolle kolumnarer Apfelbäume sein könnte. Diese Vermutung basiert auf dem Ergebnis von Krost et al. (2013), wonach Gene für ein Auxin-Transporterprotein (*AUX1*) und ein Auxin-Efflux-Carrier (*PIN1*) hochreguliert wurden.

E Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Arbeit war es, molekularbiologische Untersuchungen zum Kolumnarwachstum des Apfels durchzuführen. Zum einen wurden anhand der Sequenzdaten des ‘Golden Delicious’ Genoms (Velasco et al. 2010) drei neue SSR Marker entwickelt, 949_2 M1, 256_1 M1 und 84_1 M1. Sie konnten bei den untersuchten Nachkommenschaften zuverlässig den Kolumnarwuchs auf DNA-Ebene detektieren. Des Weiteren wurden die von Bai et al. (2012) veröffentlichten Marker C1753-3520, C7629-22009 und C6536-31519 bezüglich ihrer Kopplungseigenschaften untersucht. Anhand der untersuchten Nachkommenschaften konnten mit den Markern C1753-3520 und C7629-22009 keine Rekombinanten ermittelt werden. Bai et al. (2012) konnten mit den Markern insgesamt drei Rekombinanten identifizieren. Dadurch konnten die von Bai et al. (2012) gefundenen Grenzen des *co*-Lokus in dieser Arbeit anhand der Geisenheimer Nachkommenschaften nicht bestätigt werden. Mit dem Marker C6536-31519 gelang es, zwei Rekombinanten zu identifizieren und das Ergebnis von Bai et al. (2012) bezüglich dieses Markers zu bestätigen. Im Laufe dieser Arbeit entstanden zwei weitere Publikationen, die Bai et al. (2012) ebenfalls bezüglich der Eingrenzung des *co*-Lokus widersprechen (Moriya et al. 2012 und Baldi et al. 2012). Die „linke“ Begrenzung der *co*-Region wird nach diesen Untersuchungen am ehesten von dem Marker Mdo.chr10.11 (Moriya et al. 2012) bei 18,757 Mbp definiert. Die „rechte“ Begrenzung der *co*-Region wird vermutlich von den Markern Co04R13 (Baldi et al. 2012) und C1753-3520 (Bai et al. 2012) bei 18,905 Mbp definiert, wodurch die potentielle *co*-Region auf 148 kb auf dem Chromosom 10 eingegrenzt werden kann.

Für die funktionelle Überprüfung möglicher Kandidatengene des *co*-Gens wurde ein Agrobakterien-vermitteltes Transformationssystem für die Geisenheimer Apfelselektionen ‘A 14’ und ‘Procats 28’ adaptiert. Das Hauptproblem bei der Transformation beim Apfel ist, dass die Transformationseffizienzen sehr niedrig 0,2-15% (Aldwinckle & Malnoy 2009) und stark von den verschiedenen Genotypen abhängig sind (De Bondt et al. 1994). Daher wurde zusätzlich der bereits in der Literatur als transformierbar beschriebene Genotyp ‘Jonagold’ (Viss et al. 2003) transformiert. Bei Transformationen der Apfelselektion ‘A 14’ gelang es, transgene Zellen an den Explantaten und am Kallusgewebe zu erzeugen, wenn Blätter als Explantate verwendet wurden. Bei der Transformation fragmentierter Sprossspitzen gelang es, transgene Bereiche am Regenerat zu erzeugen. Bei der Transformation von ‘Jonagold’ wurde ein fast vollständig transgenes Regenerat erzeugt. Dabei könnte es sich um eine

Chimäre handeln, welche beim Apfel meist aus der direkten Sprossregeneration resultiert (Rugini & Mugano 1998). Eine indirekte Regeneration über Kalli sollte daher zu einem homogen transgenen Regenerat führen und ist derzeit Gegenstand der Untersuchung (Schwan, unveröffentlicht).

Anhand der Sequenzdaten von 'McIntosh' und 'McIntosh Wijcik' wurde im Rahmen der Promotion von Romina Petersen ein LTR-Retrotransposon als einziger Unterschied in der Sequenz zwischen den beiden Apfelsorten gefunden. Denkbar ist, dass der Kolumnarwuchs dadurch ausgelöst wird, indem die Intergration des LTR-Retrotransposons Auswirkungen auf die Genexpression benachbarter Gene hat. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das bisher nicht annotierte Transkript den Kolumnarwuchs auslösen kann. Da es sich bei dem LTR-Retrotransposon nicht um ein klassisches Gen handelt, wird eine Funktionsanalyse erschwert. Bei einer Agrobakterien vermittelten Transformation erfolgt der Einbau der T-DNA irgendwo in das Pflanzengenom (Bundock et al. 2002). Eine Transformation des LTR-RTs via Agrobakterien setzt aber einen zielgerichteten Einbau in das Wirtsgenom voraus, um die gleiche Wirkung des Retrotransposons wie in kolumnaren Bäumen zu erzielen und somit die Funktion des LTR-RTs als Auslöser des Kolumnarwuchses zu bestätigen.

F Anhang

1. Allgemeine Abkürzungen

Tab. 45: Allgemeine Abkürzungen

2iP	2-Isopentenyladenin	Min	Minute
ABA	Abscisinsäure	mRNA	Messenger RNA
Abb.	Abbildung	NAA	2-(1-Naphthyl)essigsäure
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	NaCl	Natriumchlorid
AS	Acetosyringon	Neg.-Kontr.	Negativkontrolle
BA	Benzyl-Adenin-Aminopurin	OD	Optische Dichte
bp	Basenpaare	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
cDNA	copy- oder complement-DNA	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
Cefo	Cefotaxim	PGR	Plant Growth Regulators
Chr	Chromosom	Pos.-Kontr.	Positivkontrolle
DEPC	Diethylpyrocarbonat	RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat	rpm	Rounds per minute
ds	Downstream	RT	Raumtemperatur
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure	SCAR	<u>S</u> equence <u>C</u> haracterized <u>A</u> mplified <u>R</u> egion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	ssDNA	Einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure (single strand DNA)
EtBr	Ethidiumbromid	Sec	Sekunde
GA	Giberillinsäure	SSP	Sprossspitzen
GUS	Glucuronidase	SSR	Mikrosatelliten (Simple Sequences Repeats)
h	Stunde	Tab.	Tabelle
H₂O	Wasser	Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Hyg	Hygromycin	TBE	Tris-Borsäure-EDTA
IAA	Indol-3-Essigsäure (Indol-3-Acetic Acid)	TDZ	N-Phenyl-N-1,2,3-Thiadiazol-5-Urea, Thidiazuron
IBA	Indol-3-Buttersäure	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
IPTG	Isopropyl-β-D-Galactosid	U	Unit
Kan	Kanamycin	ÜK	Übernachtkultur
LS	Liponsäure	UV	Ultraviolett
MCS	Multiple cloning site	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galctopyranosid
Mio.	Millionen	X-Gluc	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucuronsäure

2. Chemikalien

Tab. 46: Verwendete Chemikalien

BEZEICHNUNG	HERSTELLER	BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Acetosyringon	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	Liponsäure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco Laboratories GmbH, Augsburg	Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
6-Benzylaminopurin (BA)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis	Marker GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Betainhydrochlorid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis	MOPS	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Cefotaxim	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem	Murashige & Skoog Medium	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem
Dimethylsulfoxid	AppliChem GmbH, Darmstadt	Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt	NaH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
dNTPs 0178.1 dNTP Set 1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	2-(1-Naphthyl)essigsäure (NAA)	Merck KGaA, Darmstadt
Eisessig 100%	AppliChem GmbH, Darmstadt	Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99,5% reinst.	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	Phytigel	Sigma-Aldrich Co., St. Louis
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt	pUC 18 Vektor	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Gelrite	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	Rifampicin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Gluconsäure	Sigma-Aldrich Co., St. Louis	S1 Nuklease (5x); EN0321	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt	D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	D(-)-Sorbit	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hygromycin	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem	Taq DNA Polymerase (native, mit BSA), 5u/µl, 500u	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Indol-3-Buttersäure (IBA)	Merck KGaA, Darmstadt	Thidiazuron (TDZ)	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem
IPTG	EUROBIO SA, Montpellier	Tris	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt	Triton X-100	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Merck KGaA, Darmstadt	x-Gal	BioVectra, Charlottetown
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt	X-Gluc	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	Zeatin	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem

3. Geräte

Tab. 47: Verwendete Geräte

BEZEICHNUNG	HERSTELLER	BEZEICHNUNG	HERSTELLER
DNR Bio-Imagingsystems, MF-ChemiBIS 3.2, ERM-2K3U, Koolance	DNR Bio-Imaging Systems Ltd., P.O. Box 34, Mahale HaHamisha (Jerusalem) Israel 90835; Biostep GmbH, Jahnsdorf	Thermocycler Primus HT	MWG AG Biotech, Ebersberg
Elektrophoreseapparatur mit Gelschlitten	Armin Baack Labortechnik, Schwerin	Tissue Lyser II	Qiagen, Hilden
Gefriertrocknungsanlage P10	Firma Piatkovski, München	Laborautoklav (Dampfsterilisator)	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim
Laborwaage, Kern EG 620-3NM	Gottl. Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern	Steril-Werkbank Aura HZ48	Bioair Instruments S.r.l, Siziano
Laborwaage PM480 DeltaRange	Mettler-Toledo GmbH (Greifensee)	Inkubationsschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Analysewaage (TB 224)	Denver Instrument GmbH (Göttingen)	pH-Meter UltraBASIC	Denver Instrument GmbH, Göttingen
Mikrowelle, Bosch HMT 72M420	Robert Bosch	Heizbarer Magnetrührer Unimag ARE	Uni Equip GmbH, Planegg
Mini-Tischzentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf AG, Hamburg	Zentrifuge 5403	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttler für Gelfärbung	Gerhardt GmbH; Thieme Labortechnik, Bensheim	Photometer BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge 4-16K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz	Schüttler (KS 4000i control)	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Power Supply, PS 500 XT DC	Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA	Vortex Schüttler	neoLab, Heidelberg
Thermocycler BioRad C1000	BioRad, München	Stereomikroskop MZ16FA	Leica, Mannheim

4. Primersequenzen

Tab. 48: Primersequenzen

PRIMERNAME	SEQUENZ IN 5'-3' ORIENTIERUNG	PRODUKTGRÖßE
C1753-3520	For TCCCTCTCTTCTGTTGCAATTT Rev GGCTTAAAAGGGTTGAAGTTCTC	176 bp
C7629-22009	For GGGCTAGCTGGCTAGGTGTA Rev ACAACACACCCAGCCCTAAT	184 bp
C6536-31519	For TGGATGGTGGGATTTCTTGT Rev AAGGAAACCACATTGCCAAA	196 bp
949_2 M1	For GGTCTTCACTAAGGTAACT Rev AACATGTCCCTTAACACACA	223 bp
256_1 M1	For TATACTTGCGCACCCCCAGAT Rev CTCCCCTACCGACAGCCC	295 bp
84_1 M1	For CAAGGACTCTTGCCTGGTTC Rev TGTGACAACCTCAATCTGCCC	160 bp
Hygromycin	For GTAAATAGCTGCGCCGATGGT Rev ATTGCCGTCAACCAAGCTCTGA	701 bp
GUSPlus	For CTGCCATTCGAAGCGGAAATCAAC Rev ATCCGCAAGACGCATCAACTCTTC	708 bp
VirG	For GCCGACAGCACCCAGTTCAC Rev GCCGTAAGTTTCACCTCACC	350 bp
VirD	For ATGCCCGATCGAGCTCAAGT Rev TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA	226 bp

5. Elektronischer Anhang

5.1 Tabellarische Übersicht der Transformationsversuche

Tabellarische Übersicht sämtlicher Transformationsversuche mit den Genotypen 'A 14', 'Procats' und 'Jonagold'.

5.2 DNA-Sequenzen

DNA-Sequenzen der kolumnenspezifischen Banden und der Banden, die für nicht-kolumnare Bäume spezifisch sind. Die Amplifikate wurden anhand der DNA von Bäumen aus den Nachkommenschaften 'A 14' x 'Procats', 'A10-20' x 'Pinova' und , 'Pomfital' x 'Wellant' mit den Markern 949_2 M1, 256_1 M1 und 84_1 M1 sowie dem Marker C6536-31519 (Bai et al. 2012) gewonnen.

5.3 Ergebnisse der Kapillarelektrophorese

5.3.1 PDF-Dokumente der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese von Qiaxel

5.3.2 Belegungsplan der 96er DNA-Platten Nr. 3 bis 12

5.3.3 Übersicht der untersuchten Marker

Tabellarische Übersicht der untersuchten SSR Marker an den verschiedenen 96er DNA-Platten und tabellarische Übersicht der Belegung der 96er DNA-Platten mit Individuen der Nachkommenschaften sowie der Apfelselektionen und Sorten.

6. Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: FRÜCHTE DER GEISENHEIMER APFELSORTE 'GOLDCATS' (QUELLE: INSTITUT FÜR OBSTBAU, HOCHSCHULE GEISENHEIM)	1
ABB. 2: KOLUMNARER APFELBAUM DER GEISENHEIMER SORTE 'REDCATS' (QUELLE: INSTITUT FÜR OBSTBAU, HOCHSCHULE GEISENHEIM)	4
ABB. 3: KOPPLUNGSKARTEN DES <i>CO</i> -LOKUS AUF CHROMOSOM 10 (QUELLEN: 3 A) TIAN ET AL. (2005) FIG. 3 UND 3 B) FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ ET AL. (2008) FIG. 1 A „WITH KIND PERMISSION OF SPRINGER SCIENCE AND BUSINESS MEDIA“ © SPRINGER 2005 UND © SPRINGER-VERLAG 2007; 3 C) MORIYA ET AL. (2009) FIG. 2 „REPRODUCED BY PERMISSION OF JAPANESE SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE“ JSHS © 2009; 3 D) MORIYA ET AL. (2012) FIG. 1 „WITH KIND PERMISSION OF JOHN WILEY AND SONS, INC.“ © 2012 BLACKWELL VERLAG GMBH)	11
ABB. 4: FEINKARTIERUNG DES <i>CO</i> -LOKUS AUF CHROMOSOM 10 VON BAI ET AL. (2012) (QUELLE: BAI ET AL. (2012) FIG. 1 „WITH KIND PERMISSION OF SPRINGER SCIENCE AND BUSINESS MEDIA“ © SPRINGER-VERLAG 2012)	13
ABB. 5: FEINKARTIERUNG DES <i>CO</i> -LOKUS AUF CHROMOSOM 10 VON BALDI ET AL. (2012) (QUELLE: BALDI ET AL. (2012) FIG. 2 „WITH KIND PERMISSION OF SPRINGER SCIENCE AND BUSINESS MEDIA“ © SPRINGER SCIENCE+BUSINESS MEDIA DORDRECHT 2012)	14
ABB. 6: SCHEMATISCHE ABBILDUNG DER DNA ÜBERTRAGUNG MITTELS A. <i>TUMEFACIENS</i> (QUELLE: „REPUBLISHED WITH PERMISSION OF ANNUAL REVIEWS, INC. FROM MCCULLEN & BINNS (2006) FIG. 1; PERMISSION CONVEYED THROUGH COPYRIGHT CLEARANCE CENTER, INC.“ © 2006 BY ANNUAL REVIEWS)	17
ABB. 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VEKTOREN PCAMBIA1301 UND PCAMBIA1305.1	25
ABB. 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ABLAUFES EINER TRANSFORMATION	36
ABB. 9: VERSCHIEDENE VERWUNDUNGSMETHODEN FÜR BLATTEXPLANTATE	39
ABB. 10: 100 BP LEITER (QUELLE: FERMENTAS, JETZT TEIL VON THERMO FISHER SCIENTIFIC BIOSCIENCES GMBH (ST. LEON-ROT)	47
ABB. 11: PLOIDIEGRADANALYSEN	52
ABB. 12: SPROSSREGENERATE AUF REGENERATIONSMEDIUM	54
ABB. 13: CEFOTAXIM-HALTIGES REGENERATIONSMEDIUM	54
ABB. 14: SELEKTIONSMEDIEN FÜR DIE APFELSELEKTION 'A 14'	55
ABB. 15: BLATTQUERSCHNITTE VON SPROSSREGENERATEN AUS DEN VERSUCHEN T5 UND T18	58
ABB. 16: GELELEKTROPHORESEN DER DNA AUS REGENERATEN	59
ABB. 17: TRANSFORMATION T7	63
ABB. 18: BLATTQUERSCHNITT VON SPROSSREGENERAT 1 (T7)	65
ABB. 19: GELELEKTROPHORESEN DER DNA AUS 8 REGENERATEN DER TRANSFORMATIONEN T7	65
ABB. 20: GELELEKTROPHORESEN DER DNA AUS 6 REGENERATEN DER TRANSFORMATION T87	66
ABB. 21: GUS-FÄRBUNGEN DER REGENERATE AUS BLATTEXPLANTATEN (T32, T38 UND T73)	67

ABB. 22: GUS-FÄRBUNG DER REGENERATE AUS FRAGMENTIERTEN SPROSSSPITZEN (QUELLE ABB. 22 L: BAYER (2012) ABB. 11 D)	68
ABB. 23: GELELEKTROPHORESEN DER DNA VON REGENERATEN AUS TP1 UND TP2	72
ABB. 24: BLATTQUERSCHNITTE VON SPROSSREGENERATEN	73
ABB. 25: UNTERSUCHUNG DES VEKTORKONSTRUKTES (T79, T85/T89),	75
ABB. 26: UNTERSUCHUNG DER KO-KULTURDAUER (T85 UND T89)	78
ABB. 27: GUS-TEST DER TRANSFORMATIONEN T99/T101 UND T103 ('A 14') (QUELLEN ABB. 27 A, C, D, E, G: BAYER (2012) ABB. 8 E, B, C, ABB. 9 D UND ABB. 10 A)	84
ABB. 28: GUS-TEST DER TRANSFORMATIONEN DER SORTEN 'JONAGOLD' T91 UND T104 (QUELLEN ABB. 28 A, B, D: BAYER (2012) ABB. 12 A, C, F)	86
ABB. 29: GUS-TEST DER TRANSFORMATION DER SORTEN 'JONAGOLD' T98 (5 TAGE KO-KULTUR) (QUELLEN ABB. 29 A UND C: BAYER (2012) ABB. 13 A UND D)	87
ABB. 30: GELELEKTROPHORESEN DER MARKER 949_2 M1, 256_1 M1 UND 84_1 M1	89
ABB. 31: GELELEKTROPHORESEN DER MARKER VON BAI ET AL. (2012)	89
ABB. 32: GELELEKTROPHORESE DES MARKERS C6536-31519 (BAI ET AL. 2012)	91
ABB. 33: GELELEKTROPHORESEN DER MARKER 949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1, C1753-3520, C7629-22009	92
ABB. 34: GELELEKTROPHORESEN DER MARKER 256_1 M1, 84_1 M1, C1753-3520, C7629-22009	94
ABB. 35: GELELEKTROPHORESEN DER MARKER 949_2 M1, 256_1 M1, 84_1 M1, C1753-3520, C7629- 22009, C6536-31519 UND DER SORTEN 'TOPAZ'	97
ABB. 36: ÜBERSICHT DER POSITIONIERUNG DER MARKER	115

7. Tabellenverzeichnis

TAB. 1: WELTWEITE APFELPRODUKTION IM JAHR 2011	2
TAB. 2: TAXONOMIE DES APFELS	2
TAB. 3: ERHALTUNGSMEDIEN	28
TAB. 4: GETESTETE HORMONKONZENTRATIONEN FÜR DIE REGENERATIONSMEDIEN	28
TAB. 5: 45 REGENERATIONSMEDIEN FÜR DIE APFELSELEKTIONEN 'A 14' UND 'PROCATS'	29
TAB. 6: ETABLIERTE REGENERATIONSMEDIEN FÜR 'A 14' UND 'PROCATS'	29
TAB. 7: REGENERATIONSMEDIUM FÜR DIE APFELSORTE 'JONAGOLD'	30
TAB. 8: KONZENTRATIONSTEST DER ANTIBIOTIKA	31
TAB. 9: SELEKTIONSMEDIEN FÜR 'A 14', 'PROCATS' UND 'JONAGOLD'	32
TAB. 10: FLÜSSIGE UND FESTE BAKTERIENMEDIEN	33
TAB. 11: MS20-MEDIUM	33
TAB. 12: LAKTOSE PLATTEN	35
TAB. 13: BENEDICT'S REAGENZ	35
TAB. 14: PUFFERSYSTEME FÜR DEN GUS-TEST	35
TAB. 15: ABLAUF DER TRANSFORMATION	37

TAB. 16: ÜBERSICHT DER UNTERSUCHTEN PARAMETER FÜR EINE OPTIMIERUNG DER ANZAHL GUS-POSITIVER BLATTEXPLANTATE UNTER TRANSFORMATIONSBEDINGUNGEN ('A 14')	41
TAB. 17: UNTERSUCHTE NACHKOMMENSCHAFTEN	42
TAB. 18: BSA	43
TAB. 19: UNTERSUCHTE SSR MARKER VON BAI ET AL. (2012)	45
TAB. 20: ZUSAMMENSETZUNG DER REAKTIONSANSÄTZE FÜR DIE PCR	45
TAB. 21: CYCLER-BEDINGUNGEN FÜR DIE PCR	46
TAB. 22: TAE-PUFFER UND STOP-PUFFER	47
TAB. 23: REAKTIONSANSATZ KOLONIE-PCR	50
TAB. 24: CYCLER-BEDINGUNGEN KOLONIE-PCR	50
TAB. 25: TRANSFORMATIONSPUFFER	51
TAB. 26: GETESTETE REGENERATIONSMEDIEN FÜR 'A 14' UND 'PROCATS'	53
TAB. 27: TRANSFORMATIONSVERSUCHE DER APFELSELEKTION 'A 14'	57
TAB. 28: OPTIMIERUNG DES REGENERATIONSSYSTEMS UNTER TRANSFORMATIONSBEDINGUNGEN ('A 14')	62
TAB. 29: OPTIMIERUNG DES REGENERATIONSSYSTEMS UNTER TRANSFORMATIONSBEDINGUNGEN ('PROCATS')	70
TAB. 30: UNTERSUCHUNG DES VEKTORKONSTRUKTES (T79, T85/T89)	75
TAB. 31: UNTERSUCHUNG DER VERWUNDUNGSMETHODEN (T77 UND T78)	76
TAB. 32: UNTERSUCHUNG ZUSÄTZLICHER VERWUNDUNGSMETHODEN (T83 UND T88)	76
TAB. 33: UNTERSUCHUNG DER KO-KULTURDAUER (T85 UND T89)	77
TAB. 34: UNTERSUCHUNG DER OPTISCHEN DICHTEN (T82, T 84, T86 UND T90)	79
TAB. 35: UNTERSUCHUNG DER INOKULATIONSDAUER (T92 UND T93)	79
TAB. 36: UNTERSUCHUNG VON ACETOSYRINGTON IM KO-KULTURMEDIUM (T94 UND T95)	80
TAB. 37: UNTERSUCHUNG DES BLATTALTERS (T97 UND T100)	80
TAB. 38: ERGEBNISSE DER OPTIMIERUNG DER ANZAHL GUS-POSITIVER BLATTEXPLANTATE	81
TAB. 39: OPTIMIERUNG DES REGENERATIONSSYSTEMS UND OPTIMIERUNG DER ANZAHL GUS-POSITIVER BLATTEXPLANTATE UNTER TRANSFORMATIONSBEDINGUNGEN ('A 14')	82
TAB. 40: OPTIMIERUNG DES REGENERATIONSSYSTEMS UND OPTIMIERUNG DER ANZAHL GUS-POSITIVER BLATTEXPLANTATE UNTER TRANSFORMATIONSBEDINGUNGEN ('JONAGOLD')	85
TAB. 41: ÜBERSICHT DER DREI NEU ENTWICKELTEN SSR MARKER	88
TAB. 42: ÜBERSICHT DER UNTERSUCHUNG DER INDIVIDUEN DER NACHKOMMENSCHAFTEN	90
TAB. 43: UNTERSUCHUNG DER APFELSELEKTIONEN UND SORTEN MIT DEN MARKERN	95
TAB. 44: ÜBERSICHT DER UNTERSUCHUNG DER SORTE 'TOPAZ' MIT DEN MARKERN	96
TAB. 45: ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN	125
TAB. 46: VERWENDETE CHEMIKALIEN	126
TAB. 47: VERWENDETE GERÄTE	127
TAB. 48: PRIMERSEQUENZEN	128

8. Literatur

- Aldwinckle, H. S., & Malnoy, M. (2009). Plant regeneration and transformation in the Rosaceae. *Transgenic plant journal*, (3), 1–39.
- Alt-Moerbe, J., Neddermann, P., Vonlintig, J., Weiler, E. W., & Schroder, J. (1988). Temperature-Sensitive Step in Ti Plasmid Vir-Region Induction and Correlation with Cytokinin Secretion by *Agrobacteria*. *Molecular & General Genetics*, 213(1), 1-8.
- Alwen, A., Moreno, R. M. B., Vicente, O., & Heberle-Bors, E. (1992). Plant endogenous β -glucuronidase activity: how to avoid interference with the use of the *E. coli* β -glucuronidase as a reporter gene in transgenic plants. *Transgenic Research*, 1(2), 63-70.
- Arabidopsis Genom Initiative, (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796.
- Atienzar, F. A., & Jha, A. N. (2006). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat Res*, 613(2-3), 76-102.
- Badstieber, L. (2009). *Molekular- und cytogenetische Untersuchungen am Kolumnar-Gen (Co) von Malus x domestica Borkh.* (Masterarbeit), FA Geisenheim.
- Bai, T., Zhu, Y., Fernández-Fernández, F., Keulemans, J., Brown, S., & Xu, K. (2012). Fine genetic mapping of the *Co* locus controlling columnar growth habit in apple. *Mol Genet Genomics*, 287(5), 437-450.
- Baldi, P., Wolters, P. J., Komjanc, M., Viola, R., Velasco, R., & Salvi, S. (2012). Genetic and physical characterisation of the locus controlling columnar habit in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*, (31) 429–440.
- Barciszewski, J., Rattan, S. I. S., Siboska, G., & Clark, B. F. C. (1999). Kinetin - 45 years on. *Plant Science*, 148(1), 37-45.
- Baron, C., Domke, N., Beinhofer, M., & Hapfelmeier, S. (2001). Elevated Temperature Differentially Affects Virulence, VirB Protein Accumulation, and T-Pilus Formation in Different *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis* Strains. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6852-6861.
- Baron, C., & Zambryski, P. C. (1995). The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annual review of genetics*, 29(1), 107-129.
- Bartels, H. (1971). Genetic control of multiple esterases from needles and macrogametophytes of *Picea abies*. *Planta*, 99(4), 283-289.
- Bayer, E. (2012). *Optimierung eines Agrobakterien-vermittelten Transformationssystems beim Apfel.* (Bachelorarbeit), Institut für Botanik, Hochschule Geisenheim.
- Benfey, P. N., & Chua, N.-H. (1990). The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science (New York, NY)*, 250(4983), 959.
- Benfey, P. N., Ren, L., & Chua, N.-H. (1989). The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J*, 8(8), 2195.
- Bergmann, F. (1973). Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 43(5), 222-225.
- Bergmann, F., & Leinemann, L. (2000). Nutzen molekularer Marker bei der Ausweisung von Genreservaten (Genressourcen). *Forstliche Genreservate. Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf*. S, 115-120.
- Bernaerts, M., & De Ley, J. (1967). Mechanism of the 3-ketolactose test for *Agrobacterium*. *Archiv für Mikrobiologie*, 56(1), 81-90.

- Bertani, G. (1951). STUDIES ON LYSOGENESIS I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293.
- Bhatti, S., & Jha, G. (2010). Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple. *Plant Cell Rep*, 29(11), 1215-1225.
- Binns, A. N. (1994). Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic, and molecular approaches. *Annual review of plant biology*, 45(1), 173-196.
- Binns, A. N., Beaupre, C. E., & Dale, E. M. (1995). Inhibition of VirB-mediated transfer of diverse substrates from *Agrobacterium tumefaciens* by the IncQ plasmid RSF1010. *Journal of Bacteriology*, 177(17), 4890-4899.
- Borejsza-Wysocka, E. E., Norelli, J. L., Aldwinckle, H. S., & Ko, K. (1998). *Transformation of authentic M. 26 apple rootstock for enhanced resistance to fire blight*. Paper presented at the VIII International Workshop on Fire Blight 489.
- Boyer, J., & Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J*, 3(5), 12.
- Braun, A. C. (1952). Conditioning of the host cell as a factor in the transformation process in crown gall. *Growth*, 16(2), 65.
- Breese, E. L., & Mather, K. (1957). The organisation of polygenic activity within a chromosome in *Drosophila*. *Heredity*, 11, 373-395.
- Brencic, A., Angert, E. R., & Winans, S. C. (2005). Unwounded plants elicit *Agrobacterium vir* gene induction and T-DNA transfer: transformed plant cells produce opines yet are tumour free. *Mol Microbiol*, 57(6), 1522-1531.
- Broothaerts, W., Mitchell, H. J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L. M. A., Yang, W., Mayer, J. E., Roa-Rodríguez, C., & Jefferson, R. A. (2005). Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, 433(7026), 629-633.
- Bulley, S. M. W., & James, D. J. (2004). Regeneration and genetic transformation of apple (*Malus* spp.). *Transgenic Crops of the World*, 199-214.
- Bundock, P., van Attikum, H., den Dulk-Ras, A., & Hooykaas, P. J. J. (2002). Insertional mutagenesis in yeasts using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Yeast*, 19(6), 529-536.
- Caboni, E., Lauri, P., & D'Angeli, S. (2000). In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Reports*, 19(8), 755-760.
- Camus, G. (1949). *Recherches sur le role des bourgeons dans les phenomenes de morphogenese*. Sc. nat. Paris. 1949.
- Cangelosi, G. A., Ankenbauer, R. G., & Nester, E. W. (1990). Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(17), 6708-6712.
- Cangelosi, G. A., Martinetti, G., Leigh, J. A., Lee, C. C., Thienes, C., & Nester, E. W. (1989). Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA Protein in Export of β -1, 2-glucan. *Journal of Bacteriology*, 171(3), 1609.
- Cevik, V., & King, G. (2002). High-resolution genetic analysis of the *Sd-1* aphid resistance locus in *Malus* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(2-3), 346-354.
- Cheng, C., Daigen, M., & Hirochika, H. (2006). Epigenetic regulation of the rice retrotransposon *Tos17*. *Molecular Genetics and Genomics*, 276(4), 378-390.
- Chmielewski, F.-M. (2011). Der Einfluss des Klimawandels auf den Wirtschaftssektor Landwirtschaft *Klimabericht für die Metropolregion Hamburg* (211-227): Springer.
- Christie, P. J. (2004). Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3), 219-234.

- Conner, P. J., Brown, S. K., & Weeden, N. F. (1997). Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(3), 350-359.
- Conner, P. J., Brown, S. K., & Weeden, N. F. (1998). Molecular-marker analysis of quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(8), 1027-1035.
- Cornille, A., Gladieux, P., Smulders, M. J., Roldan-Ruiz, I., Laurens, F., Le Cam, B., Giraud, T. (2012). New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genet*, 8(5), e1002703.
- Costa, M. S., Miguel, C., & Oliveira, M. M. (2006). An improved selection strategy and the use of acetosyringone in shoot induction medium increase almond transformation efficiency by 100-fold. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85(2), 205-209.
- Dan, Y., Armstrong, C. L., Dong, J., Feng, X., Fry, J. E., Keithly, G. E., Tan, L. J. (2009). Lipoic acid - an unique plant transformation enhancer. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(6), 630-638.
- Dandekar, A. M. (1992). Transformation. *Biotechnology of perennial fruit crops*, 141-168.
- Davis, M. E., Miller, A. R., & Lineberger, D. (1991). Temporal competence for transformation of *Lycopersicon esculentum* (L. Mill.) cotyledons by *Agrobacterium tumefaciens*: relation to wound-healing and soluble plant factors. *Journal of experimental botany*, 42(3), 359-364.
- De Bondt, A., Eggermont, K., Druart, P., De Vil, M., Goderis, I., Vanderleyden, J., & Broekaert, W. F. (1994). *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus × domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Reports*, 13(10), 587-593.
- De Bondt, A., Eggermont, K., Penninckx, I., Goderis, I., & Broekaert, W. F. (1996). *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 15(7), 549-554.
- De Cleene, M., & De Ley, J. (1976). The host range of crown gall. *The Botanical Review*, 42(4), 389-466.
- De Framond, A. J., Barton, K. A., & Chilton, M. D. (1983). Mini-Ti: a new vector strategy for plant genetic engineering. *Nature Biotechnology*, 1(3), 262-269.
- Degenhardt, J., Poppe, A., Montag, J., & Szankowski, I. (2006). The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. *Plant Cell Reports*, 25(11), 1149-1156.
- Degenhardt, J., & Szankowski, I. (2006). Transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using the phosphomannose isomerase gene as a selectable marker. *Acta horticulturae*, 725(2), 811.
- Dolgov, S. V., Schestibratov, K. A., & Mikhailov, R. V. (2003). *Apple transformation with the gene of supersweet protein thaumatin II*. Paper presented at the XI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics 663.
- Doty, S. L., Chang, M., & Nester, E. W. (1993). The chromosomal virulence gene, *chvE*, of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by a LysR family member. *Journal of Bacteriology*, 175(24), 7880.
- Douglas, C., Halperin, W., Gordon, M., & Nester, E. (1985). Specific attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to bamboo cells in suspension cultures. *Journal of Bacteriology*, 161(2), 764.
- Douglas, C. J., Halperin, W., & Nester, E. W. (1982). *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cells. *Journal of Bacteriology*, 152(3), 1265.

- Draper, J., Scott, R., Armitage, P., & Walden, R. (1988). *Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual*: Blackwell Scientific Publications.
- Eimert, K., Reutter, G., & Strolka, B. (2003). Fast and reliable detection of doubled-haploids in *Asparagus officinalis* by stringent RAPD-PCR. *The Journal of Agricultural Science*, 141(01), 73-78.
- Escarpa, A., & Gonzalez, M. C. (1998). High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. [Comparative Study]. *J Chromatogr A*, 823(1-2), 331-337.
- Escudero, J., & Hohn, B. (1997). Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. *The Plant Cell Online*, 9(12), 2135-2142.
- Eurobarometer. (2006). Risk Issues: European Commission.
- Faircloth, B. C. (2008). msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 92-94.
- FAO (2013) Food and Agriculture Organization
<http://faostat.fao.org/site/567/Desktopdefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- Fasolo, F., Zimmerman, R. H., & Fordham, I. (1989). Adventitious Shoot Formation on Excised Leaves of In Vitro Grown Shoots of Apple Cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 16(2), 75-87.
- Fernández-Fernández, F., Evans, K. M., Clarke, J. B., Govan, C. L., James, C. M., Marič, S., & Tobutt, K. R. (2008). Development of an STS map of an interspecific progeny of *Malus*. *Tree Genetics & Genomes*, 4(3), 469-479.
- Ferreira, F. J., & Kieber, J. J. (2005). Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 8(5), 518-525.
- Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., & Valè, G. (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(3), 317-342.
- Friedrich, A. S. (2005). *Untersuchungen zu Kultivierung, Transformation und Fermentation von Wolffia spec.* (Dissertation), Universität Bonn.
- Fullner, K. J., & Nester, E. W. (1996). Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 178(6), 1498-1504.
- Gahan, P. B., & George, E. F. (2008). Adventitious regeneration. *Plant propagation by tissue culture. Volume 1: the background*(Ed. 3), 355-401.
- Galli, P., Broggin, G. A. L., Kellerhals, M., Gessler, C., & Patocchi, A. (2010). High-resolution genetic map of the *Rvi15 (Vr2)* apple scab resistance locus. *Molecular Breeding*, 26(4), 561-572.
- Gambino, G., & Gribaudo, I. (2012). Genetic transformation of fruit trees: current status and remaining challenges. *Transgenic Res*, 21(6), 1163-1181.
- Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annual review of plant biology*, 51(1), 223-256.
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37.
- Giovannoni, J. (2010). Harvesting the apple genome. *Nat Genet*, 42(10), 822-823.
- Glaubitz, J. C., Moran, G. F., Young, A., Boshier, D., & Boyle, T. (2000). Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers. *Forest conservation genetics: principles and practice*, 39-59.
- Grandbastien, M.-A., Spielmann, A., & Caboche, M. (1989). Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Cytogenet. Genome Res.* 110:229-41.

- Grevelding, C., Fantes, V., Kemper, E., Schell, J., & Masterson, R. (1993). Single-copy T-DNA insertions in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in root-derived transgenics, whereas multiple insertions are found in leaf discs. *Plant Molecular Biology*, 23(4), 847-860.
- Grodzicker, T., Williams, J., Sharp, P., & Sambrook, J. (1974). *Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses*. Paper presented at the Cold Spring Harb Symp Quant Biol.
- Hadrys, H., Balick, M., & Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol*, 1(1), 55-63.
- Hemmat, M., Weeden, N. F., Conner, P. J., & Brown, S. K. (1997). A DNA marker for columnar growth habit in apple contains a simple sequence repeat. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(3), 347-349.
- Herrera-Estrella, L., Simpson, J., & Martínez-Trujillo, M. (2005). Transgenic plants. *Transgenic Plants: Methods and Protocols*, 286, 3.
- Hodal, L., Bocharadt, A., Nielsen, J. E., Mattsson, O., & Okkels, F. T. (1992). Detection, expression and specific elimination of endogenous β -glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic plants. *Plant Science*, 87(1), 115-122.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., & Schilperoort, R. A. (1983). A Binary Plant Vector Strategy Based on Separation of Vir-Region and T-Region of the *Agrobacterium-Tumefaciens* Ti-Plasmid. *Nature*, 303(5913), 179-180.
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T., & Chilton, M. D. (1986). The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology*, 168(3), 1291-1301.
- Howell, S. H., Lall, S., & Che, P. (2003). Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Sci*, 8(9), 453-459.
- Huetteman, C. A., & Preece, J. E. (1993). Thidiazuron - a Potent Cytokinin for Woody Plant-Tissue Culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 33(2), 105-119.
- Hwang, H. H., & Gelvin, S. B. (2004). Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *The Plant Cell*, 16(11), 3148-3167.
- Jacq, B., Lesobre, O., Sangwan, R. S., & Sangwan-Norreel, B. S. (1993). Factors influencing T-DNA transfer in *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarbeet. *Plant Cell Reports*, 12(11), 621-624.
- James, D. J., & Dandekar, A. M. (1991). Regeneration and transformation of apple (*Malus pumila* Mill.). *Plant tissue culture manual: fundamentals and applications*. Kluwer, Dordrecht, 1-18.
- James, D. J., Passey, A. J., Barbara, D. J., & Bevan, M. (1989). Genetic-Transformation of Apple (*Malus-Pumila* Mill) Using a Disarmed Ti-Binary Vector. *Plant Cell Rep*, 7(8), 658-661.
- James, D. J., Passey, A. J., & Rugini, E. (1988). Factors Affecting High Frequency Plant Regeneration from Apple Leaf Tissues Cultured *in vitro*. *Journal of plant physiology*, 132(2), 148-154.
- Janssen, B.-J., & Gardner, R. C. (1990). Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Molecular Biology*, 14(1), 61-72.
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant molecular biology reporter*, 5(4), 387-405.
- Jiang, N., Bao, Z., Zhang, X., Eddy, S. R., & Wessler, S. R. (2004). Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature*, 431(7008), 569-573.

- Jiang, N., Jordan, I. K., & Wessler, S. R. (2002). *Dasheng* and *RIRE2*. A nonautonomous long terminal repeat element and its putative autonomous partner in the rice genome. *Plant physiology*, 130(4), 1697-1705.
- Jin, S., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1990, b). The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for *vir* gene regulation. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 525-530.
- Jin, S. G., Prusti, R. K., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G., & Nester, E. W. (1990, a). Phosphorylation of the VirG Protein of *Agrobacterium-Tumefaciens* by the Autophosphorylated VirA Protein - Essential Role in Biological-Activity of VirG. *Journal of Bacteriology*, 172(9), 4945-4950.
- Jordan, S. A., & Humphries, P. (1994). Single nucleotide polymorphism in exon 2 of the BCP gene on 7q31-q35. *Human molecular genetics*, 3(10), 1915-1915.
- Jouanin, L., Bouchez, D., Drong, R. F., Tepfer, D., & Slightom, J. L. (1989). Analysis of Tr-DNA Plant Junctions in the Genome of a *Convolvulus-Arvensis* Clone Transformed by *Agrobacterium-Rhizogenes* Strain-A4. *Plant Molecular Biology*, 12(1), 75-85.
- Kazazian, H. H., & Moran, J. V. (1998). The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nature genetics*, 19(1), 19-24.
- Kemner, J. M., Liang, X., & Nester, E. W. (1997). The *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene *chvE* is part of a putative ABC-type sugar transport operon. *Journal of Bacteriology*, 179(7), 2452.
- Keulemans, J., & 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(1), 135-139.
- Khush, G. S., & Rick, C. M. (1963). Meiosis in Hybrids between *Lycopersicon Esculentum* and *Solanum Pennellii*. *Genetica*, 33(3), 167-183.
- Kim, M. Y., Song, K. J., Hwang, J.-H., Shin, Y.-U., & Lee, H. J. (2003). Development of RAPD and SCAR markers linked to the Co gene conferring columnar growth habit in apple (*Malus pumila* Mill.). *Journal of horticultural science & biotechnology*, 78(4), 512-517.
- Klee, H. J., & Rogers, S. G. (1989). Plant gene vectors and genetic transformation: plant transformation systems based on the use of *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 6, 1-23.
- Knust, E., & Janning, W. (2008). *Genetik: Allgemeine Genetik-Molekulare Genetik-Entwicklungsgenetik*: Thieme.
- Ko, K., Brown, S. K., Norelli, J. L., & Aldwinckle, H. S. (1998). Alterations in *nptII* and *gus* expression following micropropagation of transgenic M. 7 apple rootstock lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(1), 11-18.
- Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., & Hirochika, H. (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*, 304(5673), 982-982.
- Korban, S. S., Chen, H., Hammerschlag, F. A., & Litz, R. E. (1992). Apple. *Biotechnology of perennial fruit crops*, 203-227.
- Krost, C., Petersen, R., Lokan, S., Brauksiepe, B., Braun, P., & Schmidt, E. R. (2013). Evaluation of the hormonal state of columnar apple trees (*Malus x domestica*) based on high throughput gene expression studies. *Plant Molecular Biology*, 81(3), 211-220.
- Krost, C., Petersen, R., & Schmidt, E. R. (2012). The transcriptomes of columnar and standard type apple trees (*Malus x domestica*) - A comparative study. *Gene*, 498(2), 223-230.
- Kumar, A., & Bennetzen, J. L. (1999). Plant retrotransposons. *Annual review of genetics*, 33(1), 479-532.

- Lai, E.-M., Chesnokova, O., Banta, L. M., & Kado, C. I. (2000). Genetic and Environmental Factors Affecting T-Pilin Export and T-Pilus Biogenesis in Relation to Flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 182(13), 3705-3716.
- Lane, W. D., Looney, N. E., & Mage, F. (1982). A Selective Tissue-Culture Medium for Growth of Compact (Dwarf) Mutants of Apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 61(3), 219-223.
- Lapins, K. O. (1974). Spur type growth habit in 60 apple progenies. *Journal American Society for Horticultural Science*, 99.
- Lapins, K. O. (1976). Inheritance of compact growth type in apple. *Journal American Society for Horticultural Science*, 101.
- Lee, J. M., & Looney, N. E. (1977). Abscisic acid levels and genetic compaction in apple seedlings. *Canadian Journal of Plant Science*, 57(1), 81-85.
- Liebhart, R. (2002). Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*, 10(4), 217-241.
- Lisch, D. (2009). Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annual review of plant biology*, 60, 43-66.
- Litz, R. E. (1992). *Organogenesis and somatic embryogenesis*. Paper presented at the II International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 336.
- Litz, R. E., & Gray, D. J. (1992). Organogenesis and somatic embryogenesis. In: Hammerschlag F. A., Litz R. E. (eds) *Biotechnology of perennial fruit crops*. CAB International, Wallingford, UK, 3-34
- Liu, J. R., Sink, K. C., & Dennis, F. G. (1983). Plant regeneration from apple seedling explants and callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2(4), 293-304.
- Liu, Q., Salih, S., & Hammerschlag, F. (1998). Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots promotes high-frequency shoot organogenesis and enhanced β -glucuronidase expression from stem internodes. *Plant Cell Reports*, 18(1-2), 32-36.
- Liu, R. H., Eberhardt, M. V., & Lee, C. Y. (2001). Antioxidant and antiproliferative activities of selected New York apple cultivars. *New York Fruit Quarterly*, 9(2), 15-17.
- Liu, Y.-G., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S., & Shibata, D. (1999). Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), 6535.
- Looney, N. E., & Lane, W. D. (1983). *Spur-type growth mutants of McIntosh apple: a review of their genetics, physiology and field performance*. Paper presented at the International Workshop on Controlling Vigor in Fruit Trees 146.
- Luby, J. (2003). Taxonomy, classification and brief history. In D. C. Ferree & I. J. Warrington (Eds.), *Apples: Botany, Production and Uses* (1-14). Cambridge, Massachusetts, USA: CABI.
- Maheswaran, M. (2004). Molecular Markers: History Features and Applications. *Advanced Biotech August*.
- Maliepaard, C., Alston, F. H., van Arkel, G., Brown, L. M., Chevreau, E., Dunemann, F., King, G. J. (1998). Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(1-2), 60-73.
- Malnoy, M., Boresjza-Wysocka, E. E., Norelli, J. L., Flaishman, M. A., Gidoni, D., & Aldwinckle, H. S. (2010). Genetic transformation of apple (*Malus x domestica*) without use of a selectable marker gene. *Tree Genetics & Genomes*, 6(3), 423-433.

- Masuda, T., Bessho, H., Komori, S., & Tsuchiya, S. (1988). Studies on cell culture and plant regeneration in apple, 2: Adventitious shoot formation from the roots of intact micropropagated plantlets. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station. Series C. Morioka*.
- Matthysse, A. G., Yarnall, H. A., & Young, N. (1996). Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 178(17), 5302.
- Maximova, S. N., Dandekar, A. M., & Gultinan, 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 Molecular Biology*, 37(3), 549-559.
- Mayer, B., Schumacher, M., Brandstatter, H., Wagner, F. S., & Hermetter, A. (2001). High-throughput fluorescence screening of antioxidative capacity in human serum. *Anal Biochem*, 297(2), 144-153.
- McCullen, C. A., & Binns, A. N. (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 101-127.
- McGaw, B. A., & Burch, L. R. (1995). Cytokinin biosynthesis and metabolism. *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*, 98-117.
- Messens, E., Dekeyser, R., & Stachel, S. E. (1990). A nontransformable *Triticum monococcum* monocotyledonous culture produces the potent *Agrobacterium vir*-inducing compound ethyl ferulate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(11), 4368-4372.
- Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Nishimiya, S. (1996). Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in Dicotyledonous and Monocotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology*, 37(1), 49-59.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T. G., Yano, M., Bhatia, C. R., & Sasaki, T. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3(2), 87-103.
- Moriya, S., Iwanami, H., Kotoda, N., Takahashi, S., Yamamoto, T., & Abe, K. (2009). Development of a Marker-assisted Selection System for Columnar Growth Habit in Apple Breeding. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 78(3), 279-287.
- Moriya, S., Okada, K., Haji, T., Yamamoto, T., & Abe, K. (2012). Fine mapping of *Co*, a gene controlling columnar growth habit located on apple (*Malus × domestica* Borkh.) linkage group 10. *Plant Breeding*, 131(5), 641-647.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murata, M., Haruta, M., Murai, N., Tanikawa, N., Nishimura, M., Homma, S., & Itoh, Y. (2000). Transgenic apple (*Malus × domestica*) shoot showing low browning potential. *J Agric Food Chem*, 48(11), 5243-5248.
- Mysore, K. S., Kumar, C. T., & Gelvin, S. B. (2001). *Arabidopsis* ecotypes and mutants that are recalcitrant to *Agrobacterium* root transformation are susceptible to germ-line transformation. *The Plant Journal*, 21(1), 9-16.
- Mysore, K. S., Nam, J., & Gelvin, S. B. (2000). An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 948-953.

- Nam, J., Matthysse, A. G., & Gelvin, S. B. (1997). Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *The Plant Cell Online*, 9(3), 317-333.
- Nam, J., Mysore, K. S., Zheng, C., Knue, M. K., Matthysse, A. G., & Gelvin, S. B. (1999). Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *Molecular and General Genetics MGG*, 261(3), 429-438.
- Ng, M., & Yanofsky M. F. (2001). Activation of the *Arabidopsis* B Class Homeotic Genes by *APETALA1*. *The Plant Cell*, 13, 739-753.
- Nitsch, J. P., & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163(3862), 85-87.
- Nobécourt, P. (1939). Sur les radicules naissant des cultures de tissus végétaux. *CR Seances Soc. Biol. Ses Fil*, 130, 1271-1272.
- Norelli, J., Mills, J., & Aldwinckle, H. (1996). Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Hortscience*, 31(6), 1026-1027.
- Ooms, G., Hooykaas, P. J. J., Van Veen, R. J. M., Van Beelen, P., Regensburg-Tuïnk, T. J. G., & Schilperoort, R. A. (1982). Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, 7(1), 15-29.
- Ottaviani, M.-P., Smits, T., & Hänisch ten Cate, C. H. (1993). Differential methylation and expression of the β -glucuronidase and neomycin phosphotransferase genes in transgenic plants of potato cv. Bintje. *Plant Science*, 88(1), 73-81.
- Otto, D. (unveröffentlicht). *Molekulare Charakterisierung des Co Lokus von Malus x domestica*. (Dissertation), Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Otto D., Petersen. R., Krost C., Brandl R., Brauksiepe B., Braun P., & Schmidt E. R. (2013). Molecular characterization of the *Co* gene region in *Malus x domestica*. *Acta Hort (In press)*.
- Palmer, A. G., Gao, R., Maresh, J., Erbil, W. K., & Lynn, D. G. (2004). Chemical biology of multi-host/pathogen interactions: chemical perception and metabolic complementation. *Annu Rev Phytopathol*, 42, 439-464.
- Parravicini, G., Gessler, C., Denancé, C., Lasserre-Zuber, P., Vergne, E., Brisset, M.-N., Broggin, G. A. L. (2011). Identification of serine/threonine kinase and nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar 'Evereste'. *Mol Plant Pathol*, 12(5), 493-505.
- Patel, V., Kaswala, R., Chakraborty, M., & Kamath, J. V. (2012). Phytochemical and Pharmacological Profile of *Malus Domestica*: An Overview. *Int J Cur Biomed Phar Res*, 2(2), 334-338.
- Patocchi, A., Vinatzer, B. A., Gianfranceschi, L., Tartarini, S., Zhang, H.-B., Sansavini, S., & Gessler, C. (1999). Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple scab resistance gene *Vf*. *Molecular and General Genetics MGG*, 262(4-5), 884-891.
- Pawlicki-Jullian, N., Sedira, M., & Welander, M. (2002). The use of *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots to obtain transgenic shoots of the apple rootstock Jork 9. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 70(2), 163-171.
- Perez, T., Alborno, J., & Dominguez, A. (2002). An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, 7(10), 1347-1357.
- Petersen, R. (unveröffentlicht). *Molekulargenetische Ursachen des Kolumnarwachstums bei Apfelbäumen*. (Dissertation), Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Powell, W., Machray, G. C., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7), 215-222.

- Pua, E.-C. (1994). Expression Variability of Marker Genes during Plant Regeneration from Protoplasts of R1 Transgenic Mustard (*Brassica juncea*) Via Somatic Embryogenesis. *Journal of plant physiology*, 143(3), 363-371.
- Rao, R. N., Allen, N. E., Hobbs, J. N., Alborn, W. E., Kirst, H. A., & Paschal, J. W. (1983). Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 24(5), 689-695.
- Rick, C. M. (1963). Differential Zygotic Lethality in a Tomato Species Hybrid. *Genetics*, 48(11), 1497-1507.
- Ritchie, S. W., Lui, C.-N., Sellmer, J. C., Kononowicz, H., Hodges, T. K., & Gelvin, S. B. (1993). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated expression of *gusA* in maize tissues. *Transgenic Research*, 2(5), 252-265.
- Robinson, J. P., Harris, S. A., & Juniper, B. E. (2001). Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Systematics and Evolution*, 226(1), 35-58.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 365-386): Springer.
- Rugini, E., & Muganu, M. (1998). A novel strategy for the induction and maintenance of shoot regeneration from callus derived from established shoots of apple [*Malus* × *Domestica* Borkh.] cv. Golden Delicious. *Plant Cell Reports*, 17(6), 581-585.
- Sanford, J. C., Smith, F. D., & Russell, J. A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in enzymology*, 217, 483-509.
- Sangwan, R. S., Bourgeois, Y., Brown, S., Vasseur, G., & Sangwan-Norreel, B. (1992). Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 188(3), 439-456.
- SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.-K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Avramova, Z. (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*, 274(5288), 765-768.
- Sarwar, M., & Skirvin, R. M. (1997). Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) in vitro. *Scientia horticultrae*, 68(1), 95-100.
- Sarwar, M., Skirvin, R. M., Kushad, M., & Norton, M. A. (1998). Selecting dwarf apple (*Malus* × *domestica* Borkh) trees in vitro: multiple cytokinin tolerance expressed among three strains of 'McIntosh' that differ in their growth habit under field conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 54(2), 71-76.
- Schnurr, J. A., & Guerra, D. J. (2000). The CaMV-35S promoter is sensitive to shortened photoperiod in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*, 19(3), 279-282.
- Schwan, U. (unveröffentlicht). „Identifizierung und funktionelle Charakterisierung des Co(Kolumnar)-Gens bei kolumnaren Apfelsorten zur systematischen Nutzung in der Züchtung“. (Dissertation), Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Sedira, M. (2006). Studies of adventitious root formation in woody species. (Dissertation), Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp.
- Seong, E. S., Song, K. J., Jegal, S., Yu, C. Y., & Chung, I. M. (2005). Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine affect *Agrobacterium*-mediated apple transformation. *Plant Growth Regulation*, 45(1), 75-82.
- Sessions, A., Weigel, D., & Yanofsky, M. F. (1999). The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *The Plant Journal*, 20(2), 259-263.
- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H., & Galbraith, D. W. (1995). Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *The Plant Journal*, 8(5), 777-784.

- Shen, W.-H., Escudero, J., Schläppi, M., Ramos, C., Hohn, B., & Koukolíková-Nicola, Z. (1993). T-DNA transfer to maize cells: histochemical investigation of β -glucuronidase activity in maize tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4), 1488-1492.
- Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y., & Machida, Y. (1990). Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(17), 6684-6688.
- Smith, E. F., & Townsend, C. O. (1907). A Plant-Tumor of Bacterial Origin. *Science*, 25(643), 671-673.
- Sriskandarajah, S., Goodwin, P. B., & Speirs, J. (1994). Genetic transformation of the apple scion cultivar 'Delicious' via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36(3), 317-329.
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M., & 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.
- Stephens, S. G. (1949). The cytogenetics of speciation in *Gossypium*. I. Selective elimination of the donor parent genotype in interspecific backcrosses. *Genetics*, 34(5), 627.
- Stoye, N. M. (2012). *Optimierung von Transformationsprotokollen beim Apfel*. (Diplomarbeit), Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Studer, A., Zhao, Q., Ross-Ibarra, J., & Doebley, J. (2011). Identification of a functional transposon insertion in the maize domestication gene *tb1*. *Nature genetics*, 43(11), 1160-1163.
- Sugiyama, M. (1999). Organogenesis *in vitro*. *Curr Opin Plant Biol*, 2(1), 61-64.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J. D., Dean, C., Martienssen, R. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & development*, 9(14), 1797-1810.
- Szankowski, I. (2002). *Entwicklung und Analyse transgener Apfelpflanzen mit dem vst1-Gen aus Vitis vinifera L. und dem PGIP-Gen aus Actinidia deliciosa*. (Dissertation), Universität Hannover.
- Szankowski, I., Waidmann, S., Degenhardt, J., Patocchi, A., Paris, R., Silfverberg-Dilworth, E., Gessler, C. (2009). Highly scab-resistant transgenic apple lines achieved by introgression of *HcrVf2* controlled by different native promoter lengths. *Tree Genetics & Genomes*, 5(2), 349-358.
- Tanksley, S. D., & Rick, C. M. (1980). Isozymic gene linkage map of the tomato: applications in genetics and breeding. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 58(2), 161-170.
- Tempe, J., & Petit, A. (1982). Opine utilization by *Agrobacterium*. *Molecular biology of plant tumors*, 451-459.
- Thomashow, M. F., Karlinsey, J. E., Marks, J. R., & Hurlbert, R. E. (1987). Identification of a new virulence locus in *Agrobacterium tumefaciens* that affects polysaccharide composition and plant cell attachment. *Journal of Bacteriology*, 169(7), 3209.
- Tian, Y.-K., Wang, C.-H., Zhang, J.-S., James, C., & Dai, H.-Y. (2005). Mapping *Co*, a gene controlling the columnar phenotype of apple, with molecular markers. *Euphytica*, 145(1-2), 181-188.
- Tobutt, K. R. (1984). *Breeding columnar apples at East Malling*. Paper presented at the Conference on Temperate Tree Fruits and Nuts Breeding 159.
- Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 17(2), 147-154.

- Tzfira, T., Vaidya, M., & Citovsky, V. (2001). VIP1, an Arabidopsis protein that interacts with Agrobacterium VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and Agrobacterium infectivity. *EMBO J*, 20(13), 3596-3607.
- Vallejos, C. E., & Tanksley, S. D. (1983). Segregation of Isozyme Markers and Cold Tolerance in an Interspecific Backcross of Tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 66(3-4), 241-247.
- Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F., & Pool-Zobel, B. L. (2006). Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog*, 45(3), 164-174.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Viola, R. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nat Genet*, 42(10), 833-839.
- Vergunst, A. C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C. M., Regensburg-Tuïnk, T. J., & Hooykaas, P. J. (2000). VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science*, 290(5493), 979-982.
- Vergunst, A. C., van Lier, M. C. M., den Dulk-Ras, A., Stüve, T. A. G., Ouwehand, A., & Hooykaas, P. J. J. (2005). Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), 832-837.
- Vijayachandra, K., Palanichelvam, K., & Veluthambi, K. (1995). Rice scutellum induces *Agrobacterium tumefaciens* vir genes and T-strand generation. *Plant Molecular Biology*, 29(1), 125-133.
- Viss, W. J., Pitrak, J., Humann, J., Cook, M., Driver, J., & Ream, W. (2003). Crown-gall-resistant transgenic apple trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes. *Molecular Breeding*, 12(4), 283-295.
- Wang, A., Aldwinckle, H., Forsline, P., Main, D., Fazio, G., Brown, S., & Xu, K. (2012). EST contig-based SSR linkage maps for *Malus × domestica* cv Royal Gala and an apple scab resistant accession of *M. sieversii*, the progenitor species of domestic apple. *Molecular Breeding*, 29(2), 379-397.
- Watanabe, M., Bessho, H., Suzuki, A., & Komori, S. (2006). *Seasonal changes of IAA and cytokinin in shoots of columnar type apple trees*. Paper presented at the XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Endogenous and Exogenous Plant Bioregulators 774.
- Watanabe, M., Suzuki, A., Komori, S., & Bessho, H. (2004). Comparison of endogenous IAA and cytokinins in shoots of columnar and normal type apple trees. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 73:19-24.
- Waterhouse, P. M., Graham, M. W., & Wang, M. B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23), 13959-13964.
- Way, R. D., Aldwinckle, H. S., Lamb, R. C., Rejman, A., Sansavini, S., Shen, T., Yoshida, Y. (1991). Apples (*Malus*). *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops* 290, 3-46.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants: Principles, methods, and applications*: Boca Raton: CRC Press.
- Welander, M. (1988). Plant Regeneration from Leaf and Stem Segments of Shoots Raised *in vitro* from Mature Apple Trees. *Journal of plant physiology*, 132(6), 738-744.
- Welander, M., & Maheswaran, G. (1992). Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks. *Journal of plant physiology*, 140(2), 223-228.

- Welander, M., Pawlicki, N., Holefors, A., & Wilson, F. (1998). Genetic transformation of the apple rootstock M26 with the *RoLb* gene and its influence on rooting. *Journal of plant physiology*, 153(3), 371-380.
- Werbrouck, S. P. O., Strnad, M., Van Onckelen, H. A., & Debergh, P. C. (2008). Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum*, 98(2), 291-297.
- Wicker, T., & Keller, B. (2007). Genome-wide comparative analysis of copia retrotransposons in Triticeae, rice, and *Arabidopsis* reveals conserved ancient evolutionary lineages and distinct dynamics of individual copia families. *Genome research*, 17(7), 1072-1081.
- Wilson, F. M., & James, D. J. (2003). Regeneration and transformation of the premier UK apple (*Malus × pumila* Mill.) cultivar Queen Cox. *Journal of horticultural science & biotechnology*, 78(5), 656-662.
- Wirawan, I., & Kojima, M. (1996). Distribution of a Chromosomal Virulence Gene, *acvB*, of *Agrobacterium tumefaciens* among Various Bacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60(1), 50-53.
- Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem*, 51(3), 609-614.
- Wu, Y., Li, Y., Wu, Y., Cheng, H., Li, Y., Zhao, Y., & Li, Y. (2011). Transgenic plants from fragmented shoot tips of apple (*Malus baccata* (L.) Borkhausen) via *agrobacterium*-mediated transformation. *Scientia horticulturae*, 128(4), 450-456.
- Xiong, Y., & Eickbush, T. H. (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J*, 9(10), 3353.
- Xu, K., Wang, A., & Brown, S. (2012). Genetic characterization of the *Ma* locus with pH and titratable acidity in apple. *Molecular Breeding*, 30(2), 899-912.
- Yamashita, H., Daimon, H., Akasaka-Kennedy, Y., & Masuda, T. (2004). Plant regeneration from hairy roots of apple rootstock, *Malus prunifolia* Borkh. Var. ringo Asami, strain Nagano No. 1, transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Jpn. Soc. Hortic. Sci*, 73, 505-510.
- Yancheva, S. D., Golubowicz, S., Fisher, E., Lev-Yadun, S., & Flaishman, M. A. (2003). Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during in vitro organogenesis in apple. *Plant Science*, 165(2), 299-309.
- Yao, J.-L., Cohen, D., Atkinson, R., Richardson, K., & Morris, B. (1995). Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Reports*, 14(7), 407-412.
- Yao, J.-L., Dong, Y.-H., & Morris, B. A. M. (2001). Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), 1306-1311.
- Yepes, L. M., & Aldwinckle, H. S. (1994). Factors That Affect Leaf Regeneration Efficiency in Apple, and Effect of Antibiotics in Morphogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 37(3), 257-269.
- Zabeau, M., & Vos, P. (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting: EP Patent 15,348,581,992.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Montagu, M. V., & Schell, J. (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J*, 2(12), 2143-2150.
- Zamir, D., Tanksley, S. D., & Jones, R. A. (1982). Haploid selection for low temperature tolerance of tomato pollen. *Genetics*, 101(1), 129-137.

- Zhang, Z., Sun, A., Cong, Y., Sheng, B., Yao, Q., & Cheng, Z.-M. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of the apple rootstock *Malus micromalus* Makino with the *ROLC* gene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(6), 491-497.
- Zhao, M., & Ma, J. (2013). Co-evolution of plant LTR-retrotransposons and their host genomes. *Protein & cell*, 1-9.

9. Lebenslauf

10. Danksagung

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Weiterhin bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit, oder Teile davon, nicht als Arbeit in einer anderen Fakultät oder für eine andere Prüfung benutzt habe.

Ort, Datum

Rachel Denise Brandl