

3. Material und Methoden

3.1. Pflanzenmaterial

3.1.1. Versuchsfeld und Pollenfänger- und Pollenspenderpflanzen für die Bestimmung der Auskreuzungsrate von Apfelpollen

Die Feldversuche für die Bestimmung der Auskreuzungsrate von Apfelpollen wurden innerhalb des Versuchsgeländes des Institutes für Obstzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) durchgeführt. Das Versuchsgelände besteht aus einer Vielzahl von Obstgehölzen, wie z.B. Apfel, Birne, Kirsche und Pflaume, welche für die Züchtung, als genetische Ressource oder als Veredelungsorte verwendet werden. Für die Untersuchungen zur Auskreuzungsdistanz wurde ein 0,26ha großes Apfelquartier innerhalb des Versuchsgeländes bestimmt. Dieses Quartier wurde zwischen 1994 und 1996 als genetische Ressource angelegt. In dem Quartier wurden 50 verschiedenen Apfelsorten mit insgesamt 300 Apfelbäumen gepflanzt, wobei auf die drei Reihen durchschnittlich 100 Bäume verteilt wurden (Abbildung 1). Dabei wurden die Edelreiser in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsleistung auf verschiedene Unterlagen (M9, M26, MM106, A2) gepfropft, um eine Anlage mit gleich großen Bäumen zu erhalten. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren alle Bäume mit 2,5m mehr oder weniger gleich groß. Der Abstand zwischen den Bäumen innerhalb der Reihe betrug 2,5m und zwischen den Reihen 4,5m. In der Nähe des Versuchsquartiers waren Sauerkirschen gepflanzt.

Das hier beschriebene Apfelquartier wurde aus drei Gründen als Versuchsfeld für die Bestimmung der Auskreuzungsrate von Apfelpollen ausgewählt. Zum ersten besaß das Quartier durch die Vielzahl der vorhandenen Apfelsorten eine hohe genetische Variabilität, die für die Probenauswahl von Vorteil war. Weiterhin war der Apfelhybrid ‚TNR 31-35‘ gepflanzt, der aufgrund seines morphologischen Markers für Rotlaubigkeit als Pollenspendergenotyp sehr geeignet ist. Als dritter Grund wurde angenommen, dass in der Nähe der Versuchsfläche keine anderen Flächen mit einem Markergen für Rotlaubigkeit vorkommen.

Zur Blühdauer wurden zehn Bienenwagen immer an dieselbe Stelle in einem Abstand von 100m zur ersten Apfelreihe in das Kirschquartier platziert. Der Blühzeitpunkt der Kirschen war nahezu vorbei, als der Apfel zu blühen anfang.

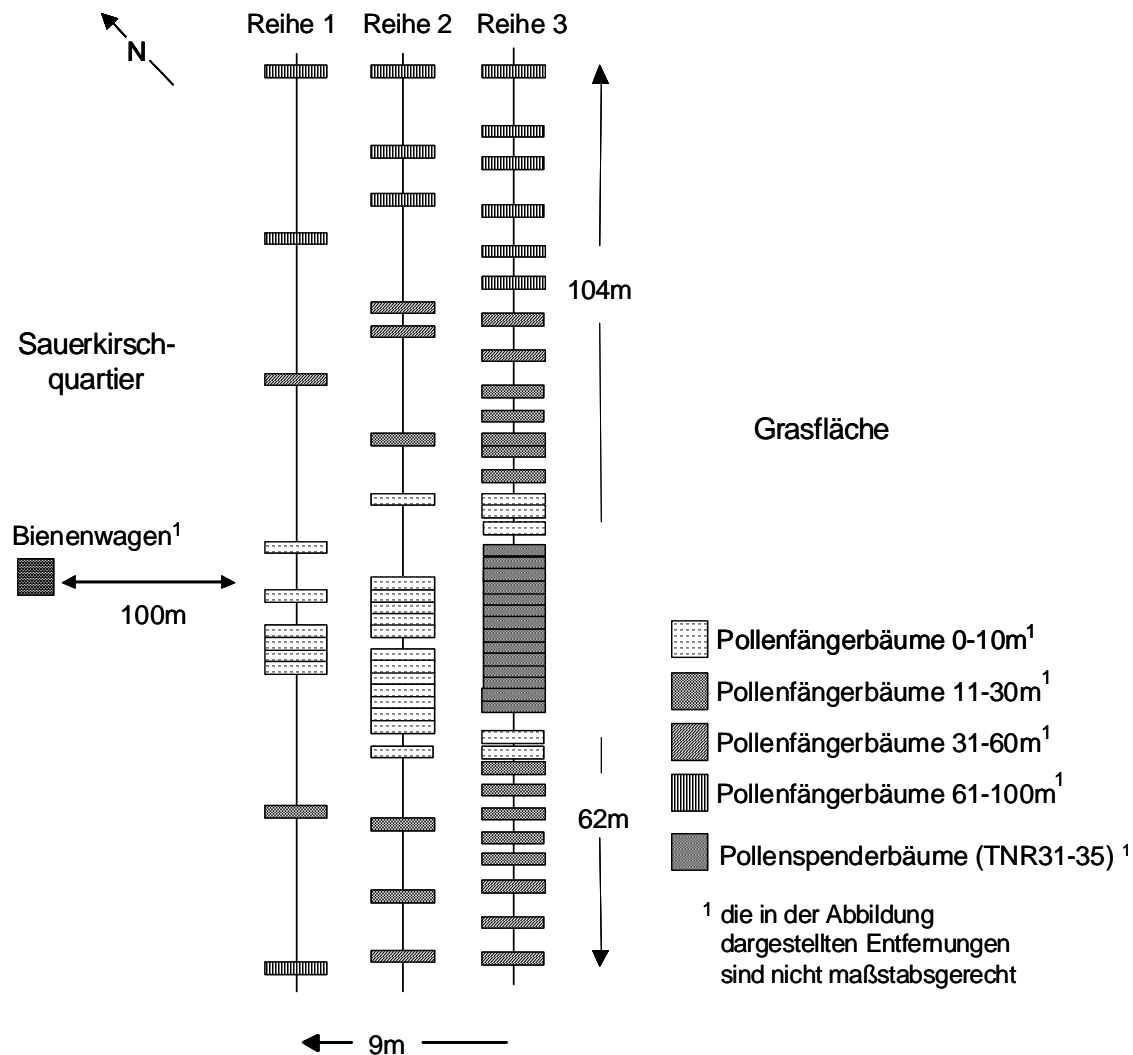


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsfeldes zur Bestimmung der Auskreuzungsdistanz durch Apfelpollen unter natürlichen Bedingungen.

Innerhalb dieser Fläche wurden 60 Bäume aus insgesamt 38 Kulturapfelsorten als Pollenfängerpflanzen ausgewählt. Diese befinden sich in einem Abstand von 4-104m zu ausgewählten Pollenspenderpflanzen. Die Auswahl der Pollenfängersorten ist in Abbildung 1 dargestellt. In der Nähe der Pollenspendersorten ist der Anteil der ausgewählten Pollenfängerbäume höher als in größeren Distanzen. Außerdem wurde in der Literatur angenommen, dass die Bienen auf ihrem Futterflug vorwiegend innerhalb der Reihen fliegen. Daher wurden 47% aller Bäume in der Reihe der Pollenspenderbäume beprobt. In der gegenüberliegenden Reihe des Pollenspendergenotyps befanden sich 38% der beprobten Pollenfängerbäume. Bei der Auswahl der Pollenfängersorten wurde darauf geachtet, dass die Blühzeitpunkte nicht mehr als zwei Boniturnoten (früh-/ mittel-blühend) von dem des Pollenspendergenotyps abweichen.

Für die Auswahl wurden die Boniturnoten der Blütezeiten des ‚Informationssystem für Evaluierungsdaten für pflanzengenetische Ressourcen‘ (EVA)⁸ genutzt. Bei einer Abweichung von zwei Boniturnoten liegt der Blühbeginn maximal 4 Tage auseinander. Die Entfernungen der ausgewählten Pollenfängerbäume in den benachbarten Reihen zu den Pollenspenderbäumen wurden mittels Satz des Pythagoras $c=\sqrt{a^2 + b^2}$ ermittelt. Dabei ist c die Distanz zwischen dem jeweiligen Pollenfängerbaum und den Pollenspenderbäumen, a ist der Abstand zwischen den Reihen und b ist die Entfernung zwischen dem Baum in der benachbarten Reihe und dem ausgewählten Pollenfängerbaum. Für die Berechnung wurde von den 15 Pollenspenderbäumen immer derjenige mit der kürzesten Entfernung zum jeweiligen Pollenfängerbaum ausgewählt.

Als Pollenspenderpflanzen wurden 15 Bäume des Hybrids ‚TNR 31-35‘ ausgewählt. Dieser stammt aus der Kreuzung der Wildart *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* Dieck. und der Apfelsorte ‚Topred Delicious‘. *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* Dieck. wurde in früheren Arbeiten als *Malus pumila* var. *niedzwetzkyana* bezeichnet und erst seit 2006 *Malus sieversii* zugeordnet (Hanelt, 2006). ‚TNR 31-35‘ ist homozygot für ein dominantes Markergen R, das eine Rotfärbung in Blättern, Trieben und Früchten hervorruft (Lespinasse und Godicheau, 1980; Lespinasse et al., 1983). Die genauen Angaben zu den Pollenfängerbäumen und den Pollenspenderbäumen sind in Abb. Anhang 1 aufgeführt.

3.1.2. Transgene In-vitro Pflanzen

Für diese Arbeit standen 9 transgene Linien der Apfelsorte ‚Pinova‘ und 8 transgene Linien des Apfelunterlagengenotyps ‚AU56-83‘ als Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Diese waren im Vorfeld dieser Arbeit in den Jahren 1998 bis 2000 am Institut für Obstzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Dresden-Pillnitz erstellt und *In-vitro* verklont worden (Hanke, 2004; Hanke et al., 2000). Dabei werden durch Transformation ausgewählte DNA-Abschnitte in eine Pflanzenzelle übertragen. Bei diesen Pflanzen waren Gene zur Erhöhung der Resistenz gegenüber dem Feuerbrand (*Erwinia amylovora*) integriert worden. Die Beschreibung der Herkunft der verwendeten Gene ist in Kapitel 3.2. zu finden. Nach erfolgreicher Transformation werden aus der Pflanzenzelle Pflanzensprosse auf Kanamycin im Nährmedium selektiert und regeneriert. Die regenerierten Pflanzensprosse sind genetisch identisch. Pro Transformationsprozess werden diese

⁸ www.genres.de/eva/apfel.htm

genetisch identischen Pflanzen einer transgenen Linie zugeordnet. Die In-vitro Pflanzen der 17 Linien wurden zwischen 1999 und 2003 bewurzelt und ins Gewächshaus überführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Herstellung-, Überführungs- und Veredelungsjahr der einzelnen transgenen Linien.

Linie	Herstellungsjahr der Linie	Überführungsjahr in das Gewächshaus	Veredelungsjahr
T86	1998	1999	2002
T95		2000	
T92			
T121	1999	2000	
T136			
T137			
T211	2000	2001	
T267			
T270	2000	2002	nicht veredelt
T362			
T363			
T350			
T351			
T352			
T320	2000	2003	2005
T349			
T355			

Von den 17 Linien wurden acht Linien (T86, T92, T121, T136, T137, T211, T267) im Jahr 2002 und drei weitere Linien (T320, T349, T355) im Jahr 2005 in verschiedenen Varianten veredelt. Sechs transgene Linien wurden als unveredelte Ex-vitro Pflanzen analysiert (T270, T350, T351, T352, T362, T363). Die Daten der transgenen Linien, die für die Untersuchung der Stabilität der T-DNA eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Daten der transgenen Linien, die für die Untersuchung des Transports von Transgenprodukten bei veredelten Apfelgehölzen verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Als transgenes Edelreis wurden die transgenen Linien der Sorte ‚Pinova‘ und als transgene Unterlage die transgenen Linien des Genotyps ‚AU56-83‘ und der Sorte ‚Pinova‘ verwendet. Als nicht transgener Veredelungspartner wurde die Sorten ‚Pinova‘ (Edelreis), ‚Hibernal‘ (Stammbildner) und ‚M9‘ (Unterlage) eingesetzt. Die verschiedenen Veredelungskombinationen sind in Abbildung 2 dargestellt. Alle Veredelungsvarianten mit Ausnahme der Linien T86, T320 und T349 wurden in zweifacher Wiederholung als Baum angezogen. Die unveredelten Ex-vitro Pflanzen

wurden mit einem Buchstaben, z.B. T267A, T267B, gekennzeichnet. Die veredelten Pflanzen einer Linie sind mit einem V und einer Nummer z.B. V1 für Veredelung 1 der Linie T267 gekennzeichnet.

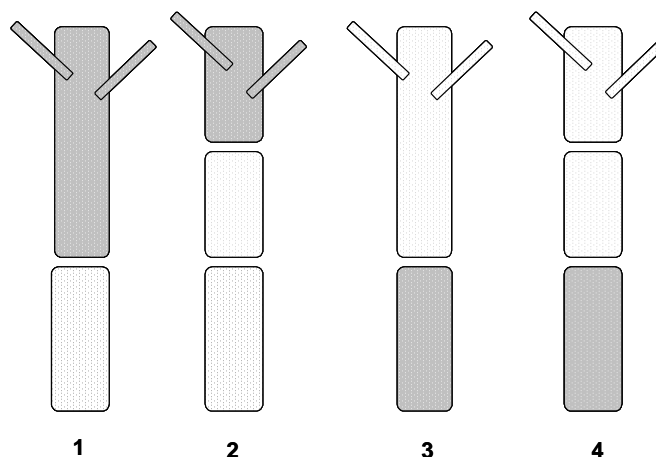


Abbildung 2:

Schematische Darstellung der verschiedenen Veredelungskombinationen.

Grau: transgene Veredelungskomponente; Weiß: nicht transgene Veredelungskomponente

1: Veredelung eines transgenen Edelreis der Sorte ‚Pinova‘ auf eine nicht transgene Unterlage (‚M9‘)

2: Veredelung eines transgenen Edelreis der Sorte ‚Pinova‘ (grau) auf einen nicht transgenen Stammbildner (‚Hibernal‘) und einer nicht transgenen Unterlage (‚M9‘).

3: Veredelungen einer transgenen Unterlage der Sorte ‚AU56-83‘ bzw. ‚Pinova‘ mit einem nicht transgenen Edelreis (‚Pinova‘).

4: Veredelung einer transgener Unterlage der Sorte ‚AU56-83‘ mit einem nicht transgenen Stammbildner (‚Hibernal‘) und nicht transgenen Edelreis (‚Pinova‘).

Tabelle 2: Transgene Linien und Art ihrer Verwendung für die Untersuchung der Stabilität der T-DNA bei gentechnisch veränderten Apfelpflanzen.

Konstrukt	Linie	Genotyp	Verwendung als Ex-vitro Pflanze	Pflanzen ⁵
pID15 ¹	T86	AU 56-83	Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
P35SAMVT4 ²	T121	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
	T352	AU 56-83	unveredelt	3
	T270	AU 56-83	unveredelt	3
	T362	AU 56-83	unveredelt	1
	T363	AU 56-83	unveredelt	3
pBinAtt35SAMVT4 ³	T92	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	1
	T95	Pinova	Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	1
	T350	AU 56-83	unveredelt	3
	T351	AU 56-83	unveredelt	3
PBINAR19 ⁴	T136	Pinova	unveredelt	3
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
	T137	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
	T211	Pinova	unveredelt	8
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
	T267	Pinova	unveredelt	4
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
Gesamt				60

¹ attE-Gen (Destefano-Beltran, 1991); ² T4L-Gen (Ko et al., 1997); ³ T4L- und attE-Gen (Ko et al., 1997); ⁴ Depolymerase-Gen (Kim und Geider, 2000); ⁵ Anzahl

Tabelle 3: Transgene Linien für die Untersuchung des Transport von Transgenprodukten bei veredelten Apfelgehölzen

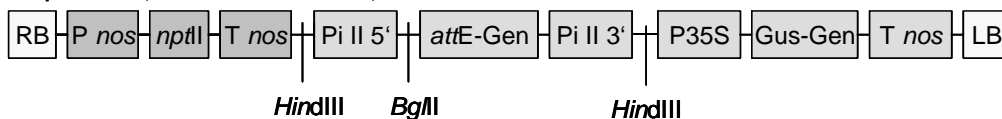
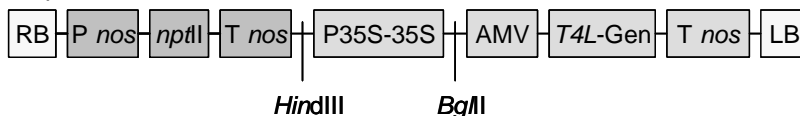
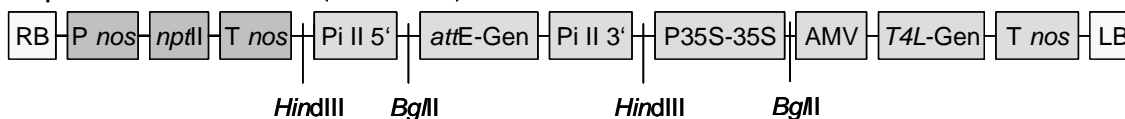
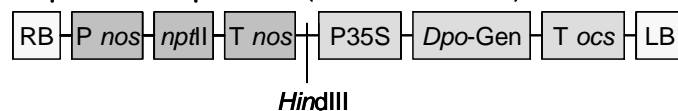
Konstrukt	Linie	Genotyp	Verwendung als Ex-vitro Pflanze	Pflanzen ⁵
pID15 ¹	T320	Pinova	Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	1
	T349	Pinova	Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
	T355	Pinova	Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	2
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	2
P35SAMVT4 ²	T121	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
pBinAtt35SAMVT4 ³	T92	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	1
	T95	Pinova	Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	1
PBINAR19 ⁴	T137	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
Gesamt				22

¹ attE-Gen (Destefano-Beltran, 1991); ² T4L-Gen (Ko et al., 1997); ³ T4L- und attE-Gen (Ko et al., 1997); ⁴ Depolymerase-Gen (Kim und Geider, 2000); ⁵ Anzahl

3.2. Verwendete Agrobakteriumstämme und Vektoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Apfelpflanzen wurden mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* nach einer Methode von Norelli et al. (1996) transformiert. Dafür wurden die Bakterienstämme EHA105, KYRT1 und LBA4404 verwendet (Hamilton, 1997; Hood et al., 1993; Ooms et al. 1982; Torisky et al. 1997). Bei den verwendeten Vektoren handelt es sich um die chimären Genkonstrukte pLDB15-, p35SAMVT4-, pPinAtt35SAMVT4- und pBINAR19Dpo (Abbildung 3) (Destefano-Beltran, 1991; Kim und Geider, 2000; Ko et al., 1997). Diese gehen alle auf den Basisvektor BIN19 (NCBI Accessionsnr.: U09365) zurück, der in der Literatur beschrieben ist (Bevan, 1984; Frisch et al., 1995). Die Vektoren enthalten eine entwaffnete T-DNA, die zwischen den Bordern (RB: rechte Border; LB: linke Border) keine natürlich vorkommende Gene mehr enthält. Außerhalb der T-DNA besitzt der Vektor ein Gen für eine bakterielle Kanamycinresistenz (*nptII*) als Selektionsmarker und prokaryontische DNA-Elemente (Frisch et al., 1995). Innerhalb der T-DNA tragen die Vektoren das *nptII* Gen als Pflanzenselektionsmarker und jeweils ein oder zwei Zielgene, die im Folgenden aufgeführt sind:

- Das *gus*-Gen stammt aus *E. coli* und kodiert unter Kontrolle eines 35S-RNA-Promotors und Terminators aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) für eine β -Glucuronidase (Vancanneyt et al., 1990) (Abbildung 3, A).
- Das *attE*-Gen stammt aus dem Riesenseidenspinner (*Hyalophora cecropia*). Das Gen wurde zwischen den Promotor und Terminator des Proteinase-Inhibitor II-Gens der Kartoffel kloniert (Keil et al., 1989). Das Konstrukt pLDB15 enthält sowohl das *gus*-Gen als auch das *attE*-Gen (Abbildung 3, A).
- Das *T4L*-Gen stammt aus dem Bakteriophagen T4 und wurde zwischen die untranslatierte Leadersequenz der Alfalfamosaik-Virus-RNA und der Terminatorsequenz des Nopalinsynthase-Gens (T NOS) kloniert (Datla et al., 1993; Godefroy-Colburn et al., 1985; Porsch et al., 1998;). Das p35SAMT4-Konstrukt enthält das *T4L*-Gen (Abbildung 3, B). In dem Konstrukt pPinAtt35SAMVT4 sind das *attE*-Gen und das *T4L*-Gen kombiniert (Abbildung 3, C) (Ko et al., 1997).
- Das *Dpo*-Gen stammt aus dem Bakteriophagen Ea1h und kodiert für eine extrazelluläre Polysaccherid(EPS)-Depolymerase. Das Gen wurde zwischen 35S-RNA-Promotors aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) und dem Terminator des *Octopinsynthase*-Gens aus *A. tumefaciens* in den Vektor pBINAR19Dpo kloniert (Abbildung 3, D) (Kim und Geider, 2000).

A: pLDB15 (Destefano-Beltran, 1991)**B: p35AMVT4 Vektor (Ko et al. 1997)****C: pPinAtt35AMVT4 Vektor (Ko et al. 1997)****D: pBINAR19-Dpo Vektor (Kim und Geider, 2000)**

RB	rechte Border
P nos	Promotor des Nopalinsynthase-Gens
nptII	Neomycinphosphotransferase-Gen II
T nos	Terminatorsignal des Nopalinsynthase-Gens
P35S	35S rRNA Promotor des Cauliflower Mosaik Virus
P35S-35S	doppelter 35 S Promotor
Dpo	Depolymerase-Gen
att E	Attacin E-Gen
T4L	T4-Lysozym-Gen
T ocs	Terminatorsignal des Octopinsynthasegens
AMV	Leader Peptid der Alpha amylase aus Gerste
Pi II 5'	Promotor des Proteinase-Inhibitor-Gens aus Kartoffel
Pi II 3'	Terminator des Proteinase-Inhibitor-Gens aus Kartoffel
LB	linke Border

Abbildung 3: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte.

3.3. Methoden**3.3.1. Vermehrung und Bewurzelung von In-vitro Pflanzen**

Die Vermehrung von Apfelsprossspitzenkulturen erfolgte auf Fertignährboden nach Linsmaier und Skoog (Duchefa, Hamburg) nach bei 16h Licht und 8h Dunkelheit bei einer Temperatur von 22°C. Zur Bewurzelung wurden die In-vitro Pflanzen auf Fertignährboden nach Murashige und Skoog (Duchefa, Hamburg) umgesetzt und anschließend für eine Woche bei Dunkelheit kultiviert. Im Anschluss folgte die weitere

Bewurzelung für 3-4 Wochen auf ohne die Zugabe von Indol-3-buttersäure (IBA) bei 16h Licht und 8h Dunkelheit. Die Überführung der In-vitro Pflanzen in das Gewächshaus erfolgte ca. 14 Tage nach Abschluss der Wurzelbildung.

3.3.2. Stratifizierung von Apfelsamen und Anzucht von Apfelpflanzen im Gewächshaus

Die Samen geernteter Früchten wurden herauspräpariert, bei 4°C für 90 Tage in feuchtem Sand stratifiziert und anschließend ausgesät.

Die Anzucht der Pflanzen im Gewächshaus erfolgte unter Langtagbedingungen mit einer Beleuchtungsphase von 16h Licht bei 2000Lux und einer Temperatur von 23°C am Tag und 18°C in der Nacht bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-70%.

3.3.3. Befruchtungsbiologische Untersuchungen

Die Untersuchung der Keimfähigkeit und Vitalität von Pollen erfolgte modifiziert nach Filiti und Montalti (1982). Dazu wurden zur Aufblüte die Antheren aus den Apfelblüten mit Hilfe einer Pinzette herauspräpariert. Diese wurden anschließend in Petrischalen bis zum Aufbrechen der Antheren und Heraustreten des Pollens zwischen einem und zwei Tagen bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

Für die Vitalitätsprüfung wurden die Pollenkörner mit 0,5%-iger Karminessigsäure angefärbt. Vitale Pollenkörner färben sich orange-rot, während tote Pollenkörner nicht angefärbt werden. Von insgesamt 1000 Pollenkörnern wurde die Anzahl der gefärbten und ungefärbten Pollenkörner anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt.

Zur Bestimmung der Pollenkeimfähigkeit wurden Pollenkörner auf eine 15%ige Saccharoselösung gegeben und bei 25°C für 6-8h inkubiert. Anschließend wurden von 2000 Pollenkörnern die Anzahl der Pollen mit und ohne Keimschlauch unter dem Mikroskop bestimmt.

Für die Durchführung von gezielten Kreuzungen wurden Blüten der Pollenfängersorten ausgewählt und im Ballonstadium mit Tüten isoliert. Zur Vollblüte wurden die Isoliertüten geöffnet und der Pollen von ‚TNR 31-35‘ mit Hilfe eines Pinsels auf die Narben der isolierten Blüten der Pollenfängersorten aufgebracht. Anschließend wurden die Tüten wieder insektensicher verschlossen.

Die Auswertung der Befruchtungsversuche erfolgte nach dem Junifruchtfall. Dazu wurde der Fruchtansatz ausgezählt und prozentual auf die Anzahl bestäubter Blüten bezogen. Anhand des relativen Fruchtansatzes wurde die Kreuzungskombinationen in drei Gruppen eingeteilt (Fischer, 2001):

Fruchtansatz über 15% - Kombination hoch fertil

Fruchtansatz 8-15% - Kombination mittelmäßig fertil

Fruchtansatz unter 8% - Kombination wenig fertil bzw. steril

3.3.4. Untersuchungen zum Windtransport von Apfelpollen

Zur Untersuchung der Transportdistanzen von Apfelpollen durch Wind wurden Pollenfallen in zwei Untersuchungsjahren in unterschiedlichen Entfernungen und Himmelsrichtungen um einen Pollenspenderbaum der Apfelsorte ‚Regia‘ positioniert. Als Versuchsfläche wurde ein frisch gepflügter Acker gewählt, der sich weitab von Obstbauflächen befand. Der getopfte, 1,5m große Pollenspenderbaum befand sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in voller Blüte. Als Pollenfallen wurden Objektträger verwendet, die mit einer 5cm² großen Schicht Glyceringelatine bestrichen waren. Die Objektträger wurden mit Gummibändern in einer Höhe von 1,5m an Stäben befestigt und alle 2m bis zu einer Entfernung von 20m, in nördlicher, westlicher, südlicher und östlicher Himmelsrichtung um den Pollenspenderbaum aufgestellt. Nach sechs Stunden wurden die Objektträger entfernt. Die Auswertung der Pollenfallen erfolgte visuell unter einem Lichtmikroskop ‚Axioskop‘ (Zeiss, Jena) bei 100facher Vergrößerung.

3.3.5. Bonitur der Sämlinge aus den Kreuzungen und den freien Ablüten

14 Tage nach Auflaufen der Sämlinge wurden diese anhand ihrer Blattfärbung bonitiert. Als ‚rot‘ wurden alle Apfelsämlinge mit roten Blättern oder roten Blattadern eingestuft (Abbildung 4, A). Sämlinge, die als ‚grün‘ eingestuft wurden, zeigten keine Anzeichen von roter Färbung (Abbildung 4, B). Die Bonitur wurde nach zwei Wochen wiederholt.



A



B

Abbildung 4: Sämlinge aus den Kreuzungen bzw. den freien Abblüten 14 Tage nach dem Auflaufen.

A: rotlaubiger Sämling und B: grünlaubiger Sämling

3.3.6. DNA Isolierung aus Blattmaterial

Die Isolierung von genomischer DNA aus Blattmaterial erfolgte, je nach benötigter DNA-Menge mit dem DNAeasy-Plant-Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend des Protokolls des bzw. modifiziert nach der CTAB-Methode von Saghai-Maroo (1984).

Für die Isolierung genomischer DNA nach der CTAB-Methode wurden 1g bei -80°C gelagertes Blattmaterial in flüssigem Stickstoff zermörsert, in 50ml Zentrifugenröhrchen (Sigma, Osterode) überführt und mit 5ml 2x CTAB-Puffer versetzt. Nach einer Inkubation bei 65°C unter leichtem Schütteln für 60 min wurden die Proben für 5min auf Eis abgekühlt, mit 1V Chloroform versetzt und für 30min geschüttelt. Nach 30min Zentrifugation bei 14.000rpm wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein 10ml Reaktionsgefäß (Sigma, Osterode) überführt. Danach wurde die Probenlösung mit 4 μl 10%iger RNase A versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 0,6V eiskaltem Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und anschließend 4min bei 8000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 1ml 76% Ethanol gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen. Anschließend wurde die DNA 15min bei RT getrocknet und in 100 μl destilliertem Wasser über Nacht bei 4°C resuspensiert.

3.3.7. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung von PCR-Produkten wurde das entsprechende DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraktions- Kit (Qiagen, Hilden) eluiert.

3.3.8. RNA Isolierung

100mg bei -80°C gelagertes Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Mörsers zerrieben und in 2ml Reaktionsgefäße überführt. Die Extraktion von Gesamt-RNA erfolgte mittels Invisorb® Spin Plant-RNA Mini Kit (Invitex, Berlin). Die RNA-Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260nm und 280nm bestimmt.

Zur Überprüfung der RNA auf DNA-Kontaminationen wurde eine PCR unter Verwendung von spezifischen Primern für das Housekeeping-Gen EF-1 α durchgeführt. Bei Bedarf wurden DNA-Reste durch eine DNase Behandlung mit dem DNA-free-DNase-Treatment-Kit laut Protokoll entfernt (Amersham, Freiburg). Im Anschluss wurde die RNA nochmals auf Vorhandensein von DNA mittels PCR mit EF-1 α -Primern überprüft.

3.3.9. Restriktionsverdau von DNA

Zur Restriktion wurden 1-20 μg DNA mit Restriktionsenzymen in 1x Restriktionspuffer nach Angaben des Herstellers (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) verdaut. Die enzymatische Reaktion erfolgte mit 1-10Units/ μg DNA bei 37°C über Nacht. Als Restriktionsenzyme wurden *Hind*III (5'-A^A G C T T-3'), *Bgl*II (5'-A^AG A T C T-3') und *Cfr*42I (5'-C C G C^AG G-3') eingesetzt.

3.3.10. PCR basierende Methoden

3.3.10.1. Mikrosatelliten-Analyse

Für die SSR-Analyse wurde das PCR-Protokoll der Fa. Licor (Bad Homburg, Deutschland) modifiziert. In einem Gesamtvolumen von 10 μl wurden 5ng genomische DNA mit 1 μM IRD700 bzw. -800 markiertem forward Primer und 2 μM reverse Primer in 1x Reaktionspuffer, 15mM MgCl_2 , 2mM dNTPs mit 0,5Unit Taq Polymerase amplifiziert. Die DNA wurde zunächst für 5min bei 94°C denaturiert. Anschließend folgten 33 Zyklen mit: einem Denaturierungsschritt für 1min bei 94°C , einem Annealingschritt für 1min bei $56-60^{\circ}\text{C}$ und einer Elongation bei 72°C für 2min. Nach einer Abschlußelongation bei 72°C für 5min wurde der Reaktionsansatz auf 4°C heruntergekühlt. Die verwendeten SSR-Primer sind in Tab. Anhang 1 aufgeführt.

3.3.10.2. Amplifikation von Gensequenzen

Für den Nachweis spezifischer Gensequenzen wurden 20-50ng DNA bzw. RNA in einem 25µl Reaktionsansatz mit 12,5pmol je Primer, 1x NH₄-Puffer, 12,5mM MgCl₂, 2,5mM dNTPs und 1x Farbpuffer unter Verwendung von 0,4Unit Taq Polymerase (Invitak, Berlin) amplifiziert.

Im ersten Schritt wurde die DNA für 2min bei 94°C denaturiert. Anschließend folgten 30 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 0,5min, einem Annealingschritt für 1min bei 55-60°C und einer Elongation von 1,5min bei 72°C. Nach einer abschließenden Elongation für 10min bei 72°C wurde der Reaktionsansatz auf 4°C heruntergekühlt. Die verwendeten Primer mit der jeweiligen Annealingtemperatur sind in Tab. Anhang 2 aufgeführt.

3.3.10.3. Markierung der Sonden-DNA

Für die Herstellung der Sonden wurden die kodierenden Bereiche des *attE*-Gens, des *T4L*-Gens, des (*H*-)*Dpo*-Gens, des *npfII*-Gens bzw. des *nos*-Promotors markiert. Die Markierung der Sonden-DNA für die erfolgte mittels PCR DIG Probe Synthesis Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Roche-Diagnostics, Mannheim). Die verwendeten Primer für die Amplifikation der jeweiligen Sequenzen sind in Tab Anhang 2 aufgeführt.

3.3.10.4. RT- PCR

Die Synthese der cDNA erfolgte aus 0,1-5µg Gesamt-RNA mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit entsprechend des Protokolls (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot). Der Erfolg der cDNA Synthese wurde mittels PCR (vgl. Kapitel 3.3.10.2.) unter Verwendung spezifischer Primer für den Elongationsfaktor EF-1α überprüft. Für weitere PCR Analysen wurden jeweils 1µl der synthetisierten cDNA eingesetzt.

3.3.11. Elektrophorese

3.3.11.1. Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in der Regel auf einem 0,8-1%igen Agarosegel mit 1x TAE-Puffer und einer Spannung von 50-120Volt bei maximaler Stromstärke mit einer Laufzeit von 1-6h. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,0005% Ethidiumbromid in das Agarosegel. Die Auswertung der Agarosegele erfolgte mittels ‚Gel Doc XR‘ (Biorad, München). Als Größenstandard wurden 50bp-,

100bp- und 1kb-Leiter der Firma MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Für die Quantifizierung von DNA wurden λ -DNA-Mengenstandards in einer Verdünnungsreihe von 10ng, 50ng, 100ng und 200ng mitgeführt. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der DNA-Proben mit den λ -DNA Standards mittels des Softwareprogramms Quantity One 4.2.1 (Biorad, München).

3.3.11.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Auftrennung der SSR-Fragmente wurde der PCR-Ansatz mit 10-30 μ l Licor-Ladepuffer verdünnt. Nach Denaturierung der DNA für 3min bei 94°C wurden die Proben bei 4°C gekühlt und auf ein 6,5%-Polyacrylamidgel ‚KB-Plus‘ (Licor, Bad Homburg) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mittels NEN Global IR² DNA Sequencer (Licor, Bad Homburg) für 90min bei 1400Volt in 1x TBE.

3.3.12. Southern-Blot-Analysen

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem 0,8%-igen Agarosegel wurde das Gel für zweimal 15min in Denaturierungspuffer denaturiert und anschließend zweimal 15min in einer Neutralisierungslösung neutralisiert.

Der Transfer der DNA erfolgte auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche-Diagnostics, Mannheim) unter Anwendung von Standardmethoden nach Maniatis et al. (1982).

Zur Equilibrierung der Membran wurde diese zunächst bei 42°C in 10ml Hybridisierungslösung für 2h prähybridisiert. Anschließend wurde der Prähybridisierungspuffer verworfen. Für die Hybridisierung wurden ca. 250ng DIG-markierte Sonde (vgl. Kapitel 3.3.10.3.) für 10min bei 96°C denaturiert, in 5ml Hybridisierungslösung gelöst und der Membran zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht.

Nach jeweils zwei Waschschritten mit 2x SSC+ 0,1% SDS bei RT und 0,1% SSC + 0,1% SDS bei 68°C für jeweils 15min wurde die Membran kurz in Maleinsäurepuffer gespült und für 45min in Blockierungspuffer equilibriert. Zur Bindung des Anti-DIG-Konjugates an die Membran wurde das Konjugat in einem Verhältnis von 1: 20.000 in Blockierungslösung verdünnt und die Membran für 30min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 20min in Waschpuffer und Equilibrierung der Membran in Blockierungspuffer für 10min erfolgte die Detektion mittels ECF-Lösung (Roche-Diagnostics, Mannheim). Die Auswertung wurde mit dem Laserscanner FX Pro Plus (Biorad, München) durchgeführt.

3.3.13. Methylierungsuntersuchungen

Die Untersuchung der Methylierung des *nos*-Promotors erfolgt mit geringen Modifikationen nach einem Protokoll von Ulian et al. (1996). Dazu wurden 100µg genomische DNA in einem Doppelverdau mit 100Units *HindIII* und 100Units *Cfr42I* (MBI Fermentas, St. Leon Roth) verdaut. *HindIII* ist nicht methylierungssensitiv⁹ (vgl. Kapitel 3.3.9.). Das Restriktionsenzym *Cfr42I* ist ein Isochizomer von *SacII* und *SstII* und schneidet in der Sequenz CCGCGG, wenn das innere C nicht methyliert ist. Methylierte DNA wird nur von *HindIII* geschnitten. Nach Hybridisierung (vgl. Kapitel 3.3.12.) mit einer *nos*-Promotor spezifischen Sonde (vgl. Kapitel 3.3.10.3.) ist ein Fragment mit einer Größe von über 2,5kb zu erwarten. Unmethylierte DNA wird von *HindIII* und *Cfr42I* geschnitten und nach Hybridisierung ist ein 2,3kb Fragment zu detektieren.

3.3.14. ELISA-Test

Eine 96er Mikrotiterplatte wurde mit 100µl Rabbit-Antikörper (5Prime→ 3Prime, Inc., Boulder, USA) je well in einer 1: 2000 Verdünnung beladen und bei 37°C inkubiert. Nach 2h wurde die Reaktion abgebrochen und die Platte dreimal für je 5min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Mikrotiterplatte mit 200µl Blockierungslösung je well für 30min bei RT und bei 300rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

20mg frisches Blattmaterial wurden mit ELISA-Extraktionpuffer (25µl/1mg Blattmaterial) versetzt, homogenisiert und für 5min bei 12.000rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Beladung der Mikrotiterplatte mit 100µl des Probenüberstandes je well in dreifacher Wiederholung. Als Standard wurden fünf NPTII-Konzentrationen (0pg, 100pg, 250pg, 500pg, 750pg bzw. 0pg, 100pg, 250pg, 650pg und 1500pg) in Extraktionspuffer gelöst und in dreifacher Wiederholung auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde eine positiv getestete, transgene Pflanzenprobe der Apfelsorte ‚Pinova‘ und als Negativkontrolle eine nicht transgene Pflanzenprobe der Apfelsorte ‚Pinova‘ mitgeführt. Die verschlossene Platte wurde anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in Waschpuffer wurden je 100µl des 1:2000 verdünnten, biotinylierten Antikörpers (5Prime→ 3Prime, Inc., Boulder, USA) zugegeben. Nach 1h Inkubation bei RT wurde die Platte fünfmal in Waschpuffer gewaschen. Darauf folgte die Zugabe von 100µl Streptavidin-Konjugat (5Prime→ 3Prime, Inc., Boulder, USA) pro

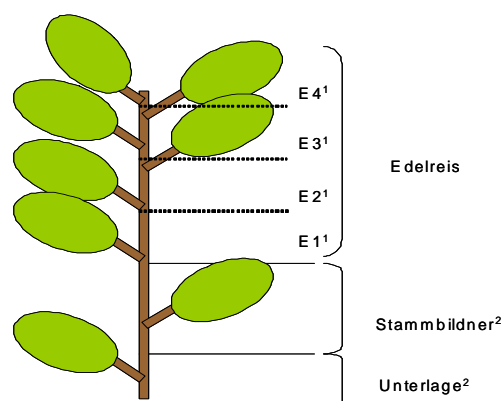
⁹ Quelle: www.fermentas.com

Ansatz und eine Inkubation für 30min bei RT. Nach fünf weiteren Waschschrritten in Waschpuffer wurden jeder Probe 100µl des alkalischen Phosphatase-Substrats (5Prime → 3Prime, Inc., Boulder, USA) hinzugefügt und diese für weitere 30min bei RT inkubiert.

Die Bestimmung der NPTII-Proteinkonzentration erfolgte im direkten Anschluss an die letzte Inkubationszeit, nach 10min und 20min mit dem ELISA plate reader (rosys anthos 2010, WinRead V.2.1, Anthos-Labtech, Wals, Salzburg, Österreich). Der NPTII-Proteingehalt wurde anhand der Punkt zu Punkt-Standardkurve in pg Protein/mg Pflanzenmaterial ermittelt. Das Ergebnis der ELISA Analyse wurde als positiv eingestuft, wenn die zweifache NPTII-Proteinmenge der Negativkontrolle überschritten wurde.

3.3.15. GUS-Test

Der histochemische GUS-Test erfolgte mit leichten Modifizierungen nach einem Protokoll von Flachowsky et al. (2008). Dabei wurden aus frischem Blattmaterial Blattstücke von 1cm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestochen. Als Negativkontrolle wurden Blattstücke einer nicht transgenen Apfelpflanze der Sorte ‚Pinova‘ verwendet. Für die Untersuchungen der transgenen Unterlage und des Stammbildners wurden jeweils drei Blattstücke getestet. Von dem nicht transgenen Edelreis wurden vier verschiedene Blattetagen (E1 bis E4) beprobt (Abbildung 5). Von jeder Blattetage wurden ebenfalls drei Blattstücke getestet, so dass insgesamt 12 Blattstücke vom Edelreis getestet wurden.



¹E1 bis E4: Bezeichnung der Blattetagen eins bis vier, die innerhalb des Edelreis analysiert wurden. ²Bei dem Stammbildner und der Unterlage wurden die Blätter für die Untersuchungen zum Transport der Transgenprodukte nicht entfernt, wie das normalerweise bei veredelten Apfelpflanzen der Fall ist.

Abbildung 5: Schematische Darstellung der beprobten Veredelungskomponenten einer veredelten Apfelpflanze für die Untersuchung mittels GUS-Test.

Das Pflanzenmaterial wurde in 3ml GUS-Puffer zunächst für 30-60 min bei 1Pa vakuumfiltriert und anschließend bei 37°C über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Chlorophyll mit Ethanol-Essigsäure (3:1) entfernt und die Blattstücke in destilliertem Wasser gewaschen. Die Bestimmung der GUS Aktivität erfolgte anhand der Blaufärbung der untersuchten Blattstücke. Dazu wurden die Intensität der Blaufärbung in fünf Klassen eingeteilt: Klasse 1: Blattstück komplett dunkelblau; Klasse 2: der Großteil (70-80%) der Blattstücke ist blau, zum Teil treten vereinzelt weiße Punkte auf; Klasse 3: das Blattstück ist komplett hellblau gefärbt; Klasse 4: der Großteil (70-80%) des Blattstücks ist weiß, zum Teil treten vereinzelt blaue Punkte auf; Klasse 5: das Blattstück ist komplett weiß.

3.3.16. Western-Blot-Analysen

Für die Extraktion von Gesamtprotein wurden 50-100mg verholztes Pflanzenmaterial unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu Pulver zerrieben. Das Probenmaterial wurde mit 300µl Proteinextraktionspuffer versetzt und für 5min bei 100°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10min und 13.200rpm zentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und mit 4V Aceton bei -20°C gefällt. Nach 10min wurden die Proben bei 13.200rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Pellet getrocknet. Anschließend wurden die Proteine in 50-100µl 1% Extraktionspuffer, 1x Blaupuffer und 1x Reducing Reagent (MBI-Fermentas, St Leon-Roth) gelöst. Zur Inaktivierung von Proteinasen wurde die Proteinlösung für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert oder bei -20°C eingefroren.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung von 200Volt für 1h unter Verwendung einer vertikalen Gelkammer auf einem 4-20%igen Criterion XT precast-Fertigel (Biorad, München) in 1x SRB Laufpuffer. Dazu wurde das Gel mit 30µl der Proteinlösung beladen.

Der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (Biorad, München) erfolgte mit Hilfe des Semi-dry-Blots. Das Acrylamidgel wurde für 5min in Anodenpuffer II equilibriert. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol angefeuchtet, mit Wasser gespült und anschließend kurz in Anodenlösung II getaucht. Für den Aufbau des Transferpaketes wurden zunächst 6 Lagen Whatman-Papier mit Anodenlösung I und weitere 3 Lagen Whatman-Papier in Anodenlösung II getränkt und luftblasenfrei auf die Graphitplatte

der Semi-dry-Blot-Apparatur (Biorad, München) gestapelt. Dann folgten die PVDF-Membran und das Gel. Das Gel wurde mit 9 Lagen Whatman-Papier, die zuvor in Kathodenlösung getaucht wurden, abgedeckt. Der Transfer erfolgte bei 20Volt für 30min. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt und anschließend mit Wasser bzw. 1x PBS wieder vollständig entfärbt.

Nach einstündiger Blockierung mit 3% BSA in 1x PBS wurde die Membran zweimal mit 1x PBS 10min gespült und danach für 1h mit dem Protein-spezifischen Antikörper¹⁰ (1:1000 in 1x PBS mit 10% BSA) inkubiert. Die Membran wurde dreimal jeweils 10min in Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper¹¹ (1:1000 in 1x PBS mit 10% Magermilchpulver) für 1h inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Membran für 10min erfolgte die Detektion mittels ECL-Plus-Detektion-Kit (Amersham, Freiburg). Die Signale wurden mit Hilfe des Laserscanners FX Pro Plus (Biorad, München) visualisiert.

¹⁰ Anti-Neomycin Phosphotransferase II (rabbit polyclonal IgG) (Biomol, Hamburg) für den Nachweis des NPTII-Proteins.

¹¹ ECL Anti-rabbit IgG peroxidase-linked species-specific whole antibody (Amersham, Freiburg) zur Detektion der Anti-Neomycin Phosphotransferase II .