

**Gentechnische Verfahren zur Verbesserung der
Resistenz gegenüber biotischen Stressfaktoren bei
Apfel *Malus × domestica* Borkh.**

Habilitationsschrift
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum habilitatus
(Dr. agr. habil.)

verteidigt am 07.01. 2013 an der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Dr. agr. Henryk Flachowsky
geb. am 05.10.1971 in Meerane

Gutachter:

Gutachter 1: Prof. Dr. Klaus Pillen (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Gutachter 2: Prof. Dr. Cesare Gessler (Eidgenössische Technische Hochschule
Zürich)

Gutachter 3: Prof. Dr. Magda-Viola Hanke (Julius Kühn-Institut, Bundesfor-
schungsinstitut für Kulturpflanzen)

Dekan der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Prof. Dr. Peter Wycisk

Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3' untranslatierter Bereich
AMP	antimikrobielles Protein
APHIS	Animal and Plant Health Inspection Service
ARS	Appalachian Fruit Research Station des Agricultural Research Service
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
bHLH	basic-helix-loop-helix
bzw.	beziehungsweise
dao1	<i>D-amino acid oxidase 1</i>
DG ENV	Generaldirektion Umwelt der Europäischen Kommission
DIPM	DspE-Interacting Protein from Malus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPS	Exo-Polysaccharid
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule
EU	Europäische Union
g	Gramm
GMO	genetisch modifizierter Organismus
gv	gentechnisch verändert
ha	Hektar
HcrVf2	Homolog to the <i>Cladosporium fulvum</i> resistance genes of the Vf region
HR	Hypersensibilitätsreaktion
hrpN	harpin N
i.d.R.	in der Regel
JKI	Julius Kühn-Institut
kg	Kilogramm
Lc	Leaf color
Mio.	Millionen
nptII	<i>Neomycinphosphotransferase II</i> Gen
ORF	offenes Leseraster
PPV	<i>Plum Pox Virus</i>
PRSV	<i>Papaya Ringspot Virus</i>

R-Gene	Resistenzgene
RNA	Ribonukleinsäure
S-Allel	Selbstinkompatibilitätsallel
STEPE	Sensitive Technologies and European Public Ethics
t	Tonnen
TAL	Transcription Activator-Like
T-DNA	Transfer-DNA
TIR-NBS-LRR	Toll/Interleukin 1 Nucleotide Binding Site Leucin Rich Repeats
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
USDA	United States Department of Agriculture
vgl.	vergleiche
VIGS	Virus induziertes Gen Silencing
WDR	WD-Repeat
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	7
2	Originalarbeiten (A1 – A17)	11
A1	Flachowsky et al. (2008) Transgenic expression of a viral EPS-depolymerase is potentially useful to induce fire blight resistance in apple. <i>Annals of Applied Biology</i> 153, 345-355	13
A2	Li et al. (2007) Maize <i>Lc</i> transcription factor causes induction of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (<i>Malus domestica</i> Borkh.). <i>Planta</i> 226, 1243-1254	15
A3	Flachowsky et al. (2010) Transgenic apple plants overexpressing the <i>Lc</i> gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight. <i>Planta</i> 231, 623-635	17
A4	Szankowski et al. (2009) Shift in polyphenol profile and sublethal phenotype caused by silencing of anthocyanidin synthase in apple (<i>Malus</i> sp.). <i>Planta</i> 229, 681-692	19
A5	Flachowsky et al. (2011) Silencing of flavanone-3-hydroxylase in apple (<i>Malus x domestica</i>) leads to accumulation of flavanones, but not to reduced fire blight susceptibility. <i>Plant Physiology and Biochemistry</i> 51, 18-25	21
A6	Gosch et al. (2011) Substrate specificity and contribution of the glycosyltransferase UGT71A15 to phloridzin biosynthesis. <i>Trees</i> 26, 259-271	23
A7	Vanblaere et al. (2011) The development of a cisgenic apple. <i>Journal of Biotechnology</i> 154(4), 304-311	25
A8	Herzog et al. (2012) Heat-shock-mediated elimination of the <i>nptII</i> marker gene in transgenic apple (<i>Malus x domestica</i> BORKH.). <i>Gene</i> 498, 41-49	27
A9	Hättasch et al. (2009) Evaluation of an alternative D-amino acid/DAAO selection system for transformation in apple (<i>Malus domestica</i> Borkh.). <i>The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, ISAFRUIT Special Issue</i> , 188-194	29
A10	Hanke et al. (2007) No flower no fruit – genetic potentials to trigger flowering in fruit trees. <i>Genes, Genomes and Genomics</i> 1, 1-20	31

A11	Hättasch et al. (2008) Isolation of flowering genes and seasonal changes in their transcript levels related to flower induction and initiation in apple (<i>Malus domestica</i>). Tree Physiology 28, 1459-1466	33
A12	Flachowsky et al. (2010) Overexpression of <i>LEAFY</i> in apple leads to a columnar phenotype with shorter internodes. Planta 231, 251-263	35
A13a	Tränkner et al. (2010) Over-expression of an <i>FT</i> -homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. Planta 232 (6), 1309-1324	37
A13b	Tränkner et al. (2011) Note added in proof to: Over-expression of an <i>FT</i> -homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. Planta 233, 217-218	39
A14	Flachowsky et al. (2007) Overexpression of <i>BpMADS4</i> from silver birch (<i>Betula pendula</i> Roth.) induces early flowering in apple (<i>Malus x domestica</i> Borkh.). Plant Breeding 126, 137-145	41
A15	Flachowsky et al. (2009) A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. Plant Breeding 128, 217-226	43
A16	Flachowsky et al. (2011) Applying a high-speed breeding technology to apple (<i>Malus x domestica</i>) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. New Phytologist 192, 364-377	45
A17	Le Roux et al. (2011) Use of a transgenic early flowering approach in apple (<i>Malus x domestica</i> Borkh.) to introgress fire blight resistance from 'Evereste'. Molecular Breeding 30, 857-874	47
3	Zusammenfassende Diskussion	49
3.1	Erhöhung der Krankheitsresistenz in Apfel durch transgene Ansätze	49
3.2	Etablierung alternativer Selektionsverfahren zur Erzeugung cisgener Pflanzen	57
3.3	Funktionelle Charakterisierung von Genen zum Brechen der juvenilen Phase des Apfels und Aufbau eines Fastbreeding-Verfahrens	66
4	Zusammenfassung (in Deutsch und Englisch)	70
5	Literaturverzeichnis	74

6	Danksagung	87
	Lebenslauf	90
	Eidesstattliche Erklärung	91

1 Einleitung und Fragestellung

Frisches Obst gehört zu den bedeutendsten Bestandteilen einer gesunden menschlichen Ernährung. Es ist allgemein bekannt, dass eine Nahrung, die reich an frischem Obst und Gemüse ist und nur einen geringen Anteil an gesättigten Fetten enthält, sehr gesund ist und vorbeugend gegenüber Herz-, Kreislauf- und verschiedenen Krebserkrankungen wirkt (Block et al. 1992, Ferro-Luzzi et al. 1994, Morris et al. 1994, Gossé et al. 2005, Seeram et al. 2006, Veeriah et al. 2006). Aus diesem Grund empfiehlt die Weltgesundheitsorganisation (WHO) seit 1990 die tägliche Pro-Kopf-Einnahme von mehr als 400 g an Obst und Gemüse (WHO 1990).

Der tägliche Pro-Kopf-Verbrauch bei Obst lag 2007 im weltweiten Durchschnitt bei 189 g, was einem Weltjahresbedarf von rund 455 Mio. t (ohne Wein, <http://faostat.fao.org>) entsprach. Dieser Bedarf spiegelt sich auch in den Anbauzahlen wieder. So erstreckte sich der Obstbau im Jahr 2009 weltweit auf rund 56 Mio. ha. Auf dieser Fläche wurden rund 594 Mio. t Obst (ohne Melonen, <http://faostat.fao.org>) produziert. Auch in Europa ist der Obstbau von großer ökonomischer Bedeutung. Der mittlere Pro-Kopf-Verbrauch in der Europäischen Union (EU) lag im Jahr 2007 bei insgesamt 104 kg, was einem Jahresgesamtbedarf von rund 52 Mio. t entsprach (<http://faostat.fao.org>).

Der Apfel *Malus × domestica* Borkh. gehörte in 2010 mit einer Produktionsmenge von rund 70 Mio. t zu den drei bedeutendsten Obstarten weltweit. Äpfel werden in insgesamt 93 Staaten auf der Erde produziert, wobei 64% der Gesamtmenge in China, den USA, der Türkei, in Italien und Indien erzeugt werden. Rund 20% aller Äpfel werden in der EU produziert. Die führenden Länder im Anbau sind hier Italien, Polen, Frankreich, Russland, die Ukraine und Deutschland (<http://faostat.fao.org>). In der EU gehört der Apfel mit einem erwarteten Jahresbedarf von rund 11 Mio. t für 2011 und einem erwarteten Produktionsvolumen von rund 10 Mio. t zu den bedeutendsten einheimischen Obstarten (Schwartau 2011). Der Großteil dieser Äpfel (etwa 70%) besteht aus fünf Sorten: 'Golden Delicious' (33%), 'Gala' (14%), 'Red Delicious' (8%), 'Jonagold' (8%) und 'Idared' (7%) (Schwartau 2011, Schwartau und Görgens 2011). Diese Sorten werden vor allem von Verbrauchern und Erzeugern sowie von den Märkten aufgrund ihres attraktiven Aussehens, ihres guten Geschmacks sowie den hervorragenden Lagereigenschaften favorisiert

(Norelli et al. 2003, Gessler et al. 2006). Ein entscheidender Nachteil dieser Sorten ist jedoch ihre Anfälligkeit gegenüber den bedeutendsten Krankheiten im Apfelanbau. So sind diese Sorten anfällig gegenüber den Erregern des Apfelschorfes *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, des Apfelmehltaus *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Everh.) Salmon und des bakteriellen Feuerbrandes *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.. Allein zur Bekämpfung der beiden Pilzkrankheiten werden im Erwerbsobstbau in Deutschland jährlich etwa 10 (Wirtschaftsobst) bzw. 16 (Tafelobst) Behandlungen mit Fungiziden durchgeführt (Roßberg 2007). Noch wesentlich schwieriger gestaltet sich die Bekämpfung des Feuerbrandes. Eine effektive Bekämpfung dieser Krankheit ist momentan nur mit kupferhaltigen Präparaten bzw. mit Streptomycin möglich. Kupferhaltige Präparate sind jedoch derzeit in Deutschland nicht zugelassen und die Anwendung von Streptomycin ist nur im Ausnahmefall bei „Gefahr im Verzug“, in begrenztem Umfang und für die Dauer von 120 Tagen möglich (siehe § 11 Absatz 2 Satz 1 Nr. 2 Pflanzenschutzgesetz). Andere in Deutschland zugelassene Mittel zeigen nicht die für die konventionell oder integriert wirtschaftenden Betriebe erforderliche hinreichend zuverlässige Wirksamkeit (Feuerbrand-Strategiepapier 2008-2012, <http://www.bmelv.de/>). Eine Lösung dieses Problems wird vor allem im Anbau resistenter Sorten gesehen (Peil et al. 2007). Einige wenige Apfelsorten, die über eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Widerstandsfähigkeit (meist gegenüber Apfelschorf) verfügen, sind bereits am Markt zu finden (Gessler et al. 2006). Diese Sorten fanden aufgrund ihrer oft noch unzureichenden Fruchtqualität z.T. nur Eingang in den Haus- und Kleingartenbereich. In geringem Maße finden sie aber auch im Erwerbsobstbau Verwendung (Statistisches Bundesamt: „Landwirtschaftliche Bodennutzung, Baumobstflächen 2007“), insbesondere wenn ein Ab-Hof-Verkauf realisiert wird. Die Züchtung neuer resistenter Apfelsorten für den Erwerbsobstbau mit einer Fruchtqualität, die mit den „Top 10 Weltsorten“ vergleichbar ist, steht deshalb an erster Stelle in vielen internationalen Apfelzüchtungsprogrammen (Peil et al. 2011). Geeignete Resistenzquellen für einen züchterischen Ansatz sind teilweise in älteren Sorten mit geringer Fruchtqualität und in verschiedenen, in der Literatur beschriebenen Zuchtklonen verfügbar. Meist kommen sie jedoch nur in kleinfrüchtigen Wildarten innerhalb der Gattung *Malus* vor (Lesemann und Dunemann 2005, Gessler et al. 2006,

Peil et al. 2009, Bowen et al. 2011). Um solche Resistenzen nutzbar zu machen, sind langwierige und aufwendige Kreuzungsprogramme notwendig. Dabei hat die klassische Kreuzungszüchtung zwei wesentliche Handicaps zu überwinden. Zum einen sind die Pflanzen der Gattung *Malus* selbstinkompatibel und demzufolge in hohem Maße heterozygot. Die Nachkommen einer Kreuzungskombination unterscheiden sich folglich sehr stark in der Ausprägung einzelner Merkmale, welche vom Pflanzenhabitus bis hin zur Fruchtqualität reichen. Zum anderen ist der Zuchterfolg durch eine lange juvenile Phase der Sämlinge eingeschränkt. Diese Phase, in der die Sämlinge weder Blüten noch Früchte bilden können, dauert 4 bis 6 Jahre und zum Teil noch länger (Hanke et al. 2007). Eine komplette Evaluierung einer Nachkommenschaft ist damit erst möglich, nachdem alle Sämlinge die adulte Phase erreicht haben. Rückkreuzungsprogramme, welche für die Introgression von Resistenzen aus Wildarten unumgänglich sind, sind deshalb sehr zeitaufwendig und dauern in der Regel mehrere Jahrzehnte (Flachowsky et al. 2009). Anschließend sind noch mehrere Jahre notwendig, um die neue Sorte am Markt zu platzieren. Allein dieser Prozess hat im Fall der Pillnitzer Apfelsorte 'Pinova' 14 Jahre gedauert (Peil und Hanke 2005). Wesentlich günstiger erscheint es deshalb, bereits am Markt etablierte und erfolgreiche Sorten in ihren Eigenschaften zu verbessern. Das ist mithilfe klassischer Züchtungsmethoden jedoch nicht möglich. Einen Ausweg könnten hier gentechnische Verfahren bieten. Mithilfe gentechnischer Verfahren ist es möglich, einzelne Gene in einen bestehenden genetischen Hintergrund zu übertragen, um auf diese Weise etablierte Sorten in ausgewählten Eigenschaften (z.B. Krankheitsresistenz) zu verbessern. Um zu prüfen, welchen Nutzen gentechnische Verfahren für die praktische Apfelzüchtung bringen können, sollen im Rahmen dieser Arbeit verschiedene gentechnische Verfahren und Strategien vorgestellt werden.

Dieser Habilitationsarbeit liegen insgesamt 17 Originalarbeiten zugrunde. Diese Arbeiten hatten das Ziel:

- (A) Die Krankheitsresistenz in Apfel durch transgene Ansätze zu erhöhen (A1-A6).
- (B) Alternative Verfahren zur Selektion gentechnisch veränderter Pflanzen an Apfel zu testen, um mit deren Hilfe cisgene Pflanzen zu erzeugen (A7-A9).

- (C) Die Blütenbiologie des Apfels zu studieren, um Gene zu selektieren, mit deren Hilfe es möglich ist, die juvenile Phase des Apfels zu verkürzen (A10-A14).
- (D) Ein Fastbreeding-Verfahren mithilfe von transgenen Apfelpflanzen mit verkürzter juveniler Phase aufzubauen, mit dem es möglich ist, aufwendige Züchtungsprogramme bei Apfel in wenigen Jahren realisieren zu können (A15-A17).

2 Originalarbeiten (A1 – A17)

- A1 Flachowsky H, Richter K, Kim W-S, Geider K, Hanke M-V (2008) Transgenic expression of a viral EPS-depolymerase is potentially useful to induce fire blight resistance in apple. *Annals of Applied Biology* 153, 345-355
- A2 Li H, Flachowsky H, Fischer THC, Hanke V, Forkmann G, Treutter D, Schwab W, Hoffmann TH, Szankowski I (2007) Maize *Lc* transcription factor causes induction of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Planta* 226, 1243-1254
- A3 Flachowsky H, Szankowski I, Fischer TC, Richter K, Peil A, Höfer M, Dörschel C, Schmoock S, Gau AE, Halbwirth H, Hanke M-V (2010) Transgenic apple plants overexpressing the *Lc* gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight. *Planta* 231, 623-635
- A4 Szankowski I, Flachowsky H, Li H, Halbwirth H, Treutter D, Regos I, Hanke M-V, Stich K, Fischer TC (2009) Shift in polyphenol profile and sublethal phenotype caused by silencing of anthocyanidin synthase in apple (*Malus* sp.). *Planta* 229, 681-692
- A5 Flachowsky H, Halbwirth H, Treutter D, Richter K, Hanke M-V, Szankowski I, Gosch C, Stich K, Fischer TC (2011) Silencing of flavanone-3-hydroxylase in apple (*Malus x domestica*) leads to accumulation of flavanones, but not to reduced fire blight susceptibility. *Plant Physiology and Biochemistry* 51, 18-25
- A6 Gosch C, Flachowsky H, Halbwirth H, Thill J, Mjka-Wittmann R, Treutter D, Richter K, Hanke M-V, Stich K (2011) Substrate specificity and contribution of the glycosyltransferase UGT71A15 to phloridzin biosynthesis. *Trees* 26, 259-271
- A7 Vanblaere T, Szankowski I, Schaart J, Schouten H, Flachowsky H, Broggin GA, Gessler C (2011) The development of a cisgenic apple. *Journal of Biotechnology* 154, 304-311
- A8 Herzog K, Flachowsky H, Deising HB, Hanke M-V (2012) Heat-shock-mediated elimination of the *nptII* marker gene in transgenic apple (*Malus x domestica* BORKH.). *Gene* 498, 41-49
- A9 Hättasch C, Flachowsky H, Hanke M-V (2009) Evaluation of an alternative D-amino acid/DAAO selection system for transformation in apple (*Malus domestica* Borkh.). *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, ISAFRUIT Special Issue*, 188-194
- A10 Hanke M-V, Flachowsky H, Peil A, Hättasch C (2007) No flower no fruit – genetic potentials to trigger flowering in fruit trees. *Genes, Genomes and Genomics* 1, 1-20
- A11 Hättasch C, Flachowsky H, Kapturska D, Hanke M-V (2008) Isolation of flowering genes and seasonal changes in their transcript levels related to flower induction and initiation in apple (*Malus domestica*). *Tree Physiology* 28, 1459-1466

- A12 Flachowsky H, Hättasch C, Höfer M, Peil A, Hanke M-V (2010) Overexpression of *LEAFY* in apple leads to a columnar phenotype with shorter internodes. *Planta* 231, 251-263
- A13a Tränkner C, Lehmann S, Hoenicka H, Hanke M-V, Fladung M, Lenhardt D, Dunemann F, Gau A, Schlangen K, Malnoy M, Flachowsky H (2010) Overexpression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232 (6), 1309-1324
- A13b Tränkner C, Lehmann S, Hoenicka H, Hanke M-V, Fladung M, Lenhardt D, Dunemann F, Gau A, Schlangen K, Malnoy M, Flachowsky H (2011) Note added in proof to: Over-expression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 233, 217-218
- A14 Flachowsky H, Peil A, Sopanen T, Elo A, Hanke V (2007) Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early flowering in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Breeding* 126, 137-145
- A15 Flachowsky H, Hanke M-V, Peil A, Strauss SH, Fladung M (2009) A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breeding* 128, 217-226
- A16 Flachowsky H, Le Roux P-M, Peil A, Patocchi A, Richter K, Hanke M-V (2011) Applying a high-speed breeding technology to apple (*Malus x domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. *New Phytologist* 192, 364-377
- A17 Le Roux P-M, Flachowsky H, Hanke M-V, Gessler C, Patocchi A (2011) Use of a transgenic early flowering approach in apple (*Malus x domestica* Borkh.) to introgress fire blight resistance from 'Evereste'. *Molecular Breeding* 30, 857-874

- A1 Flachowsky et al. (2008) Transgenic expression of a viral EPS-depolymerase is potentially useful to induce fire blight resistance in apple. *Annals of Applied Biology* 153, 345-355

Transgenic expression of a viral EPS-depolymerase is potentially useful to induce fire blight resistance in apple

H. Flachowsky¹, K. Richter², W.-S. Kim^{3,4}, K. Geider³, M.-V. Hanke¹

¹ Julius Kühn-Institute, Federal Institute for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Dresden, Germany

² Julius Kühn-Institute, Federal Institute for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Quedlinburg, Germany

³ Julius Kühn-Institute, Federal Institute for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Dossenheim, Germany

⁴ Present address: Norgen Biotek Corporation, Thorold, Ontario, Canada

Abstract

Fire blight caused by *Erwinia amylovora* is the most destructive bacterial disease of pear and apple. The goal of this research was to improve fire blight resistance of apple by transformation with a gene encoding for an extracellular polysaccharide (EPS)-depolymerase from the *E. amylovora* phage phi-Ea1h. The EPS-depolymerase gene (*dpo*) driven by the constitutive promoter *CaMV35S* was transferred into apple scion cv. 'Pinova' through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disk transformation using a binary vector and strains EHA105 or LBA4404. The integration of the *dpo* gene and the marker gene *nptII* was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) and by Southern hybridisation. From 4.560 leaves inoculated in 23 different transformation experiments, 33 independent shoots, regenerated from a single transformation event, were identified as transgenic. Nine of the shoots were randomly selected and vegetatively propagated to establish transgenic clones. The transgenic clones were diploid as was the non-transgenic genotype 'Pinova' analysed by flow cytometry. Both transgenes (*dpo* and *nptII*) were transcriptionally active determined by reverse transcription (RT)-PCR and quantitative RT-PCR. EPS-depolymerase was expressed in all transgenic clones showing substantial differences in its activity for different clones concerning EPS degradation. Resistance to *E. amylovora* was evaluated by infection of *in vitro* leaves as well as by artificial shoot inoculation of *ex vitro* plants in the greenhouse. No correlation was obtained for the transgenic lines between the level of *dpo* gene expression and both the level of depolymerase activity and the disease resistance *in vitro*, whereas, depolymerase activity did correlate positively with resistance to fire blight *in vitro*. Seven clones had less disease than the non-

transformed genotype when measured in greenhouse, but no statistically significant differences were found, except for line T373. One line showed the highest depolymerase activity and the least susceptibility to fire blight *in vitro* as well as in greenhouse (T187).

- A2 Li et al. (2007) Maize *Lc* transcription factor causes induction of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Planta* 226, 1243-1254

Maize *Lc* transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.)

H. Li¹, H. Flachowsky², T. C. Fischer³, M.-V. Hanke², G. Forkmann³, D. Treutter⁴, W. Schwab⁵, T. Hoffmann⁵, I. Szankowski¹

¹ Institute of Biological Production Systems, Fruit Science Section, Leibniz University of Hannover, Herrenhaeuser Str. 2, 30419 Hannover, Germany

² Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants, Institute of Fruit Breeding, Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden, Germany

³ Chair for Ornamental Plants and Horticultural Plant Breeding, Department for Plant Sciences, Technical University Munich, Am Hochanger 4, 85350 Freising, Germany

⁴ Unit of Fruit Science, Department for Plant Sciences, Technical University of Munich, Alte Akademie 16, 85350 Freising, Germany

⁵ Biomolecular Food Technology, Technical University of Munich, Lise-Meitner-Str. 34, 85354 Freising, Germany

Abstract

Flavonoids are a large family of polyphenolic compounds with manifold functions in plants. Present in a wide range of vegetables and fruits, flavonoids form an integral part of the human diet and confer multiple health benefits. Here, we report on metabolic engineering of the flavonoid biosynthetic pathways in apple (*Malus domestica* Borkh.) by overexpression of the maize (*Zea mays* L.) *leaf colour* (*Lc*) regulatory gene. The *Lc* gene was transferred into the *M. domestica* cultivar Holsteiner Cox via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation which resulted in enhanced anthocyanin accumulation in regenerated shoots. Five independent *Lc* lines were investigated for integration of *Lc* into the plant genome by Southern blot and PCR analyses. The *Lc*-transgenic lines contained one or two *Lc* gene copies and showed increased mRNA levels for phenylalanine ammonia-lyase (PAL), chalcone synthase (CHS), flavanone 3 beta-hydroxylase (FHT), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), leucoanthocyanidin reductases (LAR), anthocyanidin synthase (ANS) and anthocyanidin reductase (ANR). HPLC-DAD and LC-MS analyses revealed higher levels of the anthocyanin idaein (12-fold), the flavan 3-ol epicatechin (14-fold), and especially the isomeric Catechin (41-fold), and some distinct dimeric proanthocyanidins (7 to 134-fold) in leaf tissues of *Lc*-transgenic lines. The levels of phenylpropanoids and their derivatives were only slightly increased. Thus, *Lc* overexpression in *Malus domestica* resulted in enhanced

biosynthesis of specific flavonoid classes, which play important roles in both phytopathology and human health.

- A3 Flachowsky et al. (2010) Transgenic apple plants overexpressing the *Lc* gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight. *Planta* 231, 623-635

Transgenic apple plants overexpressing the *Lc* gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight

H. Flachowsky¹, I. Szankowski², T. C. Fischer³, K. Richter⁴, A. Peil¹, M. Höfer¹, C. Dörschel⁵, S. Schmoock⁶, A. E. Gau⁶, H. Halbwirth⁷, M.-V. Hanke¹

¹ Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Dresden, Germany

² Plant Pathology, Institute of Integrative Biology, ETH Zurich, Zurich, Switzerland

³ Plant Biochemistry and Physiology, Ludwig-Maximilians-University Munich, Planegg-Martinsried, Germany

⁴ Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Quedlinburg, Germany

⁵ Technical University Bergakademie Freiberg, Faculty of Chemistry and Physics, Institute for Biosciences, Freiberg, Germany

⁶ Leibnitz University Hannover, Institute of Botany, Hannover, Germany

⁷ Institute of Chemical Engineering, Technical University of Vienna, Vienna, Austria

Abstract

Transgenic apple plants (*Malus x domestica* cv. 'Holsteiner Cox') overexpressing the *Leaf Colour (Lc)* gene from maize (*Zea mays*) exhibit strongly increased production of anthocyanins and flavan-3-ols (catechins, proanthocyanidins). Greenhouse plants investigated in this study exhibit altered phenotypes with regard to growth habit and resistance traits. *Lc*-transgenic plants show reduced size, transversal gravitropism of lateral shoots, reduced trichome development, and frequently reduced shoot diameter and abnormal leaf development with fused leaves. Such phenotypes seem to be in accordance with a direct or an indirect effect on polar-auxin-transport in the transgenic plants. Furthermore, leaves often develop necrotic lesions resembling hypersensitive response lesions. In tests, higher resistance against fire blight (caused by the bacterium *Erwinia amylovora*) and against scab (caused by the fungus *Venturia inaequalis*) is observed. These phenotypes are discussed with respect to the underlying altered physiology of the *Lc*-transgenic plants. The results are expected to be considered in apple breeding strategies.

- A4 Szankowski et al. (2009) Shift in polyphenol profile and sublethal phenotype caused by silencing of anthocyanidin synthase in apple (*Malus* sp.). *Planta* 229, 681-692

Shift in polyphenol profile and sublethal phenotype caused by silencing of anthocyanidin synthase in apple (*Malus* sp.)

I. Szankowski¹, H. Flachowsky², H. Li¹, H. Halbwirth³, D. Treutter⁴, I. Regos⁴, M.-V. Hanke², K. Stich³, T. C. Fischer⁵

¹ Institute of Biological Production Systems, Fruit Science Section, Leibniz University of Hannover, Herrenhaeuser Str. 2, D-30419 Hannover, Germany

² Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre on Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Pillnitzer Platz 3a, D-01326 Dresden, Germany

³ Institute of Chemical Engineering, Technical University of Vienna, Getreidemarkt 9/173, A-1060 Vienna, Austria

⁴ Unit of Fruit Science, Department for Plant Sciences, Technical University of Munich, Dürnast 2, 85350 D-Freising, Germany

⁵ Plant Biochemistry, LMU Munich, Großhaderner Str. 2, D-82152 Planegg-Martinsried, Germany

Abstract

We have investigated the consequences of blocking anthocyanin biosynthesis by silencing a key enzyme, anthocyanidin synthase, in transgenic plants of a red-leaved apple cultivar. This is complementary to a previous study of induction of anthocyanin biosynthesis by overexpressing a heterologous transcription factor. Analysis of these opposite phenotypes allows one to study anthocyanin functions in apple and to test the influence of the genetic manipulation on other, related metabolites. As expected, anthocyanin biosynthesis was almost completely blocked and this was accompanied by a shift in the profile of flavonoids and related polyphenols. Most interestingly, a rise in epicatechin was found. A severe reduction of viability by necrotic leaf lesions was also observed, suggesting an essential function of anthocyanins in apple.

- A5 Flachowsky et al. (2011) Silencing of flavanone-3-hydroxylase in apple (*Malus x domestica*) leads to accumulation of flavanones, but not to reduced fire blight susceptibility. *Plant Physiology and Biochemistry* 51, 18-25

Silencing of flavanone-3-hydroxylase in apple (*Malus x domestica*) leads to accumulation of flavanones, but not to reduced fire blight susceptibility

H. Flachowsky¹, H. Halbwirth², D. Treutter³, K. Richter⁴, M.-V. Hanke¹, I. Szankowski⁵, C. Gosch², K. Stich², T. C. Fischer^{2,6}

¹ Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Fruit Breeding, Dresden, Germany

² Technical University of Vienna, Institute of Chemical Engineering, Vienna, Austria

³ Unit of Fruit Science, Department for Plant Sciences, Technical University of Munich, Freising, Germany

⁴ Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Quedlinburg, Germany

⁵ Plant Pathology, Institute of Integrative Biology (IBZ), ETH Zurich, Switzerland

⁶ Plant Biochemistry and Physiology, Dept. I, Biocenter Botany, LMU Munich, Planegg-Martinsried, Germany

Abstract

Transgenic antisense flavanone 3-hydroxylase apple plants were produced to mimic the effect of the agrochemical prohexadione-Ca on apple leaves. This enzyme inhibitor for 2-oxoglutarate dependent dioxygenases is used as a growth retardant and for control of secondary fire blight of leaves. Like using the agent, silencing of flavanone 3-hydroxylase leads to an accumulation of flavanones in leaves, but in contrast not to the formation of 3-deoxyflavonoids. In prohexadione-Ca treated leaves the 3-deoxyflavonoid luteoflorol is formed from accumulating flavanones, acting as an antimicrobial compound against the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Seemingly, the silencing of just one of the 2-oxoglutarate dependent dioxygenases (in apple also flavonol synthase and anthocyanidin synthase take part downstream in the pathway) does not provide a high ratio of flavanones to dihydroflavonols. This seems to be needed to let the dihydroflavonol-4-reductase/flavanone-4-reductase enzyme reduce flavanones to luteoflorol, and to let this be reduced by the leucoanthocyanidin-4-reductase/3-deoxyflavonol-4-reductase, each acting with their respective weak secondary activities. Accordingly, also the intended inducible resistance to fire blight by prohexadione-Ca is not observed with the antisense flavanone-3-hydroxylase apple plants.

On the other hand, for most transgenic lines with strong flavanone-4-reductase down-regulation, up-regulation of gene expression for the other flavonoid genes was found.

This provides further evidence for the feedback regulation of flavonoid gene expression having been previously reported for the prohexadione-Ca inhibited apple plants.

A6 Gosch et al. (2011) Substrate specificity and contribution of the glycosyltransferase UGT71A15 to phloridzin biosynthesis. *Trees* 26, 259-271

Substrate specificity and contribution of the glycosyltransferase UGT71A15 to phloridzin biosynthesis

C. Gosch¹, H. Flachowsky², H. Halbwirth¹, J. Thill¹, R. Mjka-Wittmann¹, D. Treutter³, K. Richter⁴, M.-V. Hanke², K. Stich¹

¹ Vienna University of Technology, Institute of Chemical Engineering, Vienna, Austria

² Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Fruit Breeding, Dresden, Germany

³ Unit Fruit Science, Technische Universität München, Freising, Germany

⁴ Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Quedlinburg, Germany

Abstract

The dihydrochalcone phloridzin (phloretin 2'-O-glucoside) is the most abundant phenolic compound in apple trees (*Malus x domestica*) and was also discussed to have an influence on the pathogen defence by shifting the dihydrochalcone profile from the glucosides to the more active aglycones. The final step in the biosynthesis of phloridzin is the glycosylation of phloretin at position 2'. Three cDNA clones from apple encoding glycosyltransferases are available which are able to catalyze the reaction *in vitro*. We investigated the possible role of glycosyltransferase UGT71A15 in phloridzin biosynthesis. The recombinant enzyme showed broad substrate acceptance but highest activities were observed with flavonols. Specific activities and the kinetic data indicated that phloretin is not the preferred native substrate of the UGT71A15. Overexpression of UGT71A15 in transgenic apple trees did not lead to morphological changes. However, an increase of the molar ratio phloridzin:phloretin was found in all clones, indicating a physiological relevance of UGT71A15 *in planta*, although a decrease of the total amount of dihydrochalcones in the majority of the samples was found. Unexpectedly, the increase of the phloridzin:phloretin ratio was not reflected by an increase of the glycosyltransferase activities. In contrast, the majority of transgenic plants showed a reduced glycosylating activity with both phloretin and quercetin as a substrate, but the observed activity changes in a given sample were not similar for the two substrates. An increased susceptibility of *M. robusta* against the fire blight causing bacterium *E. amylovora* as a result of UGT71A15 overexpression could not be observed.

A7 Vanblaere et al. (2011) The development of a cisgenic apple. Journal of Biotechnology 154(4), 304-311

The development of a cisgenic apple plant

T. Vanblaere¹, I. Szankowski¹, J. Schaart², H. Schouten², H. Flachowsky³, G.A.L. Brogini¹, C. Gessler¹

¹ Plant Pathology, Institute of Integrative Biology (IBZ), ETH Zürich, Universitätstrasse 2, 8092 Zürich, Switzerland

² Plant Research International, Wageningen University and Research Centre, PO Box 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

³ Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden, Germany

Abstract

Cisgenesis represents a step toward a new generation of GM crops. The lack of selectable genes (e.g. antibiotic or herbicide resistance) in the final product and the fact that the inserted gene(s) derive from organisms sexually compatible with the target crop should rise less environmental concerns and increase consumer's acceptance. Here we report the generation of a cisgenic apple plant by inserting the endogenous apple scab resistance gene *HcrVf2* under the control of its own regulatory sequences into the scab susceptible apple cultivar Gala. A previously developed method based on *Agrobacterium*-mediated transformation combined with a positive and negative selection system and a chemically inducible recombination machinery allowed the generation of apple cv. Gala carrying the scab resistance gene *HcrVf2* under its native regulatory sequences and no foreign genes. Three cisgenic lines were chosen for detailed investigation and were shown to carry a single T-DNA insertion and express the target gene *HcrVf2*. This is the first report of the generation of a true cisgenic plant.

A8 Herzog et al. (2012) Heat-shock-mediated elimination of the *nptII* marker gene in transgenic apple (*Malus × domestica* BORKH.). Gene 498, 41-49

Heat-shock-mediated elimination of the *nptII* marker gene in transgenic apple (*Malus × domestica* Borkh.)

K. Herzog^{1,2}, H. Flachowsky¹, H. B. Deising^{3,4}, M.-V. Hanke¹

¹ Julius Kühn-Institute - Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Pillnitzer Platz 3a, D-01326 Dresden, Germany

² Julius Kühn-Institute - Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof, Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen, Germany, present address

³ Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Faculty of Natural Sciences III, Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Phytopathology and Plant Protection, Betty-Heimann-Str. 3, D-06120 Halle (Saale), Germany

⁴ Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Interdisciplinary Center for Crop Plant Research, Betty-Heimann-Str. 3, D-06120 Halle (Saale), Germany

Abstract

Production of marker-free genetically modified (GM) plants is one of the major challenges of molecular fruit breeding. Employing clean vector technologies, allowing the removal of undesired DNA sequences from GM plants, this goal can be achieved. The present study describes the establishment of a clean vector system in apple *Malus × domestica* Borkh., which is based on the use of the *neomycin phosphotransferase II* gene (*nptII*) as selectable marker gene and kanamycin/paramomycin as selective agent. The *nptII* gene can be removed after selection of GM shoots via site-specific excision mediated by heat-shock-inducible expression of the budding yeast FLP recombinase driven by the soybean Gmhsp17.5-E promoter. We created a monitoring vector containing the *nptII* and the *flp* gene as a box flanked by two direct repeats of the *flp* recognition target (FRT) sites. The FRT-flanked box separates the *gusA* reporter gene from the Cauliflower Mosaic Virus 35S (CaMV 35S) promoter. Consequently, GUS expression does only occur after elimination of the FRT flanked box. Transformation experiments using the monitoring vector resulted in a total of nine transgenic lines. These lines were investigated for transgenicity by PCR, RT-PCR and Southern hybridization. Among different temperature regimes tested, exposure to 42 °C for 3.5 to 4 h led to efficient induction of FLP-mediated recombination and removal of the *nptII* marker gene. A second round of shoot regeneration from leaf explants led to GM apple plants completely free of the *nptII* gene.

- A9 Hättasch et al. (2009) Evaluation of an alternative D-amino acid/DAAO selection system for transformation in apple (*Malus domestica* Borkh.). The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, ISAFRUIT Special Issue, 188-194

Evaluation of an alternative D-amino acid/DAAO selection system for transformation in apple (*Malus x domestica* Borkh.)

C. Hättasch¹, H. Flachowsky¹, M.-V. Hanke¹

¹ Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden, Germany

Abstract

The conventional selection system for apple transformation is based on the selectable marker gene, *nptII*, encoding antibiotic resistance against kanamycin. We tested an alternative selection system based on the use of D-amino acids using the gene, *D-amino acid oxidase 1 (dao1)* as the selectable marker, in order to avoid the presence of antibiotic resistance genes in the resulting transgenic apple plants. In addition, *dao1* allowed the selection as well as the elimination of *dao1*-transgenic plants, based on differences in the toxicity of different D-amino acids. Regeneration experiments using apple leaf explants revealed that 2 mM D-serine or D-alanine inhibited shoot regeneration. We performed transformation experiments using the apple cultivars 'Gala', 'Holsteiner Cox', and a progeny of the apple cultivar 'Pinova', and the vector p35S::*dao1*-intron, containing the *dao1* and *nptII* selectable marker genes. Several shoots regenerated successfully on selection media containing various concentrations of D-serine or D-alanine, but transgenic shoots were not obtained. However, three *dao1/nptII* transgenic apple lines were obtained after selection with kanamycin, indicating that the vector was functional. Furthermore, we showed that 20 mM D-serine could be used to select *dao1*-transgenic shoots from non-transgenic *in vitro* shoots, whereas 13 mM D-isoleucine had the opposite effect.

A10 Hanke et al. (2007) No flower no fruit – genetic potentials to trigger flowering in fruit trees. *Genes, Genomes and Genomics* 1, 1-20

No flower no fruit – genetic potentials to trigger flowering in fruit trees

M.-V. Hanke¹, H. Flachowsky¹, A. Peil¹, C. Hättasch¹

¹ Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants, Institute for Fruit Breeding, Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden, Germany

Abstract

The development of flower buds and a sufficient fruit set are basic requirements for fruit growers to generate a marketable crop. However, fruit trees remain in a juvenile (nonflowering) phase for years, and after a transition period of getting reproductively competent they enter the adult phase of tree life. The reproductive phase is associated with the ability to alternate between the production of vegetative and reproductive buds. Efficient breeding is limited in fruit trees due to the long period of juvenility. Therefore, it is important to accelerate flowering by reducing the juvenile phase of the tree. In fruit production, precocious flowering of the tree is also favoured to reduce the vegetative phase of tree development after planting in order to obtain the earliest fruit crop. Additional critical aspects of flower development in fruit trees, such as alternate bearing, accentuate the necessity to improve our understanding on genetic factors controlling floral initiation as well as flower and fruit development in perennial fruit trees. Most of what we know about regulating floral development is based on research in annual plants, like *Arabidopsis thaliana*. In this review, we summarize floral transition, meristem development and flower bud formation in *Malus domestica*, one of the most important representatives of temperate fruit trees. We also focus on current findings of the transition from vegetative to reproductive growth obtained in *Arabidopsis* and how this knowledge can be applied to fruit trees, particular to apple. We discuss state-of-the-art and future research to manipulate maturation and flower initiation in apple.

- A11 Hättasch et al. (2008) Isolation of flowering genes and seasonal changes in their transcript levels related to flower induction and initiation in apple (*Malus domestica*). Tree Physiology 28, 1459-1466

Isolation of flowering genes and their seasonal changes in transcript level related to flower induction and initiation in apple (*Malus domestica* BORKH.)

C. Hättasch¹, H. Flachowsky¹, D. Kapturska², M.-V. Hanke¹

¹ Julius Kuehn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden, Germany

² International Graduate School Zittau, Environmental Biotechnology, Markt 23, 02763 Zittau, Germany

Abstract

The flower development of apple (*Malus domestica* BORKH.) extends to two consecutive seasons. After flower induction most of the apical meristems change to reproductive growth during the first season and initiate flowers. After winter dormancy the flower development continues during the second season and ends with the anthesis in the spring. In order to determine the beginning of transition to reproductive growth on the molecular level and to identify genes, which are involved in this critical phase of flower development, we have examined the transcript level of the putative flowering genes *MdCOL1*, *MdCOL2*, *MdFT*, *MdSOC1*, *MdMADS2*, *MdMADS5*, *MdTFL1-1* and *MdTFL1-2* in vegetative terminal buds of the apple cultivar 'Pinova' during the first season using quantitative real-time PCR. The transcript level of these genes reached a peak at the time of blooming of the coexisting floral buds at the end of April. Then, the transcription was characterized by a strong increase, which started at May 22th for *AFL2* and *MdMADS2*, followed by *MdFT* and *AFL1* one week later. We suggest that the increased transcription at the end of May marks the beginning flower induction. The transcript level of *MdSOC1*, *MdTFL1-1* and *MdTFL1-2* increased at the end of June, suggesting that these genes are involved in flower initiation, which follows flower induction. On the contrary, *MdMADS5* transcription was too weak for quantification, and for the transcript levels of *MdCOL1* and *MdCOL2* no visible trend during the time of investigation was found.

A12 Flachowsky et al. (2010) Overexpression of *LEAFY* in apple leads to a columnar phenotype with shorter internodes. *Planta* 231, 251-263

Overexpression of *LEAFY* in apple leads to a columnar phenotype with shorter internodes

H. Flachowsky¹, C. Hättasch¹, M. Höfer¹, A. Peil¹, M.-V. Hanke¹

¹ Julius Kühn-Institute - Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Pillnitzer Platz 3a, D-01326 Dresden, Germany

Abstract

In order to break the juvenile stage of apple (*Malus x domestica* Borkh.) we transferred the *LFY* gene of *Arabidopsis* into the genome of the apple cv. 'Pinova'. A total of five transgenic clones constitutively overexpressing the *LFY* gene were obtained. Approximately twenty shoots of each clone were rooted and transferred to the glasshouse. No flowers were obtained on transgenic plants during the first two years of cultivation. Evaluation of the expression of possible *LFY* targets revealed that no transcripts could be detected for *MdAP1-1* and *MdAP1-2*. *MdTFL1* was unaffected. Based on the absence of the *LFY* core binding sequence within promoter sequences of *MdAP1-1* and *MdAP1-2* it was concluded that *LFY* is not able to induce these genes. The *LFY* genes of apple were unaffected in transgenic plants and sequence alignments of the C-terminal amino-acid sequence showed a high conservation of these proteins. A change in binding ability to DNA can therefore be excluded.

Instead of early flowering the transgenic plants showed an altered phenotype which is similar to the columnar phenotype of the "McIntosh Wijcik" mutant of apple. The transgenic plants showed shortened internodes and a significantly reduced length of the regrowing shoot. A negative correlation was observed between the length of the regrowing shoot and the *LFY* mRNA transcript level. Furthermore, the *LFY* transgenic apple plants showed an increased shoot diameter at node 20 which was positively correlated with the *LFY* mRNA transcript level. Based on our results we assume an alternative role of *LFY* in apple.

A13a Tränkner et al. (2010) Over-expression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232 (6), 1309-1324

Over-expression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants

C. Tränkner¹, S. Lehmann², H. Hönicka³, M.-V. Hanke⁴, M. Fladung³, D. Lenhardt³, F. Dunemann⁴, A. Gau², K. Schlangen⁵, M. Malnoy⁶, H. Flachowsky⁴

¹ Plant Breeding Institute, Christian-Albrechts-University of Kiel, Olshausenstr. 40, 24098 Kiel, Germany

² Leibnitz University Hannover, Institute of Botany, Herrenhaeuser Str. 2, 30419 Hannover, Germany

³ Johann Heinrich von Thünen-Institute, Federal Research Institute for Rural Areas, Forestry and Fisheries, Institute for Forest Genetics, Sieker Landstrasse 2, 22927 Grosshansdorf

⁴ Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden, Germany

⁵ Genome Analysis Platform, CIC bioGUNE, Technology Park of Bizkaia, Building. 502, 48160 Derio, Bizkaia, Spain

⁶ Structural and Functional Genomic, Foundation Edmund Mach, Via E. Mach 1, San Michele All Adige, (TN), 38010 Italy

Abstract

The protein encoded by the *FLOWERING LOCUS T (FT)* gene from *Arabidopsis thaliana* seems to be the long searched florigen, and over-expression of *FT* orthologs resulted in accelerated flower development in annual and perennial plants. In the present study, we isolated two allelic mRNA sequences of an *FT*-homologous gene from apple, which was designated as *MdFT1*. Using a SSR motif this gene was mapped on LG 12 of apple. Over-expression of *MdFT1* in *Arabidopsis* and the commercially important tree species poplar and apple itself using the CaMV 35S or the *Arabidopsis* Suc2 promoter resulted in significant accelerated flowering compared to wild-type plants. Transgenic T0 plants of *Arabidopsis* flowered four to six days on average earlier than wild-type *Arabidopsis* under LD conditions. Under SD conditions Suc2::*MdFT1* plants of the T1-generation flowered after 66 ± 18 days, while wild-type plants flowered about 22 days later. All transgenic *Arabidopsis* plants showed a normal habit except for the early flowering phenotype. Early flowering was detected six to ten months after transformation in transgenic polar clones containing *MdFT1* driven by the CaMV 35S, whereas plants of the transgenic apple clone T780 set up their first flowers during in vitro cultivation. Based on our results we conclude that *MdFT1* is responsible for inducing flowering and that the function of the apple *FT1* gene is conserved in

annual herbaceous species as well as perennial woody species. Furthermore, we discuss the role of *MdFT1* in flower development with regard to the findings of genetic studies on apple.

A13b Tränkner et al. (2011) Note added in proof to: Over-expression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 233, 217-218

Note added in proof to: Over-expression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants

C. Tränkner¹, S. Lehmann², H. Hönicka³, M.-V. Hanke⁴, M. Fladung³, D. Lenhardt³, F. Dunemann⁴, A. Gau², K. Schlangen⁵, M. Malnoy⁶, H. Flachowsky⁴

¹ Plant Breeding Institute, Christian-Albrechts-University of Kiel, Olshausenstr. 40, 24098 Kiel, Germany

² Leibnitz University Hannover, Institute of Botany, Herrenhaeuser Str. 2, 30419 Hannover, Germany

³ Johann Heinrich von Thünen-Institute, Federal Research Institute for Rural Areas, Forestry and Fisheries, Institute for Forest Genetics, Sieker Landstrasse 2, 22927 Grosshansdorf

⁴ Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden, Germany

⁵ Genome Analysis Platform, CIC bioGUNE, Technology Park of Bizkaia, Building. 502, 48160 Derio, Bizkaia, Spain

⁶ Structural and Functional Genomic, Foundation Edmund Mach, Via E. Mach 1, San Michele All Adige, (TN), 38010 Italy

In the study presented, we concluded on the basis of the data publicly available at the time of submission that the isolated *FT*-like mRNA sequences are alleles of one and the same *MdFT* gene. Based on this conclusion, we designated both sequences as alleles of *MdFT1* and used the sequence with strongest identity to *FT* of *Arabidopsis* for transformation. Based on the information published very recently by Kotoda et al. (2010), we learnt that the sequence (accession number HQ424012) used for transformation of *Arabidopsis*, apple and poplar in our study was *MdFT2* (linkage group 4) and not *MdFT1* (linkage group 12) as assumed. Based on the high level of sequence identity between both *MdFT* genes, the primers used for expression studies do not distinguish between *MdFT1* and *MdFT2*. Therefore, the expression pattern shown in Fig. S1 contains both mRNA sequences (*MdFT1* and *MdFT2*). Also Fig. 6 showing multiple sequence alignment of two segments of the fourth exon is corrected conveniently. Whether the two amino acid substitutions (A157S and A158V) present in *MdFT1* but not in *MdFT2* will have any effect on the phenotype of transgenic poplar cannot be stated at the moment. Further investigations are needed. Corrected Fig. 6 and legend are given below.

A14 Flachowsky et al. (2007) Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early flowering in apple (*Malus x domestica* Borkh.). Plant Breeding 126, 137-145

Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula pendula* Roth.) in apple (*Malus x domestica* Borkh.) induces early-flowering

H. Flachowsky¹, A. Peil¹, T. Sopanen², A. Elo², V. Hanke¹

¹ Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants, Institute for Fruit Breeding, Pillnitzer Platz 3a, D-01326 Dresden, Germany

² University of Joensuu, Department of Biology, P.O. Box 111, Fin-80101 Joensuu, Finland

Abstract

To shorten the juvenile stage of apple (*Malus x domestica* Borkh.) the *BpMADS4* gene from silver birch (*Betula pendula* Roth.) was constitutively overexpressed in 25 transgenic apple clones. All clones were characterized by PCR, RT-PCR and Real Time PCR. Solitary flowers were produced on *in vitro* shoots of eight transgenic clones. Most of these flowers appeared morphologically normal. Twenty shoots of each clone were rooted and transferred to the glasshouse. Glasshouse plants of clones T1165, T1187 and T1190 developed flowers. Several plants of T1165 and T1187 started floral initiation within three to four months after transfer to the glasshouse. Primary flowers were solitary in a terminal position at the main shoot. Lateral flower clusters consisting of three to five individual flowers, were also found. Pollen vitality and tube germination of glasshouse flowers were investigated, and there were no significant differences compared to pollen of non-transgenic control plants. Preliminary crosses using flowers of glasshouse plants resulted in small apple fruits. To our knowledge, this is the first report on *in vitro* flower induction in transgenic apple.

A15 Flachowsky et al. (2009) A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breeding* 128, 217-226

A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants

H. Flachowsky¹, M.-V. Hanke¹, A. Peil¹, S. H. Strauss², M. Fladung³

¹ Julius Kuehn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Pillnitzer Platz 3a, D-01326 Dresden, Germany

² Department of Forest Ecosystems and Society, Oregon State University, Corvallis, Oregon USA 97331-5752

³ Johann Heinrich von Thuenen-Institute, Federal Research Institute for Rural Areas, Forestry and Fisheries, Institute for Forest Genetics, Sieker Landstr. 2, D-22927 Grosshansdorf, Germany

Abstract

The long juvenile period of trees delays the breeding of new varieties. Flowering begins within five to ten years in most cultivated forest trees under intensive management, but can take up to 40 years in some species and environmental conditions. To accelerate the breeding process several agrotechnical and biotechnical methods have been developed. Knowledge about genes controlling flower initiation in model plants like *Arabidopsis thaliana*, and identification of homologous genes in trees, have led to new possibilities for early flower induction. Overexpression of MADS-box and other floral regulatory genes resulted in early flowering in some tree species and/or varieties. However, these methods have not yet been shown to enable the production of fertile, viable, or normal gametes and progeny; developmental research toward these ends is therefore of high priority. A breeding scheme has been developed to use early flowering trees for the introduction of genes from wild species that would allow several backcrosses to occur in only a few years, and to produce at the end a non-transgenic improved variety. Research to develop practical early flowering methods could lead to several new methods for breeding and biotechnology.

A16 Flachowsky et al. (2011) Applying a high-speed breeding technology to apple (*Malus × domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. *New Phytologist* 192, 364-377

Applying a high-speed breeding technology to apple (*Malus × domestica* Borkh.) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection

H. Flachowsky¹, P.-M. Le Roux^{2,3}, A. Peil¹, A. Patocchi², K. Richter⁴, M.-V. Hanke¹

¹ Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops Dresden, Germany

² Agroscope Changins Wädenswil ACW Research Station, Schloss, P. O. Box, 8820 Wädenswil, Switzerland

³ Plant Pathology, Institute of Integrative Biology, ETH Zurich, Universitaetstrasse 2, 8092 Zurich, Switzerland

⁴ Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance Quedlinburg, Germany

Abstract

Breeding of apple remains a slow process due to protracted generation cycles. Shortening the juvenile phase to achieve the introgression of traits from wild species into pre-breeding material within a reasonable time frame is a great challenge. In this study, we evaluated early flowering transgenic apple lines overexpressing the *BpMADS4* gene of silver birch on tree morphology in glasshouse conditions. Based on the results obtained, line T1190 was selected for further analysis and application to fast breeding. The DNA sequences flanking the T-DNA were isolated and the T-DNA integration site was mapped on the LG4. The inheritance and correctness of the T-DNA integration was confirmed after meiosis. A crossbred-breeding program was initiated by crossing T1190 with the fire blight resistant wild species *Malus fusca*. Transgenic early flowering F1 seedlings were selected and backcrossed with 'Regia' and 98/6-10 in order to introgress the apple scab *Rvi2*, *Rvi4* and powdery mildew *PI-1*, *PI-2* resistance genes and the fire blight resistance QTL FB-F7 present in 'Regia'. Three transgenic BC'1 seedlings pyramiding *Rvi2*, *Rvi4* and FB-F7, as well as three other BC'1 seedlings combining *PI-1* and *PI-2*, were identified. Thus, the first transgenic early flowering-based apple breeding program combined with marker-assisted selection was established.

A17 Le Roux et al. (2011) Use of a transgenic early flowering approach in apple (*Malus × domestica* Borkh.) to introgress fire blight resistance from 'Evereste'. *Molecular Breeding* 30, 857-874

Use of a transgenic early flowering approach in apple (*Malus × domestica* Borkh.) to introgress the major quantitative trait locus for fire blight resistance of the apple genotype 'Evereste'

P.-M. Le Roux^{1,2}, H. Flachowsky³, M.-V. Hanke³, C. Gessler², A. Patocchi¹

¹ Phytopathology, Plant Protection and Fruit and Vegetable Extension, Agroscope Changins-Wädenswil Research Station ACW, Schloss 1, CH-8820 Wädenswil, Switzerland

² Plant Pathology, Institute of Integrative Biology, ETH Zurich, Universitaetstrasse 2, CH-8092 Zurich, Switzerland

³ Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Pillnitzer Platz 3a, D-01326 Dresden, Germany

Abstract

The long juvenile phase of *Malus* spp. has always been a major drawback for the rapid introgression of agronomically relevant traits (e.g. disease resistances) from wild apples into domestic apple cultivars (*M. domestica* Borkh.). Several agrotechnical approaches have been investigated but none was able to reduce the juvenile phase to less than 18 months. Recently, an early flowering transgenic line named T1190 was obtained by over-expressing the *BpMADS4* gene from silver birch (*Betula pendula* Roth.) in the apple cultivar Pinova. In this study, we report on the acceleration of the first two introgression cycles (F1 and BC01) of the highly efficacious fire blight resistance locus Fb_E from the ornamental apple cultivar Evereste, using the *BpMADS4*-transgenic line T1190. A background selection based on simple sequence repeats (SSR) markers regularly distributed over the apple genome was applied to the 24 BC01 seedlings carrying the *BpMADS4* transgene and the Fb_E locus. Two early flowering BC01 seedlings estimated to carry less than 15% of the genome of Evereste were identified. They are currently (July 2011) being used in reciprocal crosses with the apple cultivar Royal Gala to continue the introgression of the Fb_E locus. Additionally, the strong phenotypic effect of the Fb_E locus from Evereste was confirmed by artificially inoculating a T1190 x Evereste F1 progeny with the causal agent of fire blight, *Erwinia amylovora*. Possible ways of enhancing the fast introgression of disease resistance genes in domestic apple using the transgenic line T1190 are discussed.

3 Zusammenfassende Diskussion

In der nachfolgenden Diskussion sollen die wichtigsten Ergebnisse der aufgeführten Originalarbeiten A1 bis A17 zusammenfassend dargestellt und im übergeordneten Kontext diskutiert werden. Auf eine detaillierte Diskussion einzelner Ergebnisse wird an dieser Stelle verzichtet. Diese Diskussion ist bereits in den aufgeführten Originalarbeiten erfolgt, auf die an dieser Stelle noch einmal verwiesen sei. Ebenso sind Hintergrund und Zielstellung, Material und Methoden sowie eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse den entsprechenden Originalarbeiten zu entnehmen.

3.1 Erhöhung der Krankheitsresistenz in Apfel durch transgene Ansätze

Der erste erfolgreiche Versuch zur Erzeugung transgener Apfelpflanzen erfolgte im Jahr 1989 (James et al. 1989). Seit dieser Zeit sind zahlreiche Arbeiten erschienen, die vielfach das Ziel hatten, verschiedene Methoden zur Transformation, Regeneration und Selektion an Apfel zu etablieren bzw. bereits etablierte Verfahren zu optimieren (Hanke und Flachowsky 2010). So wurden in den letzten mehr als 20 Jahren Transformationsprotokolle für über 24 verschiedene Apfelsorten, 12 Unterlagensorten und 3 *Malus*-Wildarten etabliert (Bulley et al. 2007, Dolgov und Hanke 2006, Szankowski et al. 2009). Eine Zusammenfassung all dieser Arbeiten ist bei Bulley et al. (2007), Gessler und Patocchi (2007) und Hanke und Flachowsky (2010) nachzulesen. Neben diesen rein methodischen Arbeiten wurden viele Versuche unternommen, Gene aus nicht-kreuzungskompatiblen Arten (z.B. Viren, Bakterien, Pilze, Pflanzen anderer Gattungen) in den Apfel zu transferieren. Mithilfe dieser Transgene sollten die transformierten Genotypen in ausgewählten Werteeigenschaften (z.B. Resistenz gegenüber wirtschaftlich bedeutenden biotischen Schaderregern) verbessert werden. Die im Rahmen dieser Arbeiten entstandenen Pflanzen lassen sich im Wesentlichen drei verschiedenen Generationen an gentechnisch veränderten (gv)-Pflanzen zuordnen.

Die Pflanzen der ersten Generation wurden mit einer Vielzahl an Genen transformiert, welche für antimikrobielle Proteine (AMP) kodieren. Bei diesen AMP handelt es sich um Proteine, welche in der Lage sind bakterielle Zellwände enzymatisch aufzulösen (z.B. Lysozym aus Hühnereiweiß oder dem

Bakteriophagen T4, Cecropin aus der Seidenraupe *Hyalophora cecropia*), die Biosynthese von Proteinen der äußeren Membran bakterieller Zellwände zu inhibieren (z.B. Attacin E aus *H. cecropia*) oder pilzliche Zellwände durch den Abbau von Chitin (z.B. Endo- bzw. Exochitinasen aus dem Pilz *Trichoderma harzianum* synonym *T. atroviride*) zu schädigen (zusammengefasst in Gessler und Patocchi 2007). Zusätzlich wurde versucht, die Expression der Transgene mit induzierbaren Promotoren zeitlich und räumlich zu begrenzen (Liu et al. 2001, Malnoy et al. 2006, 2007). Durch Fusion von Transgenen mit Translationsverstärkern bzw. Signalpeptiden für den Transport in den Apoplast konnte die Wirkung einzelner AMP noch erhöht werden (Norelli et al. 1999, Bolar et al. 2000, Ko et al. 2000). So konnten bereits bei den gv-Pflanzen der ersten Generation einige transgene Linien erzeugt werden, die eine partielle Resistenz im Gewächshaus und/oder im Freiland zeigten. Die Akzeptanz des Verbrauchers gegenüber gv-Pflanzen dieser Generation ist aber als sehr gering einzuschätzen. Die verwendeten Mechanismen sind unspezifisch und ein Effekt auf Nichtzielorganismen ist nicht auszuschließen. So ist z.B. zu erwarten, dass es durch eine konstitutive Expression der Chitinasen *ech42* und *Nag70* aus *T. harzianum* auch zu einer Schädigung von Mykorrhizen kommt, welche im Boden symbiontisch mit Apfelbäumen assoziiert sind (Bertschinger et al. 2000). Erste Ergebnisse, die diese Annahme zu bestätigen scheinen, wurden kürzlich von Schäfer et al. (2009) publiziert.

Strategien, die eher spezifisch sind, wurden bereits für die Erzeugung von gv-Pflanzen der zweiten Generation verwendet. Diese Pflanzen wurden mit Genen transformiert, welche die Pathogenität des Erregers beeinflussen, die Pflanze-Pathogen-Interaktion stören, ausgewählte Virulenzfaktoren des Erregers inhibieren oder die Pflanzenabwehr durch eine heterologe Expression von Effektorproteinen des Erregers bzw. Transkriptionsfaktoren aus anderen Pflanzenarten induzieren.

Zu den gv-Pflanzen der zweiten Generation gehören z.B. auch die Pflanzen, welche in den Originalarbeiten A1-A3, der hier vorliegenden Habilitationarbeit erzeugt wurden. Dabei wurde in Originalarbeit A1 versucht, die Resistenz gegenüber dem bakteriellen Feuerbrand durch eine konstitutive Expression der EPS-Depolymerase des Feuerbrandbakteriophagen phi-Ea1h zu erhöhen. Diese EPS-Depolymerase ist in der Lage an das kapsuläre Exo-Polysaccharid

Amylovoran des Feuerbranderregers zu binden und dieses zu degradieren. Das Exo-Polysaccharid Amylovoran ist einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *E. amylovora*. Es dient dem Bakterium zur Ernährung, zur Verbreitung und schützt es vor der pflanzlichen Pathogenabwehr. Bugert und Geider (1995) konnten zeigen, dass EPS defiziente Mutanten von *E. amylovora* nicht virulent sind. In Originalarbeit A1 konnte die Feuerbrandresistenz des Apfels durch eine konstitutive Expression der EPS-Depolymerase allerdings nur teilweise erhöht werden. Mögliche Ursachen und Lösungsansätze sind in der genannten Arbeit diskutiert. Ein praktischer Nutzen dieser Pflanzen ist schon aufgrund des geringen Effektes auf das Zielmerkmal nicht gegeben.

Eine wesentlich stärkere Resistenz gegenüber Feuerbrand und Apfelschorf konnte durch die konstitutive Expression des *Lc* (*Leaf color*) Gens aus Mais erzeugt werden (siehe Originalarbeiten A2 und A3). Das *Lc* Gen kodiert für einen basic-helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktor, welcher physikalisch mit einem R2R3-MYB Transkriptionsfaktor (in Apfel vermutlich mit *MdMYB10*) und einer Subgruppe von WDR (WD-Repeat) Proteinen interagiert, die in der Folge einen trimeren Proteinkomplex bilden. Dieser trimere Komplex reguliert u.a. die Bildung von Anthocyanen und Flavan-3-olen in Pflanzen (siehe Quattrocchio et al. 2006, zitiert bei Flachowsky et al. 2011). Die in Originalarbeit A2 erzeugten transgenen Apfelpflanzen zeigten eine deutlich erhöhte Anthocyankonzentration sowie erhöhte Gehalte an verschiedenen Flavan-3-olen (z.B. Catechinen und Pro-Anthocyanen). Aus phytopathologischen Vorarbeiten ist bekannt, dass vor allem die Flavan-3-ole zu einer Erhöhung der Resistenz gegenüber pilzlichen und bakteriellen Krankheiten führen können. In Apfel werden die Flavan-3-ole vielfach im Hinblick auf Resistenz gegenüber dem Apfelschorf, welcher von dem Pilz *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint. hervorgerufen wird, diskutiert (Römmelt et al. 1999, Bazzi et al. 2003, Leser und Treutter 2005). In Originalarbeit A3 konnte gezeigt werden, dass es in Folge der heterologen Überexpression des *Lc* Gens in Apfel zu einem deutlich geringeren Befall nach Inokulation mit Apfelschorf und Feuerbrand kommt. Darüber hinaus kommt es aber auch zu einer drastischen Verringerung der Vitalität sowie zu einer deutlichen Veränderung des Habitus der gv-Pflanzen, wodurch diese für einen züchterischen Ansatz eher unbrauchbar sind.

Wesentlich erfolgreichere Beispiele für gv-Pflanzen der zweiten Generation sind die Pflanzen, die z.B. mit dem *hrpN* Gen des Feuerbranderreger *E. amylovora* bzw. dem *DIPM* Gen aus *Malus x domestica* transformiert worden sind. Das *hrpN* Gen kodiert für ein Effektorprotein des Feuerbranderreger. Es gehört zu einem Cluster von Genen, welche die Induktion einer Hypersensitivitätsreaktion (HR) in Nicht-Wirtspflanzen und feuerbrandanfälligen Apfelgenotypen hervorrufen (Wei et al. 1992, Wei und Beer 1993, Barny 1995). Durch Überexpression von *hrpN* in Apfel wurde versucht, die Pflanzenabwehr zu induzieren, was bei einem Teil der erzeugten gv-Pflanzen sehr erfolgreich war (Abdul-Kader et al. 1999, Aldwinckle et al. 2003, Malnoy et al. 2006). Durch Stilllegung des *DIPM* Gens sollte die Wirt-Pathogen-Interaktion *Malus-Erwinia* Apfel gestört werden (Borejsza-Wysocka et al. 2004, 2006). Das *DIPM* Protein des Apfels hat eine zentrale Stellung in dieser Wirt-Pathogen-Interaktion, da es mit einem der wichtigsten Effektorproteine des Erregers, dem DspE Protein, interagiert. Die Stilllegung des *DIPM* Gens war ebenfalls für einen Teil der erzeugten gv-Pflanzen sehr erfolgreich (Borejsza-Wysocka et al. 2004, 2006). Insgesamt ist festzustellen, dass es bei den gv-Pflanzen der zweiten Generation vielfach gelungen ist, die Anfälligkeit gegenüber ausgewählten Schaderregern zum Teil sogar sehr deutlich zu verringern. Dennoch scheint eine Markteinführung der Pflanzen dieser Generation aufgrund einer fehlenden Akzeptanz beim Verbraucher sowie des Auftretens ungewollter Nebeneffekte umstritten.

Die gv-Pflanzen der dritten Generation wurden mit Genen transformiert, welche aus der natürlichen Abwehrkaskade des Kulturapfels bzw. nahe verwandter *Malus*-Wildarten stammen. Durch Überexpression bzw. Stilllegung solcher Gene in Apfel sollte versucht werden, die pflanzeigene Pathogenabwehr zu induzieren.

Zu den gv-Pflanzen der dritten Generation gehören auch die Pflanzen, welche in den Originalarbeiten A4-A6 der hier vorliegenden Habilitationsarbeit erzeugt worden sind. In diesen Arbeiten sollte überprüft werden, ob die Resistenz durch gezielte Veränderungen im Polyphenolstoffwechsel beeinflusst werden kann. In Originalarbeit A4 wurde versucht, durch Abregulierung des *MdANS* Gens in einem rotlaubigen Apfelgenotyp die Synthese von Anthocyanen zu blockieren. Dadurch kam es u.a. zu einer deutlichen Erhöhung der Gehalte an Catechin

und Epicatechin. Die Auswirkung der erhöhten Gehalte an diesen Flavan-3-olen auf die Resistenz der gv-Pflanzen konnte jedoch nicht geprüft werden, da die gv-Pflanzen nicht überlebensfähig waren.

In Originalarbeit A5 sollte durch die Stilllegung des Gens für die Flavanon-3-hydroxylase (FHT) versucht werden, die Konzentration an Flavanonen und 3-Deoxyflavonoiden zu erhöhen. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es durch Applikation von Prohexadion-Ca in behandelten Apfelblättern zur Synthese des sonst nicht in Apfel vorkommenden 3-Deoxyflavonoids Luteoforol kommt. Dieses 3-Deoxyflavonoid ist ein Intermediat, welches antimikrobiell gegenüber *E. amylovora* wirkt. Prohexadion-Ca hemmt verschiedene 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen. Zu diesen gehört auch die FHT. Die gezielte Bildung von Luteoforol durch ein gezieltes Silencing des Gens für die FHT wurde in der Literatur bereits mehrfach vorgeschlagen (zusammengefasst in Peil et al. 2009). Zwar konnte an den in Originalarbeit A5 erzeugten gv-Pflanzen eine Akkumulation von Flavanonen detektiert werden, zur Bildung des vermuteten 3-Deoxyflavonoids kam es jedoch nicht. Folglich konnten auch keine signifikanten Unterschiede im Resistenzverhalten zwischen Wildtyp- und gv-Pflanzen detektiert werden.

In Originalarbeit A6 sollte der Einfluss der Glykosyltransferase UGT71A15 auf die Resistenz des Apfels gegenüber dem Feuerbranderreger *E. amylovora* untersucht werden. Die Glykosyltransferase UGT71A15 glykosyliert das im Zytosol des Apfels vorkommende Dihydrochalkon Phloretin. Das dabei entstehende Phloridzin ist in der Vakuole lokalisiert. Phloridzin ist die in Apfelzellen vorherrschende phenolische Verbindung mit bis zu 18% der Trockensubstanz in den Blättern (Petkovsek et al. 2009). In intakten nicht-infizierten Pflanzenzellen führen die vom Phloretin abgeleiteten *o*-Chinone zu einer erhöhten Resistenz gegenüber verschiedenen Schaderregern. Eine Verringerung des Phloretingehaltes sollte zu einer Verringerung der Resistenz führen. In dem in Originalarbeit A6 beschriebenen Model sollte der Phloretingehalt in der feuerbrandresistenten Apfelwildart *Malus x robusta* (Carrière) Rehder var. *persicifolia* Rehder durch Überexpression der Glykosyltransferase UGT71A15 zugunsten von Phloridzin verschoben werden. Anschließend wurde getestet, inwiefern diese Verschiebung einen Einfluss auf die Feuerbrandresistenz hat. Die transgenen Pflanzen zeigten zwar wie

erwartet eine Erhöhung des molaren Verhältnisses zwischen Phloridzin und Phloretin, jedoch auch eine eher unerwartete Reduktion des absoluten Gehaltes an Dihydrochalkonen im Großteil der untersuchten Proben. Entgegen den Erwartungen war die Glykosylierungsaktivität in den gv-Pflanzen verringert. Das war sowohl mit Phloretin als auch mit Quercetin als Substrat der Fall. Ein Einfluss auf die Resistenz konnte an diesen gv-Pflanzen nicht detektiert werden.

In den angeführten Originalarbeiten A4, A5 und A6 konnten die angestrebten Veränderungen im Polyphenolstoffwechsel nur z.T. detektiert werden. Darüber hinaus waren die erzeugten gv-Pflanzen entweder nicht überlebensfähig (siehe Originalarbeit A4), oder es waren keine Veränderungen im Resistenzverhalten nachweisbar (siehe Originalarbeiten A5 und A6). Pflanzen, welche für einen züchterischen Ansatz von Nutzen sind, sind in keiner der drei aufgeführten Originalarbeiten entstanden. Dennoch konnten bei den gv-Pflanzen der dritten Generation vielfach transgene Linien erzeugt werden, die eine deutliche Verbesserung der Resistenz zeigten. Beispiele dafür sind u.a. das *MpNPR1* Gen aus *Malus x domestica* sowie das *mbr4* Gen aus *Malus baccata* (Malnoy et al. 2007, Flachowsky et al. 2008). Eines der erfolgreichsten Beispiele für die gv-Pflanzen der dritten Generation sind jedoch die Pflanzen, welche mit dem *Rvi6* (alte Nomenklatur: *HcrVf2*) Schorfresistenzgen aus dem Wildapfel *Malus floribunda* 821 transformiert wurden (Belfanti et al. 2004, Szankowski et al. 2009, Joshi et al. 2011). In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Resistenz gegenüber biotischen Schaderregern durch eine transgene Expression von arteigenen Resistenzgenen (R-Genen) zu induzieren. Die Ausprägung der Resistenz der gv-Pflanzen war dabei mit der Resistenz des Donors vergleichbar. Anhand solcher Beispiele konnte gezeigt werden, dass die Transgentechnologie, bei Vorhandensein entsprechender Gene (z.B. arteigener R-Gene), ein sehr schnelles und effektives Verfahren sein kann, welches den Zuchtprozess in der Obstzüchtung vereinfachen und deutlich beschleunigen könnte.

Nichtsdestotrotz hat diese Technologie mit drei wesentlichen Hindernissen zu kämpfen: (I) den Rechten am geistigen Eigentum, (II) den geltenden Verordnungen zur biologischen Sicherheit und (III) der mangelnden Akzeptanz von gv-Nahrungsmitteln beim Endverbraucher (Joshi et al. 2009). Gerade die

Patentierung von Genen und Verfahren zur Erzeugung von gv-Pflanzen sowie die Verwendung von Genen und Methoden, welche von Dritten patentiert wurden, können zu einer gefährlichen finanziellen Abhängigkeit gegenüber den Inhabern der Rechte am jeweiligen geistigen Eigentum führen (Graff und Zilberman 2001, zitiert bei Joshi et al. 2009). Zu immensen Kosten bei der Zulassung von GMO's führen vor allem die in der EU geltenden Verordnungen zur biologischen Sicherheit. Diese erfordern umfassende und kostenintensive Studien auf dem Gebiet der biologischen Begleitforschung. Folglich werden die Kosten für die Zulassung einer gv-Pflanze für die kommerzielle Vermarktung auf rund 5,5 Mio. € in den USA und rund 6,8 Mio. € in Europa geschätzt (Schenkelaars 2008, Kalaitzandonakes et al. 2007). Am schwersten wiegt jedoch die nach wie vor geringe Akzeptanz gegenüber transgenen Pflanzen beim Verbraucher. Das gilt nicht nur für den Apfel, sondern auch für alle anderen Obstgehölze. So gibt es mehr als 20 Jahre nach der ersten erfolgreichen Transformation von Obstgehölzen weltweit lediglich nur zwei Produkte, welche es bis zur Marktreife geschafft haben (Hanke und Flachowsky 2010). Bei dem ersten der beiden Produkte handelt es sich um die beiden transgenen Papaya-Sorten 'Rainbow' und 'SunUp'. Diese beiden Sorten, welche sich durch ein hohes Maß an Resistenz gegenüber dem *Papaya Ringspot Virus (PRSV)* auszeichnen, wurden in den späten 1980er Jahren erzeugt (Fitch et al. 1992 und 1993, Gonsalves 1998 und 2002, Lius et al. 1997) und 1998 dereguliert. Sie sind damit die ersten transgenen Obstgehölze, die erfolgreich kommerzialisiert wurden (Robischon 2006). Im Jahr 2007 wurden diese gv-Papayas in Hawaii bereits auf einer Fläche von ca. 2000 ha produziert. Im Jahr 2006 wurde eine weitere virusresistente gv-Papaya in China dereguliert. Mit einem Anbau von gv-Papaya ist künftig auch in verschiedenen Ländern Asiens zu rechnen.

Bei dem zweiten Produkt handelt es sich um die transgene Pflaumensorte 'Honey Sweet'. Diese Sorte ist resistent gegenüber dem *Plum Pox Virus (PPV)*. Die Resistenz von 'Honey Sweet' ist stabil und dauerhaft, was sich in zahlreichen Feldversuchen in unterschiedlichen Ländern gezeigt hat (Fuchs et al. 2007, Hily et al. 2004, Malinowski et al. 2006). Auch in Europa wurden Freilandversuche mit 'Honey Sweet' durchgeführt, zwei in Spanien, einer in Polen, einer in der Tschechischen Republik und einer in Rumänien (Flachowsky

und Hanke 2011). Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde 'Honey Sweet' im Jahr 2007 vom APHIS des USDA dereguliert (<http://www.isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm>).

In Europa ist in den nächsten Jahren nicht mit einer Zulassung von gv-Obst zu rechnen. Die europäischen Verbraucher scheinen nach wie vor sehr kritisch gegenüber Transgentechnologien eingestellt zu sein. Das zeigt sich u.a. in dem 2010 veröffentlichten „Eurobarometer 73.1 on the Life Sciences and Biotechnology“. Dieses Eurobarometer wurde als Teil des Forschungsprojektes „Sensitive Technologies and European Public Ethics (STEPE)“ im Rahmen des 7. Europäischen Forschungsrahmenprogrammes für Forschung und Technologieentwicklung aufgestellt (Gaskell et al. 2010). Im Rahmen dieser Studie wurde u.a. eine europaweite Umfrage zur Meinung der Bevölkerung zu den Risiken und dem Nutzen von gv-Äpfeln durchgeführt. Dabei zeigte es sich, dass lediglich 37% der Bevölkerung in den EU-27 Staaten transgene Äpfel als „sicher“ und „ungefährlich“ empfinden. Rund 55% der Menschen gehen davon aus, dass von solchen gv-Pflanzen keine Gefahr für die Umwelt ausgeht, 78% empfinden sie als unnatürlich und nur 33% unterstützen die Entwicklung und den Anbau solcher Bäume (Gaskell et al. 2010). Die Gründe für die nach wie vor bestehende Skepsis gegenüber transgenen Äpfeln in den EU-27 Staaten sind vor allem darin zu sehen, dass:

- viele der verwendeten Gene von außerhalb des natürlichen Genpools des Apfels stammen,
- die transferierten Genkonstrukte in der verwendeten Form in der Natur nicht vorkommen,
- die erzeugten gv-Pflanzen neben den übertragenen Zielgenen noch unerwünschte Markergene enthalten,
- bei einem Teil der erzeugten gv-Pflanzen kein klarer Vorteil für den Endverbraucher entsteht und
- es zu wenige Ergebnisse aus repräsentativen Studien zur Risiko- und Begleitforschung unter Freilandbedingungen gibt.

Besonders nachdenklich stimmt dabei der letzte der genannten Punkte. Obwohl in der Vergangenheit eine ganze Reihe von Anträgen zur gezielten Freisetzung von gv-Obstgehölzen in Europa gestellt wurde, blieb die Anzahl der tatsächlich

durchgeführten Feldversuche verschwindend gering (Hanke und Flachowsky 2010, Flachowsky und Hanke 2011). So wurden bis Mitte 2010 von insgesamt 9 Anträgen zur Freisetzung von gv-Äpfeln (vier in den Niederlanden, zwei in Belgien, zwei in Schweden und einer in Deutschland) lediglich zwei in Europa realisiert (Flachowsky und Hanke 2011). Alle anderen Anträge wurden entweder von den jeweiligen nationalen Behörden oder regionalen Ministern zurückgewiesen oder sie konnten nicht gestartet werden, da es nach wie vor an einer Entscheidung der zuständigen Behörde fehlte. In einer kürzlich publizierten Studie kommen Viswanath et al. (2011) zu der Ansicht, dass die Hürden zur Durchführung von Feldversuchen mit gv-Gehölzpflanzen weltweit künftig eher noch größer werden. Das scheint etwas verwunderlich vor dem Hintergrund, dass das Fehlen von Daten aus Freilandversuchen öffentlich bemängelt wird (Strauss et al. 2009). Darüber hinaus hat es in den letzten über 20 Jahren weltweit mehr als 700 Feldversuche mit gentechnisch veränderten Bäumen gegeben und in keinem dieser Versuche ist es zu einer ungewollten Freisetzung von gv-Pflanzen bzw. zu ökologischen Gefahren gekommen (Walter et al. 2010).

3.2 Etablierung alternativer Selektionsverfahren zur Erzeugung cisgener Pflanzen

Um die bestehende Skepsis gegenüber gv-Pflanzen zu verringern, wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Konzepte diskutiert. Bei einigen dieser Konzepte sollen zur Verbesserung der gewünschten pflanzlichen Merkmale nur arteigene DNA-Sequenzen bzw. DNA-Sequenzen aus sexuell kompatiblen Arten verwendet werden. Die aus solchen Konzepten resultierenden gv-Pflanzen unterteilt man je nach Art und Weise der Regulation der übertragenen Zielgene und deren strukturellem Aufbau in „intragene“ und „cisgene“ Pflanzen. Während bei den intragenen Pflanzen die kodierende Sequenz des Zielgens von regulatorischen Elementen (Promoter, Introns, Terminator) anderer Gene der gleichen Art bzw. von nahe verwandten Arten reguliert werden kann und die Anordnung/Orientierung der einzelnen Sequenzabschnitte keine Rolle spielt (Conner et al. 2007), enthält die cisgene Pflanze das Zielgen in seiner natürlich vorkommenden Form. Das Gen wird dabei von seinen eigenen regulatorischen

Elementen (Promoter, Introns, Terminator) reguliert. Diese müssen sich an der richtigen Position des Gens und in sense Orientierung befinden (Schouten et al. 2006a, 2006b).

Über den Erfolg solcher Konzepte bei einer künftigen Markteinführung von gv-Pflanzen kann bislang nur spekuliert werden. Die Meinungen verschiedenster Interessengemeinschaften gehen dabei sehr weit auseinander. Doch zumindest bei Apfel scheint das Cisgen-Konzept zu einer erhöhten Akzeptanz in der europäischen Bevölkerung zu führen. So empfinden laut Eurobarometer 53% der in den EU-27 Staaten befragten Menschen cisgene Äpfel als sicher und ungefährlich (Gaskell et al. 2010). Transgene Äpfel werden demgegenüber nur von 37% der Befragten als sicher empfunden. Insgesamt 63% der befragten EU-27 Bürger sehen in cisgenen Apfelpflanzen keine Gefahr für die Umwelt und 55% würden diese Technologie sogar unterstützen (Gaskell et al. 2010). Wie realistisch solche Umfragen sind, ist jedoch fraglich, da es zum Zeitpunkt der Befragung noch keine real existierenden cisgenen Apfelbäume gab und die Befragten ihre Meinung lediglich zu einem theoretischen Konzept geäußert haben. Aus diesem Grund war es auch ein Ziel der hier vorliegenden Habilitationsarbeit, erste cisgene Apfelbäume zu schaffen. Diese Bäume sollen dazu dienen, die Verbraucher mit einem real existierenden Produkt zu konfrontieren. Damit hätten diese erstmals die Möglichkeit, Vor- und Nachteile für Erzeuger, Vermarkter, Konsumenten, Umwelt usw. zu erkennen, mögliche Folgen abzuschätzen und sich eine auf Tatsachen beruhende Meinung über diese Technologie zu bilden.

Einer der zentralen Punkte der Cisgen-Technologie ist neben der Übertragung arteigener Gene, die Begrenzung der zu übertragenden Gensequenzen auf das funktionell notwendige Maß. Sequenzen, welche nicht für die Ausprägung des gewünschten Merkmals zwingend notwendig sind, sollen entweder gar nicht erst übertragen oder nach erfolgter Transformation wieder vom Genom der gv-Pflanzen eliminiert werden. Ein Beispiel für solche in gv-Pflanzen überflüssigen Gensequenzen sind die Markergene. Markergene sind Gene, die zur Erzeugung (Selektion) von gv-Pflanzen vielfach notwendig sind. Diese Gene vermitteln gv-Pflanzenzellen in der Regel einen Selektionsvorteil, wie beispielsweise eine Resistenz gegenüber Antibiotika (z.B. Kanamycin) oder Herbiziden (z.B. Basta). Aufgrund dieses Selektionsvorteils können nach

erfolgreicher Transformation gv-Zellen/Gewebe mithilfe selektierender Agenzien (z.B. Antibiotika, Herbizide) identifiziert und gezielt selektiert werden. Im Anschluss an diese Selektion werden Markergene jedoch nicht mehr benötigt. Aus diesem Grund ist es das Ziel, diese Markergene vom Genom der gv-Pflanze wieder zu eliminieren.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden in den letzten Jahren mehrere Methoden entwickelt, mit denen es möglich ist, markergenfreie gv-Pflanzen zu erzeugen. Das Spektrum dieser Methoden reicht dabei von verschiedenen Verfahren der Co-Transformation und der sequenzspezifischen Rekombination bis hin zur Transposon-basierten Markergenentfernung. Verfahren, die auf intrachromosomaler Rekombination basieren sowie Methoden zur Entfernung von Chloroplastenmarkergenen und zur markergenfreien Transformation wurden ebenfalls geprüft (Flachowsky et al. 2004, Malnoy et al. 2007, 2010, Darbani et al. 2007). Nicht jedes dieser Verfahren ist jedoch für alle Pflanzenarten gleichermaßen geeignet. Ein Beispiel dafür sind die Verfahren der Co-Transformation. Bei diesen Verfahren befinden sich Ziel- und Markergene auf (i) zwei T-DNA's in separaten *Agrobacterium*-Stämmen, welche gleichzeitig zur Transformation verwendet werden oder auf zwei Plasmiden, welche mithilfe biolistischer Methoden in ein und dasselbe Gewebe übertragen werden. Darüber hinaus ist es auch möglich (ii) zwei T-DNA's, die in unterschiedlichen Replikons organisiert sind, mit dem gleichen *Agrobacterium*-Stamm zu transformieren oder (iii) zwei T-DNA's, die im gleichen Replikon getrennt voneinander organisiert sind, mit dem gleichen *Agrobacterium*-Stamm zu übertragen (Darbani et al. 2007). Im Anschluss an die Transformation enthält ein Teil der produzierten gv-Pflanzen Ziel- und Markergene auf separaten Loci im Genom. Das Markergene kann dann im Anschluss an die Selektion durch sexuelle Auskreuzung wieder entfernt werden. Für den Apfel sind diese Verfahren jedoch ungeeignet. Zum einen wird der Apfel vegetativ vermehrt, um den Genotyp (i.d.R. am Markt etablierte Sorte) mit all seinen Werteeigenschaften identisch zu erhalten. Beim Auskreuzen des Markergens würde jedoch ein völlig neuer Genotyp entstehen, welcher zum Teil ganz andere Eigenschaften besitzt und nicht mehr der Ausgangssorte entspricht. Zum anderen hat der Apfel eine lange juvenile Phase, die zum Teil sieben bis acht Jahre und länger andauern kann (Hanke et al. 2007). In dieser Zeit ist der Baum nicht in der Lage, Blüten

zu bilden und eine Auskreuzung des Markergens ist erst im Anschluss an die juvenile Phase möglich. Damit wird der zeitliche Aufwand zur Erstellung markergenfreier gv-Apfelpflanzen sehr hoch und unrentabel.

Für mehrjährige Gehölzpflanzen, wie den Apfel, scheinen vor allem die Methoden zur sequenzspezifischen Rekombination geeignet zu sein. Solche Methoden wurden bereits erfolgreich an einer ganzen Reihe von Gehölzpflanzen wie der Pappel (Ebinuma et al. 2004, Zelasco et al. 2007, Fladung und Becker 2010, Fladung et al. 2010), der Aprikose (López-Noguera et al. 2009) und verschiedenen *Citrus* Arten (Ballester et al. 2007) etabliert. Für den wurde bereits im Jahr 2004 ein solches Verfahren vorgeschlagen (Krens et al. 2004). Dieses Verfahren basiert auf dem Cre/loxP System des Bakteriophagen P1, wobei das *nptII* Markergen, welches Pflanzenzellen eine Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt, entfernt wird. Nach erfolgter Selektion wird das *nptII* Gen durch eine chemisch induzierbare Expression der Cre Rekombinase aus dem Genom der gv-Pflanze wieder herausgeschnitten (Krens et al. 2004).

Mithilfe dieses Systems wurden kürzlich erste cisgene Apfelpflanzen der Sorte 'Gala' erzeugt (Originalarbeit A7). Die aus dieser Arbeit resultierenden Pflanzen tragen das *Rvi6* (alte Nomenklatur: *HcrVf2*) Schorfresistenzgen, welches aus dem Wildapfel *Malus floribunda* 821 über einen kartengestützten Ansatz kloniert und anschließend in transgenen Pflanzen auf Funktionalität geprüft worden war (Vinatzer et al. 2001, Barbieri et al. 2003, Belfanti et al. 2004, Szankowski et al. 2009, Joshi et al. 2011). Mit diesen Pflanzen wurden erstmals gv-Apfelpflanzen erzeugt, die vor allem Vorteile für die Obsterzeuger (Reduktion von Kosten und Arbeit), den Verbraucher (weniger Pflanzenschutzmittelrückstände in der Nahrung) und den Erhalt der Umwelt (Reduktion des Einsatzes von Fungiziden und den zur Ausbringung notwendigen Kraftstoff) bringen (Gessler 2011). Für diese cisgenen Pflanzen wurde in 2011 ein erster Freisetzungsversuch in der Nähe von Wageningen (Niederlanden) unter der Notifikationsnummer B/NL/10/05 beantragt. Im Rahmen dieses Feldversuches sollen die durch das *Rvi6* Gen hervorgerufene Schorfresistenz sowie weitere Baum- und Fruchtmerkmale über mehrere Jahre unter natürlichen Bedingungen getestet werden.

Da für das von Krens et al. (2004) publizierte Verfahren zur sequenzspezifischen Rekombination jedoch Patentanträge in verschiedenen Staaten laufen (US2004185567, EP1264891, WO02097102) und es in Neuseeland bereits patentiert ist (www.marker-free.wurl.nl/), wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ein zweites, frei verfügbares System erfolgreich an Apfel etabliert (Originalarbeit A8). Dieses System basiert auf dem Flp/FRT Rekombinasesystem aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Mit diesem System war es zwar möglich, markergenfreie Apfelpflanzen zu erstellen, für eine Anwendung im praktischen Zuchtprozess wäre eine Erhöhung der Effizienz jedoch wünschenswert.

Um die Effektivität dieses Systems zu erhöhen, wurde mit dem *dao1* (D-amino acid oxidase 1) Gen aus der Hefe *Rhodotorula gracilis* ein weiterer Selektionsmarker an Apfel etabliert (Originalarbeit A9). Das *dao1* Gen kodiert für eine D-Aminoessigsäureoxidase (Alonso et al. 1998), welche in der Lage ist die phytotoxischen D-Aminosäuren D-Serin und D-Alanin in nicht-toxische Produkte umzuwandeln. Darüber hinaus ist das *dao1* Gen fähig, die nicht-toxischen D-Aminosäuren D-Valin und D-Isoleucin in phytotoxische 2-Oxocarbonsäuren umzuwandeln (Erikson et al. 2004). Dieser Marker soll nun zusätzlich mit in die Box zwischen den beiden FRT Erkennungssequenzen für die FLP Rekombinase kloniert werden (vgl. Originalarbeiten A8 und A9). Durch Kultivierung von gv-Pflanzen nach erfolgter Rekombination aus Blattstücken auf Medium mit D-Isoleucin können künftig solche gv-Pflanzen sehr schnell und einfach selektiert werden, in denen die Rekombination in allen Zellen und Geweben erfolgreich war.

Mit diesem System sollen nun cisgene Apfelpflanzen verschiedener Apfelsorten erzeugt werden, welche Resistenzen gegenüber Apfelschorf, Apfelmehltau und Feuerbrand besitzen. Dafür wurden im Rahmen internationaler Arbeiten neben dem bereits erwähnten *Rvi6* Resistenzgen aus *M. floribunda* 821 weitere Resistenzgene bzw. Resistenzgenkandidaten isoliert. So isolierten beispielsweise Galli et al. (2010) den Locus für Schorfresistenz des Apfelgenotyps GMAL2473, an welchem sich das *Rvi15* Schorfresistenzgen (alte Nomenklatur: *Vr2*) befindet. An diesem Locus konnten drei Kandidatengene vom Typ TIR-NBS-LRR identifiziert werden. Arbeiten zur funktionellen Charakterisierung dieser Gene wurden bereits begonnen. Parravicini et al.

(2011) isolierten den Feuerbrandresistenzlokus aus dem Zierapfel 'Evereste'. Dieser Lokus beinhaltet insgesamt acht Kandidatengene von denen zwei Gene mithilfe einer *in silico*-Analyse als die wahrscheinlichsten Kandidaten identifiziert werden konnten. Diese beiden Gene zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu Genen aus dem *Pto/Prf* Resistenzgenkomplex von Tomate (Parravicini et al. 2011). Proof-of-concept Experimente mit diesen beiden Genen wurden bereits begonnen. Das *PI2* Mehlttauresistenzgen wurde in Neuseeland isoliert, funktionell charakterisiert und unter der US Patentnummer 20100306875 patentiert. Die wissenschaftlichen Ergebnisse dazu sind bislang jedoch noch nicht veröffentlicht. Im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen dem JKI in Dresden-Pillnitz und der ETH in Zürich (Schweiz) wurde kürzlich der von Peil et al. (2007) kartierte Feuerbrandresistenzlokus des Wildapfels *Malus x robusta* 5 kloniert. An diesem Lokus konnte ein Kandidatengen identifiziert werden, welches derzeit zur funktionellen Überprüfung in verschiedene Apfelgenotypen transformiert wurde.

So vielversprechend diese Arbeiten auch sind, es ist derzeit jedoch nicht abzusehen, ob diese Technologie jemals in den Markt eingeführt werden wird. Gründe dafür sind die bereits erwähnten immensen Kosten bei der Zulassung von GMO's (Schenkelaars 2008, Kalaitzandonakes et al. 2007) sowie die nach wie vor unklare Frage der gesetzlichen Einstufung dieser Pflanzen. Bislang ist nicht definiert, ob cisgene Pflanzen weiterhin als GMO deklariert werden müssen oder nicht. Um diese Frage zu klären, wurde im Jahr 2007 eine Arbeitsgruppe von der Europäischen Kommission gegründet, welche momentan verschiedene neue Techniken der Pflanzenzüchtung evaluiert und bewertet. Zu diesen Technologien gehören neben der Zinkfingernuklease-Technologie auch die Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese, die Erzeugung cisgener bzw. intragener Pflanzen, die RNA-abhängige DNA Methylierung, das Pfropfen auf gentechnisch veränderte Unterlagen, die Reverse Züchtung, die Agro-Infiltration und die Synthetische Genomik. Dabei soll geprüft werden, ob die aus der Anwendung dieser Techniken resultierenden Organismen unter die EU GMO Regulierungen fallen oder nicht. In diesem Zusammenhang wurde im Jahr 2010 von der Generaldirektion Umwelt (DG ENV) der Europäischen Kommission eine Studie mit dem Titel "New Plant Breeding Techniques: State-of-the-Art and Prospects for Commercial Development" in Auftrag gegeben (Lusser et al.

2011). Die Ergebnisse dieser Studie sollen vor allem der Generaldirektion Gesundheit und Verbraucher der Europäischen Kommission dienen, welche seit Februar 2010 verantwortlich für Gesetzgebung auf dem Gebiet der Biotechnologie (Direktive 2001/18/EC zur gezielten Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen in die Umwelt) ist. Im Ergebnis dieser Studie kommt die Arbeitsgruppe zu der Ansicht, dass es sich bei cisgenen Pflanzen und Pflanzen aus der klassischen Züchtung um sehr ähnliche Produkte handelt. Dabei geht die Arbeitsgruppe bei ihren Betrachtungen davon aus, dass cisgene Pflanzen keine Fremd-DNA Sequenzen (T-DNA Bordersequenzen, Erkennungssequenzen für Rekombinasen, Vektorsequenzen etc.) mehr enthalten. Sollten z.B. noch Bordersequenzen vom *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer enthalten sein, dann ist die erzeugte gv-Pflanze nach Ansicht der Arbeitsgruppe keine cisgene Pflanze und muss basierend auf der Direktive 2001/18/EC als GMO deklariert werden (Lusser et al. 2011)¹.

Desweiteren kommt die Arbeitsgruppe in Ihrem Bericht zu der Ansicht, dass mithilfe der klassischen Züchtung zwar Produkte erzeugt werden, welche den cisgenen Pflanzen sehr ähnlich sind, dass aber bei den cisgenen Pflanzen durch die zufällige Integration der Genkassette ins Genom ein individueller Charakter (Genotyp, Phänotyp) erzeugt wird. So kann es durch die Integration des Cisgens z.B. zum ungewollten Silencing endogener Gene, zum Unterbrechen von offenen Leserastern (ORF's), zur Schaffung neuer ORF's, zur Deletion von Wirts-DNA sowie zu Veränderungen im Expressionsniveau einzelner Gene kommen. Da viele dieser Ereignisse auch bei Anwendung klassischer Züchtungsverfahren (z.B. Mutationszüchtung) auftreten können, geht die Arbeitsgruppe davon aus, dass cisgene Pflanzen nicht per se „gefährlicher“ sind als Pflanzen, welche aus der klassischen Züchtung stammen (Lusser et al. 2011). Eine einzelfallspezifische Betrachtung wäre hier sicherlich sinnvoll.

Gerade beim Obst spielt die Auslese von Mutanten (Sports) schon immer eine große Rolle. So beschreibt Martin Schmidt bereits 1937 zahlreiche Sprossmutanten bei Kern- und Steinobst (Schmidt 1937). In dieser Arbeit zitiert

¹ Die im Rahmen dieser Habilitationsarbeit publizierten cisgenen Pflanzen (siehe Vanblaere et al. 2011) sind nach Interpretation der Definition cisgener Pflanzen der EU-Arbeitsgruppe nicht cisgen (vgl. Lusser et al. 2011). Sie würden deshalb unter die Direktive 2001/18/EC fallen und müssten als GMO deklariert werden.

Schmidt u.a. eine Publikation von Shamel und Pomeroy, in welcher von einer großen Anzahl an Sprossmutanten bei nordamerikanischen Apfelsorten berichtet wird. So waren den Autoren zu dieser Zeit bereits 254 Mutanten mit stärkerer Fruchtfärbung, 21 mit schwächerer Färbung, 5 mit gestreifter und 26 mit berosteter Frucht bekannt (Shamel und Pomeroy 1936). Die Autoren berichten allein von 57 Sprossmutanten mit dunkelroter Fruchtfarbe der Sorte 'Delicious', von 29 Mutanten der Sorte 'Winesap', von 21 Mutanten der Sorte 'Rome Beauty', von 17 Mutanten von 'Northern Spy', von 15 Mutanten von 'Oldenburg' (Duchess) und von 2 Mutanten von 'Mc Intosh'. Viele solcher Mutanten wurden im Laufe der Zeit als neue Sorten unter anderem Namen in den Markt eingeführt. So kennen wir heute zahlreiche Mutanten der Sorten 'Gala' (z.B. 'Galaxy', 'Royal Gala', 'Mitchgla Gala', 'Mondial Gala' und 'Gala Brookfield'), 'Braeburn' (z.B. 'Redfield', 'Hillwell', 'Mariri Red' und 'Helena'), 'Jonagold' (z.B. 'Jonagored', 'Rubinstar' und 'Red Jonaprince') und 'Pinova' (z.B. 'Evelina'), welche im Erwerbsobstbau eine tragende Rolle spielen.

Vielfach entstehen solche Mutanten durch die Integration von Retrotransposons. So sind beispielsweise die Apfelsorten 'Rae Ime', 'Spencer Seedless' und 'Wellington Bloomless' durch die Integration von Retrotransposons in das *PISTILLATA* Gen entstanden (Yao et al. 2001). Verschiedene Mutanten der Sorten 'Gala' und 'Braeburn' scheinen ebenfalls durch Positionsveränderung von Retroelementen im Apfelgenom entstanden zu sein (Venturi et al. 2006). Oftmals ist es bei Mutanten allein schon aufgrund des Phänotyps (z.B. veränderte Fruchtfarbe) offensichtlich, dass es durch Integration/Exzision von Retrotransposons zu Veränderungen in der Expression einzelner Gene gekommen ist. Dennoch empfindet niemand diese Sortenmutanten als „gefährlicher“ als ihre Ausgangssorten.

Auch bei anderen Obstarten haben Züchter Mutanten aufgrund ihres Phänotyps selektiert. Im Nachhinein hat es sich oftmals herausgestellt, dass bei diesen Mutanten Genfunktionen, z.B. in Folge von Deletionen, Insertionen, Leserastermutationen oder Integration bzw. Exzision von Retrotransposons, vollständig zerstört bzw. wieder restauriert worden waren. Beispiele dafür finden wir u.a. bei Birnen, beim Wein und bei verschiedenen *Prunus*-Arten (Sonneveld et al. 2004, Ushijima et al. 2004, Hauck et al. 2006, Walker et al. 2006, This et al. 2007, Azuma et al. 2009, Sanzol 2009). So entstand beispielsweise das

defekte Selbstinkompatibilitätsallel (S-allel) $S21^{\circ}$ der beiden Birnensorten 'Abugo' und 'Ceremeño' durch Integration eines Retrotransposons ins Intron sowie verschiedener Indels in den 3'UTR Bereich des intakten $S21$ S-Allels. Während Sorten mit intaktem $S21$ S-allel selbstinkompatibel sind und die $S21$ S-RNA'se im Griffel dieser Sorten exprimiert wird, sind Sorten mit $S21^{\circ}$ S-allel selbstkompatibel. Eine Aktivität der $S21^{\circ}$ S-RNA'se ist in den Griffeln dieser Sorten nicht nachweisbar (Sanzol 2009).

Kritisch sieht die Arbeitsgruppe vor allem den gezielten Nachweis cisgener Pflanzen. Dieser ist prinzipiell mit eventspezifischen Primern möglich. Dafür müssen aber Informationen über die Art der genetischen Modifikation (z.B. zur Transformation verwendete Sequenzen) vorhanden sein. Ohne jegliche Vorinformation ist ein Nachweis der genetischen Modifikation nicht in jedem Fall zweifelsfrei möglich. Künftig könnte ein solcher Nachweis durch Sequenzierung des kompletten Pflanzengenoms erfolgen. Zum heutigen Zeitpunkt sind die Verfahren der Genom- und Transkriptomsequenzierung jedoch noch nicht für diese Fragestellung validiert. Darüber hinaus sind die zu erwartenden Ergebnisse oft noch lückenhaft, was eine einwandfreie Beweisführung schwierig macht (Lusser et al. 2011).

Auf der Basis des Berichtes zur Studie "New Plant Breeding Techniques: State-of-the-Art and Prospects for Commercial Development" wird die Europäische Kommission nun einen Entscheidungsvorschlag erarbeiten. Dieser Vorschlag wird anschließend im ständigen EU-Ausschuss für Nahrungskette und Tiergesundheit diskutiert. Der Ausschuss nimmt den Vorschlag in der Folge an oder lehnt ihn ab und teilt seine Entscheidung dem Ministerrat der Minister für Landwirtschaft und Fischerei der EU-27 Mitgliedsstaaten mit. Dieser hat dann 90 Tage Zeit, eine eigene Entscheidung zu fällen, oder die Entscheidung des Ausschusses zu übernehmen. Eine solche Entscheidung des Ministerrates ist in den nächsten Monaten jedoch nicht zu erwarten. Bis dahin werden cisgene Pflanzen bei ihrer Regulierung transgenen Pflanzen gleichgestellt und fallen somit unter die EU GMO-Regulierung. Eine Markteinführung cisgener Apfelsorten ist daher mittelfristig nicht zu erwarten.

Ob das Bestreben im Hinblick auf eine Markteinführung cisgener Pflanzen bei Apfel in wenigen Jahren noch von Interesse sein wird, ist zudem sehr fraglich. Im Moment scheint es so, als ob die existierende Technologie zur Erzeugung

cisgener Pflanzen von den Methoden zum gezielten Austausch einzelner Allele (allele replacement) noch vor der Klärung aller Fragen in Bezug auf ihre Markteinführung abgelöst werden würden. Neuere Verfahren, die auf der Anwendung von Homologer Rekombination (Terada et al. 2007), auf Verwendung von Zinkfinger nukleasen (Townsend et al. 2009, Osakabe et al. 2010) oder TAL (transcription activator-like)-Effektoren (Cermak et al. 2011, Weber et al. 2011) beruhen, machen den Austausch von Allelen (funktionell gegen nicht-funktionell) an einem spezifischen Ort im Pflanzengenom möglich. Gerade für den Apfel sind diese Technologien von großem Interesse. So hat es sich gezeigt, dass in vielen Apfelsorten orthologe/paraloge Gene von bekannten Resistenzgenen vorhanden sind und diese sich an gleicher oder zumindest ähnlicher (Boudichevskaia et al. 2009, Dunemann und Egerer 2010) bzw. auch an einer anderen Stelle (Broggini et al. 2009) im Genom befinden können. Im Laufe der Evolution scheinen diese Gene ihre Funktion infolge einzelner Sequenzveränderungen (z.B. Mutation, Insertion, Deletion) geändert oder sogar verloren zu haben. Durch einen Austausch einzelner Nukleotide oder eines ganzen Allels könnte die Funktion solcher Gene wieder hergestellt bzw. deren Wirkung (z.B. Erhöhung des Rassenspektrums) erhöht werden. Die auf diese Weise entstehende Pflanze wäre der Ausgangspflanze nahezu identisch. Viele der bei den cisgenen Pflanzen kritisch diskutierten Punkte könnten mithilfe solcher Technologien komplett umgangen werden.

3.3 Funktionelle Charakterisierung von Genen zum Brechen der juvenilen Phase des Apfels und Aufbau eines Fastbreeding-Verfahrens

Zu den "New Plant Breeding Techniques" gehört auch die Fastbreeding-Technologie. Diese Technologie beruht auf der Idee, gv-Apfelbäume mit verkürzter juveniler Phase als Kreuzungselter zu verwenden. Dadurch sollen Kreuzungsprogramme zeitlich deutlich verkürzt werden. Da bei Apfel bislang noch recht wenig über die molekulargenetischen Mechanismen der Blütenbildung (einschließlich der Transition von der juvenilen zur adulten Phase) bekannt war, wurden entsprechende Kandidatengene anhand des existierenden Blütenmodells der Modelnpflanze *A. thaliana* identifiziert (Originalarbeit A10). Anschließend wurde die Expression der zu den

Kandidatengenom homologen Gene an Apfel im Verlauf der Blütenentwicklung studiert (Originalarbeit A11). Danach wurden ausgewählte Blütengene aus *A. thaliana* (Originalarbeit A12), dem Apfel (Originalarbeiten A13a und A13b) sowie der Birke (Originalarbeit A14) in transgenen Ansätzen an Apfel getestet. Dabei zeigte es sich, dass vor allem das *BpMADS4* Gen der Birke *Betula pendula* Roth. zu einer drastischen Reduktion der juvenilen Phase des Apfels führt (Originalarbeit A14). Mithilfe einer solchen *BpMADS4* transgenen Apfelinie (Linie T1190) wurde dann ein erstes Fastbreeding-Programm aufgebaut (Originalarbeiten A15, A16 und A17). Einzelne Pflanzen der Linie T1190 wurden im Rahmen dieser Arbeiten mit Resistenzdonoren für Feuerbrandresistenz gekreuzt. Aus den Nachkommenschaften dieser Kreuzungen wurden transgene resistente Sämlinge selektiert und für weitere Kreuzungen verwendet. Dabei sollten entweder weitere Resistenzen (z.B. gegenüber Apfelschorf bzw. Apfelmehltau) eingekreuzt werden (Originalarbeit A16) oder es wurde mithilfe einer wiederholten Verdrängungskreuzung das Ziel verfolgt, den Anteil der von der Apfelwildart stammenden ungewollten Merkmale zu reduzieren (Originalarbeit A17).

Für die Selektion der „besten“ Sämlinge einer solchen Population wurden neben den klassischen Resistenztests auch molekulare Marker verwendet. Dabei wurden sowohl solche Marker verwendet, die direkt mit dem Resistenzgen gekoppelt sind, als auch solche, die über das gesamte Apfelgenom verteilt sind. Während erstere dazu dienen, resistente Nachkommen zu identifizieren, dienen letztere dem Zweck, in höheren Kreuzungsgenerationen diejenigen Sämlinge zu identifizieren, die noch den geringsten Anteil des Wildartengenoms besitzen. Nach fünf bis sieben Kreuzungsgenerationen werden dann resistente, nicht-transgene Sämlinge selektiert und als Ausgangsmaterial in ein klassisches Züchtungsprogramm integriert. Eine direkte Selektion von Sortenkandidaten erscheint im Verlauf eines solchen Züchtungsprogrammes eher schwierig, da durch die dann noch notwendige Auskreuzung des *BpMADS4* Gens wieder völlig neue Genotypen entstehen würden. Diese Schwierigkeiten können künftig durch die Anwendung von Verfahren:

- zum Virus induzierten Gen Silencing (VIGS) von Blührepressorgenen,
- zur Virus induzierten Überexpression von Blütengenomen oder

- zur transienten Expression von blüteninduzierenden Genen umgangen werden.

Durch eine Veredlung von Sämlingen auf transgene Unterlagen, welche blüteninduzierende Signale ins Edelreis transportieren, könnten diese Probleme voraussichtlich auch umgangen werden. Bei der Anwendung solcher Verfahren wären alle entstehenden Sämlinge nicht-transgen. Eine Selektion von Sortenkandidaten könnte damit in jeder Kreuzungsgeneration problemlos durchgeführt werden. Erste auf Virusvektoren basierende Verfahren zur Reduktion der juvenilen Phase des Apfels wurden kürzlich publiziert (Sasaki et al. 2011, Yamagishi et al. 2011).

Das elegante an der hier dargestellten Fastbreeding-Technologie ist die Tatsache, dass mit ihrer Hilfe Kreuzungsprogramme um Jahrzehnte verkürzt werden können. Darüber hinaus entstehen am Ende des Kreuzungsprogramms nicht-transgene Pflanzen, welche mit den Pflanzen aus der klassischen Kreuzungszüchtung aus heutiger Sicht absolut vergleichbar sind. Dennoch ist der gesetzliche Status, unter den diese Pflanzen fallen, bislang unklar. Deshalb müssen diese nicht-transgenen Pflanzen nachwievor wie GMO's behandelt werden. Die dazu geltende Regelung auf europäischer Ebene ist die EU Direktive 2001/18/EC. Diese Direktive sieht für GMO's folgende Definition vor: „Ein genetisch veränderter Organismus (GMO) ist ein Organismus, bei dem das genetische Material in einer Art und Weise verändert wurde, welche nicht natürlicherweise durch Befruchtung und/oder natürliche Rekombination vorkommt“. Da die bei der Fastbreeding-Technologie entstehenden nicht-transgenen Sämlinge keine DNA-Sequenzen von außerhalb des Genpools mehr enthalten und alle Neukombinationen von Genen der zur Kreuzung verwendeten Eltern auch in einem klassischen Kreuzungsprogramm entstehen könnten, könnte man annehmen, dass diese Pflanzen nicht mehr als GMO deklariert werden müssen. Dem spricht allerdings entgegen, dass zur Herstellung dieser Pflanzen gentechnische Verfahren angewandt wurden. Die Anwendung dieser Verfahren lässt sich aber am Endprodukt mit den heute zur Verfügung stehenden Verfahren nicht mehr nachweisen.

Um diese rechtlich schwierige Frage zu klären, wurde kürzlich eine Feststellungsanfrage an das für solche Fragen zuständige Bundesamt für

Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit gestellt. Weiterhin ist unklar, wie der Nachweis des nicht-transgenen Status zu erfolgen hat (z.B. Southern Blot oder Genomsequenzierung).

Solange die rechtliche Frage zur Kennzeichnung von Pflanzen aus einem Fastbreeding-Programm unklar ist, bleibt es fraglich, ob diese Technologie jemals Anwendung in der praktischen Obstzüchtung in Europa finden wird. Sollten die nicht-transgenen Sämlinge künftig unter die geltenden GMO Regulierungen fallen, ist mit ähnlich hohen Kosten bei der Zulassung neuer Sorten zu rechnen, wie das bei trans-, intra- und cisgenen Pflanzen der Fall ist. Darüber hinaus müssten alle Arbeiten in Gewächshausanlagen der Sicherheitsstufe 1 des Gentechnikgesetzes erfolgen. Das würde dann auch für die nicht-transgenen Pflanzen in nachfolgenden Generationen gelten, die aus einem solchen Züchtungsprogramm stammen. Damit wären alle künftigen Arbeiten auf diesem Gebiet räumlich sehr stark begrenzt, wodurch die Effizienz dieser Technologie sehr stark eingeschränkt werden würde.

Trotz der rechtlich unklaren Situation werden international große Anstrengungen unternommen, diese Technologie für die Züchtung von verschiedenen Obstarten zu etablieren. So wird die Fastbreeding-Technologie mittlerweile auch an der Appalachian Fruit Research Station des Agricultural Research Service (ARS) des United States Department of Agriculture (USDA) in Kearneysville (USA) zur Beschleunigung der Kreuzungszüchtung bei Apfel und Pflaume angewandt (Kean 2010, Lehnert 2011). Eine transgene Pflaume, welche das *PtFT1* Blütengen aus *Populus trichocarpa* exprimiert, sowie die Idee der Verwendung dieser Linie in einem Fastbreeding-Programm wurde in den USA in 2011 unter der Applikationsnummer 20110067147 zum Patent angemeldet. Am Agroscope in Wädenswil (Schweiz) wird dieses Verfahren zur Introgression von Resistenzgenen aus Wild- und Zierapfelakzessionen in den Kulturapfel benutzt (Originalarbeit A17). Ähnliche Arbeiten wurden kürzlich auch an der Schwedischen Universität für Landwirtschaftswissenschaften in Uppsala unter dem Projekttitel „Development of a new strategy for apple breeding using early flowering genes“ (Kontakt ID: 2007-821) begonnen (www.sciencenet.se/). Am Volcani Center in Bet Dagan (Israel) sollen mit Hilfe eines Fastbreeding-Programms feuerbrandresistente Birnen gezüchtet werden (M. Flaishman, persönliche Mitteilung). Eine erste transgene Birnen mit verkürzter

Jugendphase sowie die Ergebnisse aus ersten Kreuzungsversuchen wurden kürzlich publiziert (Matsuda et al. 2009, Freiman et al. 2011). In Deutschland erfolgt die Weiterführung der Arbeiten zum Ausbau und zur Optimierung der Fastbreeding-Technologie an Apfel derzeit im Rahmen des von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) geförderten Forschungsprojektes „Speedbreed“ (Förderkennzeichen: 2814500610) sowie in dem von der EU geförderten Forschungsprojekt „Fruitbreedomics“. Neben dem Apfel soll das Verfahren im Rahmen des „Speedbreed“-Projektes auch an der Pappel etabliert werden.

4 Zusammenfassung (in Deutsch und Englisch)

Die Züchtung von mehrjährigen Obstgehölzen wie dem Apfel *Malus x domestica* Borkh. ist aufgrund der langen juvenilen Phase, welche Apfelsämlinge durchlaufen müssen, sehr zeitaufwendig. Während dieser Phase sind Apfelpflanzen nicht in der Lage, Blüten und Früchte zu bilden, was eine Bewertung von Nachkommenschaften unmöglich macht und weitere Kreuzungsschritte verhindert. Die bestehende Selbstinkompatibilität und der hohe Anteil an Heterozygotie sind ebenfalls Faktoren, welche eine Introgression von einzelnen Genen/Merkmalen in einen bestehenden genetischen Hintergrund verhindert. Komplexe Züchtungsprogramme, welche aus mehreren Pseudo-Rückkreuzungsgenerationen bestehen, sind deshalb notwendig, um Gene/Merkmale aus Apfelwildarten in den Kulturapfel einzukreuzen und den Großteil der ungewollten Merkmale der Apfelwildart wieder zu verdrängen. Ein solches Züchtungsprogramm dauert in der Regel mehrere Jahrzehnte. Gentechnische Verfahren könnten diesen Prozess enorm beschleunigen.

In den letzten 20 Jahren wurden zahlreiche Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber biotischen Schaderregern (z.B. Apfelschorf, Apfelmehltau und Feuerbrand) an Apfel getestet. Die daraus resultierenden Pflanzen lassen sich in drei verschiedene Generationen von gv-Pflanzen einteilen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Verfahren zur Erzeugung von transgenen Pflanzen der zweiten und dritten Generation von gv-Pflanzen evaluiert. Die aus diesen Arbeiten resultierenden Pflanzen sind für die praktische Züchtung aus verschiedenen

Gründen jedoch nicht nutzbar. In der Zusammenfassung aller dieser Studien kann jedoch gesagt werden, dass es für alle drei Generationen an gv-Pflanzen möglich war, Pflanzen mit erhöhter Resistenz zu erzeugen. Eine Markteinführung dieser Pflanzen erscheint jedoch aufgrund der existierenden EU GMO Regulierungen und der fehlenden Akzeptanz bei den Verbrauchern nicht realistisch.

Wesentlich realistischer erscheint eine Markteinführung von cisgenen Pflanzen. Diese Pflanzen enthalten nur Gene/DNA-Sequenzen aus dem Apfel bzw. aus nahe verwandten kreuzungskompatiblen Arten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste cisgene Apfelpflanzen erzeugt, welche das *Rvi6* (früher *HcrVf2*) Schorfresistenzgen aus *Malus floribunda* 821 enthalten. Mit diesen Pflanzen wird nun ein erster Freilandversuch in den Niederlanden durchgeführt. In diesem Versuch soll die Schorfresistenz der cisgenen Pflanzen unter natürlichen Bedingungen getestet werden. Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit ein alternatives System zur Erzeugung markergenfreier gv-Pflanzen an Apfel etabliert. Dieses System soll künftig benutzt werden, um cisgene Apfelpflanzen verschiedener Apfelsorten mit erhöhter Resistenz gegenüber Apfelschorf, Apfelmehltau und Feuerbrand zu erzeugen. Die Isolierung entsprechender Resistenzgene erfolgt derzeit im Rahmen verschiedener internationaler Projekte.

Im dritten Teil der Arbeit wurde ein Fastbreeding-Programm an Apfel etabliert. In diesem Fastbreeding-Programm wurden transgene Apfelpflanzen mit verkürzter Jugendphase erzeugt. Diese Pflanzen wurden anschließend als Kreuzungselter benutzt und mit resistenten Apfelwildarten gekreuzt, um Resistenzgene aus den Apfelwildarten in den Kulturapfel zu übertragen. Aus den Nachkommenschaften dieser Kreuzungen wurden resistente transgene Sämlinge mit verkürzter Jugendphase selektiert. Diese Sämlinge wurden anschließend für Pseudo-Rückkreuzungen benutzt, um (i) möglichst viele der ungewollten Eigenschaften, die von der Apfelwildart stammen, wieder zu verdrängen oder (ii) weitere Resistenzgene aus anderen Apfelwildarten oder resistenten Kulturapfelgenotypen einzukreuzen. Am Ende des Züchtungsprogramms sollen nicht-transgene resistente Sämlinge selektiert und in existierende Züchtungsarbeiten im Rahmen der klassischen Kreuzungszüchtung integriert werden. Die Nutzung von transgenen Pflanzen

mit verkürzter Jugendphase stellt somit eine effektive Möglichkeit dar, um aufwendige Züchtungsprogramme in der Obstzüchtung in einem zeitlich überschaubaren Rahmen realisieren zu können. Ob die aus einem solchen Programm resultierenden nicht-transgenen Sämlinge allerdings als GMO's deklariert werden müssen, ist derzeit noch nicht geklärt.

Summary

Breeding of perennial fruit trees such as apple *Malus × domestica* Borkh. is time consuming because of the long lasting juvenility stage of apple seedlings. During the juvenile stage apple seedlings are unable to produce flowers and fruits. Therefore, full evaluations of a progeny as well as further crosses are possible at earliest unless all plants of the progeny have completed their juvenile stage. The self-incompatibility and the high degree of heterozygosity are additional factors which prevent the introgression of individual genes/traits into an existing genetic background. Complex breeding programs consisting of several pseudo-backcross generations are needed for introducing genes/traits from apple wild species into the cultivated apple and removing most of the linkage drag of the wild apple. Such a breeding program takes normally several decades. Genetic engineering could fasten this process considerably.

During the last 20 years a number of approaches have been tested on apple to produce transgenic plants with improved resistance to biotic factors (e.g. apple scab, powdery mildew and fire blight). The resulting transgenic plants can be divided into three generations of gm-plants. In the present study different approaches were tested to develop gm-apple plants of the second and third gm-plant generation. Due to several reasons none of the resulting plants was really usable for practical breeding. In summary of all these studies, it was possible to produce transgenic plants with improved resistance to pathogens in each gm-plant generation. The introduction of these plants into the market seems not to be realistic because of the existing EU GMO regulations and the general lack of consumer acceptance.

The introduction of cisgenic plants into the market seems to be more realistic. Cisgenic plants carry only native genes/DNA-sequences of apple or other closely related cross-compatible species. In the present study first cisgenic

apple plants which contain the *Rvi6* (formerly *HcrVf2*) scab resistance gene of *Malus floribunda* 821 were developed. A first field trial using these plants is currently performed in the Netherlands. The field trial is focused on the evaluation of scab resistance in cisgenic plants under natural field conditions. Furthermore, an alternative system for producing marker-free gm-plants was established on apple. This system could be used in the future to produce cisgenic apple plants of different existing cultivars with improved resistance to apple scab, powdery mildew and fire blight. The isolation of respective resistance genes is currently in progress in the frame of different international research projects.

The third part of the present study was aimed on the establishment of a Fastbreeding approach in apple. In this Fastbreeding approach transgenic apple plants with a reduced juvenile stage were produced. Subsequently, these plants were used as crossbred parents and crossed with resistant apple wild species to introduce individual resistance genes from the wild to the cultivated apple. The resulting progenies of these crosses were screened and transgenic resistant apple seedlings with reduced juvenility were selected. These seedlings were used for pseudo-backcrosses to (i) remove the unwanted linkage drag originating from the wild apple species, or (ii) to introduce additional resistance genes from other wild or cultivated apple genotypes. In the final step of the Fastbreeding program non-transgenic resistant seedlings will be selected and introduced into various international classical apple breeding programs. The utilization of transgenic early flowering plants represents a powerful tool to realize complex fruit tree breeding programs in a manageable amount of time. If non-transgenic seedlings of the described Fastbreeding approach have to be labeled as GMO or not, is still the remaining question.

5 Literaturverzeichnis

- Abdul-Kader AM, Norelli JL, Aldwinckle HS, Bauer DW, Beer SV (1999) Evaluation of the *hrpN* gene for increasing resistance to fire blight in transgenic apple. *Acta Horticulturae* 489, 247-250
- Aldwinckle HS, Borejsza-Wysocka EE, Malnoy M, Brown SK, Norelli JL, Beer SV, Meng X, He SY, Jin Q-L (2003) Development of fire blight resistant apple cultivars by genetic engineering. *Acta Horticulturae* 622, 105-111
- Alonso J, Barredo JL, Diez B, Mellado E, Salto F, Garcia JL, Cortes E (1998) D-Amino-acid oxidase gene from *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*) ATCC 26217. *Microbiology* 144, 1095-1101
- Azuma A, Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Shiraishi M, Mitani N, Yakushiji H, Koshita Y (2009) Color recovery in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) 'Benitaka', a bud sport of 'Italia', is caused by a novel allele at the *VvmybA1* locus. *Plant Science* 176, 470-478
- Ballester A, Cervera M, Pena L (2007) Efficient production of transgenic Citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of the marker gene by site-specific recombination. *Plant Cell Reports* 26, 39-45
- Barbieri M, Belfanti E, Tartarini S, Vinatzer BA, Sansavini S, Silfverberg-Dilworth E, Gianfranceschi L, Hermann D, Patocchi A, Gessler C (2003) Progress of map-based cloning of the *Vf*-resistance gene and functional verification: preliminary results from expression studies in transformed apple. *Hortscience* 38, 329-331
- Barny MA (1995) *Erwinia amylovora hrpN* mutants, blocked in harpin synthesis, express a virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reaction on tobacco. *European Journal of Plant Pathology* 101, 333-340
- Bazzi C, Messina C, Tortoreto L, Stefani E, Bini F, Brunelli A, Andreotti C, Sabatini E, Spinelli F, Costa G, Hauptmann S, Stammler G, Doerr S, Marr J, Rademacher W (2003) Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with prohexadione-Ca. *European Journal of Horticultural Science* 68, 108-114
- Belfanti E, Silfverberg-Dilworth E, Tartarini S, Patocchi A, Barbieri M, Zhu J, Vinatzer BA, Gianfranceschi L, Gessler C, Sansavini S (2004) The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 886-890
- Bertschinger L, Kellerhals M, Theiler R, Frey J, Gafner J, Gessler C (2000) Gentechnik auch beim Apfel? Der wissenschaftliche Stand der Dinge *Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau* 15, 363-367

- Block G, Patterson B, Subar A (1992) Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological literature. *Nutrition and Cancer* 18, 1-29
- Bolar JP, Norelli JL, Wong KW, Hayes CK, Harman GE, Aldwinckle HS (2000) Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigour. *Phytopathology* 90, 72-77
- Borejsza-Wysocka EE, Malnoy M, Meng X, Bonasera JM, Nissinen RM, Kim JF, Beer SV, Aldwinckle HS (2004) Silencing of apple proteins that interact with DspE, a pathogenicity effector from *Erwinia amylovora*, as a strategy to increase resistance to fire blight. *Acta Horticulturae* 663, 469-474
- Borejsza-Wysocka EE, Malnoy M, Meng X, Bonasera JM, Nissinen RM, Kim JF, Beer SV, Aldwinckle HS (2006) The fire blight resistance of apple clones in which DspE-interacting proteins are silenced. *Acta Horticulturae* 704, 509-513
- Boudichevskaia A, Flachowsky H, Dunemann F (2009) Identification and molecular analysis of candidate genes homologous to *HcrVf* genes for scab resistance in apple. *Plant Breeding* 128, 84-91
- Bowen JK, Mesarich CH, Bus VGM, Beresford RM, Plummer KM, Templeton MD (2011) *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab. *Molecular Plant Pathology* 12, 105-122
- Broggini GAL, Galli P, Parravicini G, Gianfranceschi L, Gessler C, Patocchi A (2009) *HcrVf* paralogs are present on linkage groups 1 and 6 of *Malus*. *Genome* 52, 129-138
- Bugert P, Geider K (1995) Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Molecular Microbiology* 15, 917-933
- Bulley SM, Malnoy M, Atkinson RG, Aldwinckle HS (2007) Transformed apples: traits of significance to growers and consumers. *Transgenic Plant Journal* 1, 267-279
- Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, doi:10.1093/nar/gkr218
- Conner AJ, Barrell PJ, Baldwin SJ, Lokerse AS, Cooper PA, Erasmuson AK, Nap J-P, Jacobs JME (2007) Intragenic vectors for gene transfer without foreign DNA. *Euphytica* 154, 341-353

- Darbani B, Eimanifar A, Stewart Jr CN, Camargo WN (2007) Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnology Journal* 2, 83-90
- Dolgov SV, Hanke M-V (2006) Transgenic temperate fruit tree rootstocks. In: Fladung M, Ewald E (eds) *Tree transgenesis recent developments*. Springer, Heidelberg, pp 335-350
- Dunemann F, Egerer J (2010) A major resistance gene from Russian apple 'Antonovka' conferring field immunity against apple scab is closely linked to the *Vf* locus. *Tree Genetics & Genomes* 6, 627-633
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Yamada-Watanabe K (2004) Asexual production of marker-free transgenic aspen using MAT vector systems, in: Kumar S, Fladung M (Eds.), *Molecular genetics and breeding of forest trees*. The Haworth Press, New York, USA: pp. 309-338
- Erikson O, Hertzberg M, Näsholm T (2004) A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nature Biotechnology* 22, 455-458
- Ferro-Luzzi A, Cialfa E, Leclercq C, Toti E (1994) The mediterranean diet revisited: focus on fruit and vegetables. *International Journal of Food Science and Nutrition* 45, 291-300
- Fitch M, Manshardt R, Gonsalves D, Slightom JL (1993) Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Reports* 12, 245-249
- Fitch M, Manshardt R, Gonsalves D, Slightom JL, Sanford JC (1992) Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of *Papaya ringspot virus*. *Biotechnology* 10, 1466-1472
- Flachowsky H, Birk T, Hanke V (2004) Preliminary results to establish an alternative selection system for apple transformation. *Acta Horticulturae* 663, 425-430
- Flachowsky H, Halbwirth H, Treutter D, Richter K, Hanke M-V, Szankowski I, Gosch C, Stich K, Fischer TC (2011) Silencing of flavanone-3-hydroxylase in apple (*Malus x domestica*) leads to accumulation of flavanones, but not to reduced fire blight susceptibility. *Plant Physiology and Biochemistry* 51, 18-25
- Flachowsky H, Hanke M-V (2011) Transgenic Horticultural Crops in Europe. In: Mou B, Scorza R (eds) *Transgenic Horticultural Crops: Challenges and Opportunities*. CRC Press – Taylor and Francis, LLC, Florida, USA, 125-145

- Flachowsky H, Hanke M-V, Peil A, Strauss SH, Fladung M (2009) A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breeding* 128, 217-226
- Flachowsky H, Hättasch C, Höfer M, Peil A, Hanke M-V (2010) Overexpression of *LEAFY* in apple leads to a columnar phenotype with shorter internodes. *Planta* 231, 251-263
- Flachowsky H, Höfer M, Hanke M-V (2011) Strawberry. In: Flachowsky H, Hanke V-M (Eds) *Methods in Temperate Fruit Breeding. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 5, 8-26
- Flachowsky H, Le Roux P-M, Peil A, Patocchi A, Richter K, Hanke M-V (2011) Applying a high-speed breeding technology to apple (*Malus x domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. *New Phytologist* 192, 364-377
- Flachowsky H, Peil A, Rollins J, Hanke M-V, Richter K, Lee D-H (2008) Improved fire blight resistance in transgenic apple lines by constitutive overexpression of the *MbR4* gene of *Malus baccata*. *Acta Horticulturae* 793, 287-291
- Flachowsky H, Peil A, Sopanen T, Elo A, Hanke V (2007) Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early flowering in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Breeding* 126, 137-145
- Flachowsky H, Richter K, Kim W-S, Geider K, Hanke M-V (2008) Transgenic expression of a viral EPS-depolymerase is potentially useful to induce fire blight resistance in apple. *Annals of Applied Biology* 153, 345-355
- Flachowsky H, Szankowski I, Fischer TC, Richter K, Peil A, Höfer M, Dörschel C, Schmoock S, Gau AE, Halbwirth H, Hanke M-V (2010) Transgenic apple plants overexpressing the *Lc* gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight. *Planta* 231, 623-635
- Fladung M, Becker D (2010) Targeted integration and removal of transgenes in hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.) using site-specific recombination systems. *Plant Biology* 12, 334-340
- Fladung M, Schenk TMH, Polak O, Becker D (2010) Elimination of marker genes and targeted integration via FLP/FRT recombination system from yeast in hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.). *Tree Genetics & Genomes* 6, 205-217
- Freiman A, Shlizerman L, Golobovitch S, Yablovitz Z, Korchinsky R, Cohen Y, Samach A, Chevreau E, Le Roux P-M, Patocchi A, Flaishman M (2011) Development of a transgenic early flowering pear (*Pyrus communis* L.)

genotype by RNAi silencing of *PcTFL1-1* and *PcTFL1-2*. *Planta*, doi: 10.1007/s00425-011-1571-0

- Fuchs M, Cambra M, Capote N, Jelkmann W, Kundu J, Laval V, Martelli GP, Minafra A, Petrovic N, Pfeiffer P, Pompe-Novak M, Ravelonandro M, Saldarelli P, Stussi-Garaud C, Vigne E, Zagrai I (2007) Safety assessment of transgenic plums and grapevines expressing viral coat protein genes: new insights into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance. *Journal of Plant Pathology* 89, 5-12
- Galli P, Patocchi A, Broggin GAL, Gessler C (2010) The *Rvi15* (*Vr2*) apple scab resistance locus contains three TIR-NBS-LRR genes. *Molecular Plant and Microbe Interaction* 23, 608-617
- Gaskell G, Stares S, Allansdottir A, Allum N, Castro P, Esmer Y, Fischler C, Jackson J, Kronberger N, Hampel J, Mejlgaard N, Quintanilha A, Rammer A, Revuelta G, Stoneman P, Torgersen H, Wagner W (2010) EUR 24537 - Europeans and biotechnology in 2010: Winds of change? Directorate-General for Research Science in Society and Food, Agriculture & Fisheries, & Biotechnology, Luxembourg: Publications Office of the European Union, ISBN 978-92-79-16878-9, doi:10.2777/23393, pp 172
- Gessler C (2011) Cisgenic disease resistant apples: a product with benefits for the environment, producer and consumer. *Outlook on Pest Management*, doi:10.1564/22oct00, 1-4
- Gessler C, Patocchi A (2007) Recombinant DNA technology in apple. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 107, 113-132
- Gessler C, Patocchi A, Sansavini S, Tartarini S, Gianfranceschi L (2006) *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25, 473-503
- Gonsalves D (1998) Control of *Papaya ring spot virus* in papaya: a case study. *Annual Reviews of Phytopathology* 36, 415-437
- Gonsalves D (2002) Coat protein transgenic papaya "acquired" immunity for controlling *Papaya ringspot virus*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 266, 73-83
- Gosch C, Flachowsky H, Halbwirth H, Thill J, Mjka-Wittmann R, Treutter D, Richter K, Hanke M-V, Stich K (2011) Substrate specificity and contribution of the glycosyltransferase UGT71A15 to phloridzin biosynthesis. doi: 10.1007/s00468-011-0669-0
- Gossé F, Guyot S, Roussi S, Lobstein A, Fischer B, Seiler N, Raul F (2005) Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-

derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26, 1291-1295

- Graff G, Zilberman D (2001) An intellectual property clearinghouse for agricultural biotechnology. *Nature Biotechnology* 19, 1179-1180
- Hanke M-V, Flachowsky H (2010) Fruit Crops. In: Kempken F and Jung C (eds) *Genetic Modification of Plants, Biotechnology in Agriculture and Forestry* 64. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, Germany, 307-347
- Hanke M-V, Flachowsky H, Peil A, Hättasch C (2007) No flower no fruit – genetic potentials to trigger flowering in fruit trees. *Genes, Genomes and Genomics* 1, 1-20
- Hättasch C, Flachowsky H, Hanke M-V (2009) Evaluation of an alternative D-amino acid/DAAO selection system for transformation in apple (*Malus domestica* Borkh.). *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, ISAFRUIT Special Issue*, 188-194
- Hättasch C, Flachowsky H, Kapturska D, Hanke M-V (2008) Isolation of flowering genes and seasonal changes in their transcript levels related to flower induction and initiation in apple (*Malus domestica*). *Tree Physiology* 28, 1459-1466
- Hauck NR, Ikeda K, Tao R, Iezzoni AF (2006) The mutated S1-haplotype in sour cherry has an altered S-haplotype-specific F-box protein gene. *Journal of Heredity* 97, 514-520
- Herzog K, Flachowsky H, Deising HB, Hanke M-V (2012) Heat-shock-mediated elimination of the *nptII* marker gene in transgenic apple (*Malus × domestica* BORKH.). *Gene*, accepted
- Hily JM, Scorza R, Malinowski T, Zawadzka B, Ravelonandro M (2004) Stability of gene silencing-based resistance to *Plum pox virus* in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions. *Transgenic Research* 13, 427-436
- James DJ, Passey AJ, Barbara DJ, Bevan M (1989) Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports* 7, 658-661
- Joshi S, Soriano JM, Schaart J, Brogini GAL, Szankowski I, Jacobsen E, Krens F, Schouten HJ (2009) Approaches for development of cisgenic apples. *Transgenic Plant Journal* 3, 40-46
- Joshi SG, Schaart JG, Groenwold R, Jacobsen E, Schouten HJ, Krens FA (2011) Functional analysis and expression profiling of *HcrVf1* and *HcrVf2* for

- development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Molecular Biology* 75, 579-591
- Kalaitzandonakes N, Alston JM, Bradford KJ (2007) Compliance costs for regulatory approval of new biotech crops. *Nature Biotechnology* 25, 509-511
- Kean S (2010) Besting Johnny Appleseed. *Science* 328, 301-303
- Ko K, Norelli JL, Reynoird J-P, Boreszja-Wysocka E, Brown SK, Aldwinckle HS (2000) Effect of untranslated leader sequence of AMV RNA4 and signal peptide of pathogenesis-related protein 1b on attacin gene expression, and resistance to fire blight in transgenic apple. *Biotechnology Letters* 22, 373-381
- Krens FA, Pelgrom KTB, Schaart JG, den Nijs APM, Rouwendal GJA (2004) Clean vector technology for marker free transgenic fruit crops. *Acta Horticulturae* 663, 431-435
- Le Roux P-M, Flachowsky H, Hanke M-V, Gessler C, Patocchi A (2011) Use of a transgenic early flowering approach in apple (*Malus x domestica* Borkh.) to introgress fire blight resistance from 'Evereste'. *Molecular Breeding*, doi: 10.1007/s11032-011-9669-4
- Lehnert R (2011) On a FasTrack. *Good Fruit Grower*. November 2011, 38
- Lesemann S, Dunemann F (2006) Neue Erkenntnisse zur Biodiversität des Apfelmehltau-Erregers. *Gesunde Pflanzen* 58, 117-123
- Leser C, Treutter D (2005) Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. *Physiologia Plantarum* 123, 49-56
- Li H, Flachowsky H, Fischer THC, Hanke V, Forkmann G, Treutter D, Schwab W, Hoffmann TH, Szankowski I (2007) Maize *Lc* transcription factor causes induction of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Planta* 226, 1243-1254
- Liu Q, Ingersoll J, Owens L, Salih S, Meng R, Hammerschlag F (2001) Increased resistance to *Erwinia amylovora* exhibited by transgenic 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots, carrying a modified cecropin *Mb39* gene. *Acta Horticulturae* 560, 95-99
- Lius S, Mansharch RM, Fitch MMM, Slightom JL, Sanford JC, Gonsalves D (1997) Pathogen derived resistance provides papaya with effective protection against *Papaya ring spot virus*. *Molecular Breeding* 3, 161-168
- López-Noguera S, Petri C, Burgos L (2009) Combining a regeneration-promoting *ipt* gene and site-specific recombination allows a more efficient

apricot transformation and the elimination of marker genes. *Plant Cell Reports* 28, 1781-1790

- Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodríguez-Cerezo E (2011) New plant breeding techniques, State-of-the-art and prospects for commercial development. JRC 63971, EUR 24760 EN, ISBN 978-92-79-19715-4, ISSN 1018-5593, doi:10.2791/54761, Publications Office of the European Union, Luxembourg, pp 1-219
- Malinowski T, Cambra M, Capote N, Zawadska B, Gorris MT, Scorza R, Ravelonandro M (2006) Field trials of plum clones transformed with the *Plum pox virus* coat protein (PPV-CP) gene. *Plant Disease* 90, 1012-1018
- Malnoy M, Borejsza-Wysocka EE, Abbott P, Lewis S, Norelli JL, Flaishman M, Gidoni D, Aldwinckle HS (2007) Genetic transformation of apple without use of a selectable marker. *Acta Horticulturae* 738, 319-322
- Malnoy M, Borejsza-Wysocka EB, Norelli JL, Flaishman MA, Gidoni D, Aldwinckle HS (2010) Genetic transformation of apple (*Malus x domestica*) without use of a selectable marker gene. *Tree Genetics & Genomes* 6, 423-433
- Malnoy M, Jin Q, Borejsza-Wysocka EE, He SY, Aldwinckle HS (2007) Overexpression of the Apple *MpNPR1* gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 20, 1568-1580
- Malnoy M, Reynoird JP, Borejsza-Wysocka EE, Aldwinckle HS (2006) Activation of the pathogen-inducible *Gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus x domestica*). *Transgenic Research* 15, 83-93
- Matsuda N, Ikeda K, Kurosaka M, Takashina T, Isuzugawa K, Endo T, Omura M (2009) Early flowering phenotype in transgenic pears (*Pyrus communis* L.) expressing the *CiFT* Gene. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science* 78, 410-416
- Morris DM, Kritchevsky SB, Davis CE (1994) Serum carotenoids and coronary heart disease: the Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial and fellow-up study. *JAMA* 274, 1439-1441
- Norelli JL, Borejsza-Wysocka E, Momol MT, Mills JZ, Grethel A, Aldwinckle HS (1999) Genetic transformation for fire blight resistance in apple. *Acta Horticulturae* 489, 295-296
- Norelli JL, Jones AL, Aldwinckle HS (2003) Fire blight management in the twenty-first century – using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease* 87, 756-765

- Osakabea K, Osakabe Y, Tokia S (2010) Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 12034–12039
- Parravicini G, Gessler C, Denancé C, Lasserre-Zuber P, Vergne E, Brisset M-N, Patocchi A, Durel C-E, Broggin GAL (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'. Molecular Plant Pathology 12, 493-505
- Peil A, Bus VGM, Geider K, Richter K, Flachowsky H, Hanke M-V (2009) Improvement of fire blight resistance in apple and pear. International Journal of Plant Breeding 3, 1-27
- Peil A, Garcia-Libreros T, Richter K, Trognitz FC, Trognitz B, Hanke M-V, Flachowsky H (2007) Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3 detected by rapid genome scanning. Plant Breeding 126, 470-475
- Peil A, Hanke M-V (2005) Apfelmzüchtung in Deutschland – vom Samen zur Sorte. Forschungsreport 2, 10-13
- Peil A, Kellerhals M, Höfer M, Flachowsky H (2011) Apple Breeding – From the origin to genetic engineering. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology 5, 118-138
- Petkovsek MM, Stampar F, Veberic R (2009) Seasonal changes in phenolic compounds in the leaves of scab-resistant and susceptible apple cultivars. Canadian Journal of Plant Science 89, 745-753
- Quattrocchio F, Verweij W, Kroon A, Spelt C, Mol J, Koes R (2006) PH4 of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. The Plant Cell 18, 1274-1291
- Robischon M (2006) Field trials with transgenic trees – state of the art and developments. In: Fladung M, Ewald E (eds) Tree transgenesis. Springer, Heidelberg, pp 3-24
- Römmelt S, Treutter D, Speakman JB, Rademacher W (1999) Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple with respect to plant resistance against fire blight. Acta Horticulturae 489, 359-363
- Roßberg D (2007) NEPTUN oder „wie oft wird gespritzt“. Gesunde Pflanzen 59, 55-65

- Sanzol J (2009) Pistil-function breakdown in a new S-allele of European pear, S21° confers self-compatibility. *Plant Cell Reports* 28, 457-467
- Sasaki S, Yamagishi N, Yoshikawa N (2011) Efficient virus-induced gene silencing in apple, pear and Japanese pear using *Apple latent spherical virus* vectors. *Plant Methods* 7, 15, <http://www.plantmethods.com/content/7/1/15>
- Schäfer T, Buscot F, Flachowsky H, Hanke M-V, Kaldorf M, König S (2009) First results on the effect of increased chitinase expression in transgenic apple trees on mycorrhization with *Glomus interadices* and *G. mossae*. *Acta Horticulturae* 839, 719-724
- Schenkelaars P (2008) Dossierkosten markttoelating genetisch gemodificeerde gewassen in de Verenigde Staten en de Europese Unie. Available online: <http://www.sbcbiotech.nl/>
- Schmidt M (1937) Somatische Mutationen beim Kern- und Steinobst und ihre züchterische Bedeutung. *Der Züchter* 9, 81-89
- Schouten H, Krens FA, Jacobsen E (2006a) Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? *Nature Biotechnology* 24, 753
- Schouten H, Krens FA, Jacobsen E (2006b) Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Reports* 7, 750-753
- Schwartau H (2011) Durchschnittliche EU-Apfelernte erwartet. *The European Fruit Magazine* 9, 26-28
- Schwartau H, Görgens M (2011) EU-Kernobstschätzung 2011. Mitteilungen des Obstbauversuchsrings des Alten Landes e.V. an der ESTEBURG - Obstbauzentrum Jork 66, 288-293
- Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D (2006) Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9329–9339
- Shamel AD, Pomeroy CS (1936) Bud mutations in horticultural crops. *Journal of Heredity* 27, 487-494
- Sonneveld T, Tobutt KR, Vaughan SP, Robbinsa TB (2004) Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-box gene. *The Plant Cell* 17, 37-51
- Strauss SH, Tan H, Boerjan W, Sedjo R (2009) Strangled at birth? Forest biotech and the Convention on Biological Diversity. *Nature Biotechnology* 27, 519-527

- Szankowski I, Flachowsky H, Li H, Halbwirth H, Treutter D, Regos I, Hanke M-V, Stich K, Fischer TC (2009) Shift in polyphenol profile and sublethal phenotype caused by silencing of anthocyanidin synthase in apple (*Malus* sp.), *Planta* 229, 681-692
- Szankowski I, Waidmann S, Degenhardt J, Patocchi A, Paris R, Silfverberg-Dilworth, E, Broggin G, Gessler C (2009) Highly scab-resistant transgenic apple lines achieved by introgression of *HcrVf2* controlled by different native promoter lengths. *Tree Genetics & Genomes* 5, 349-358
- Terada R, Johzuka-Hisatomi Y, Saitoh M, Asao H, Iida S (2007) Gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics. *Plant Physiology* 144, 846-856
- This P, Lacombe T, Cadle-Davidson M, Owens CL (2007) Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. *Theoretical and Applied Genetics* 114, 723-730
- Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF (2009) High frequency modification of plant genes using engineered zinc finger nucleases. *Nature* 459, 442-445
- Tränkner C, Lehmann S, Hoenicka H, Hanke M-V, Fladung M, Lenhardt D, Dunemann F, Gau A, Schlangen K, Malnoy M, Flachowsky H (2010) Over-expression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232 (6), 1309-1324
- Tränkner C, Lehmann S, Hoenicka H, Hanke M-V, Fladung M, Lenhardt D, Dunemann F, Gau A, Schlangen K, Malnoy M, Flachowsky H (2011) Note added in proof to: Over-expression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 233, 217-218
- Ushijima K, Yamane H, Watari A, Kakehi E, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF, Tao R (2004) The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *The Plant Journal* 39, 573-586
- Vanblaere T, Szankowski I, Schaart J, Schouten H, Flachowsky H, Broggin GA, Gessler C (2011) The development of a cisgenic apple. *Journal of Biotechnology*, doi:10.1016/j.jbiotec.2011.05.013.
- Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL (2006) Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Molecular Carcinogenesis* 45, 164-174

- Venturi S, Dondini L, Donini P, Sansavini S (2006) Retrotransposon characterisation and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 112, 440-444
- Vinatzer BA, Patocchi A, Gianfranceschi L, Tartarini S, Zhang HB, Gessler C, Sansavini S (2001) Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14, 508-515
- Viswanath V, Albrechtsen BR, Strauss SH (2011) Global regulatory burden for field testing of genetically modified trees. *Tree Genetics & Genomes*, DOI: 10.1007/s11295-011-0445-8
- Walker AR, Lee E, Robinson SP (2006) Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. *Plant Molecular Biology* 62, 623-635
- Walter C, Fladung M, Boerjan W (2010) The 20-year environmental safety record of GM trees. *Nature Biotechnology* 28, 656-658
- Weber E, Gruetzner R, Werner S, Engler C, Marillonnet S (2011) Assembly of designer TAL effectors by golden gate cloning. *Plos One* 6, e19722
- Wei ZM, Beer SV (1993) *HrpI* of *Erwinia amylovora* functions in secretion of harpin and is a member of a new protein family. *Journal of Bacteriology* 175, 7958-7967
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A and Beer SV (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257, 85-88
- World Health Organization. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases: Report of WHO Study Group. WHO Technical Series Report No. 797. Geneva: WHO, 1990
- Yamagishi N, Sasaki S, Yamagata K, Komori S, Nagase M, Wada M, Yamamoto T, Yoshikawa N (2011) Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana FT* gene using the *Apple latent spherical virus* vector. *Plant Molecular Biology* 75, 193-204
- Yao J-L, Dong Y-H, Morris BAM (2001) Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1306-1311

Zelasco S, Ressegotti V, Confalonieri M, Carbonera D, Calligari P, Bonadei M, Bisoffi S, Yamada K, Balestrazzi A (2007) Evaluation of MAT-vector system in white poplar (*Populus alba* L.) and production of *ipt* marker-free transgenic plants by 'single-step transformation'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 91, 61-72

6 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Magda-Viola Hanke für die Schaffung der Möglichkeiten zum Aufbau eines eigenen Forschungsgebietes, das sie durch großes Interesse und anregende Diskussionen begleitete und ständig unterstützte. Desweiteren möchte ich ihr gemeinsam mit Herrn Dr. Andreas Peil für die vielen Jahre der freundschaftlichen Zusammenarbeit und des kreativen Gedankenaustausches danken.

Mein besonderer Dank gilt allen jetzigen und früheren Mitarbeitern des JKI-Instituts für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst in Dresden-Pillnitz mit denen ich direkt oder indirekt an einzelnen Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit zusammengearbeitet habe. Besonders danken möchte ich in diesem Zusammenhang Frau Dr. Katja Herzog, Frau Dr. Conny Tränkner, Frau Dr. Stefanie Reim, Herrn Dr. Marko Riedel, Frau Dr. Monika Höfer, Herrn Dr. Frank Dunemann, den technischen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen Frau Ines Hiller, Frau Kerstin Neumann, Frau Uta Hille, Frau Katrin Winkler, Frau Gerlinde Klotzsche, Frau Simone Schöber, Herrn Frank Urbitsch, Frau Ines Polster, Herrn Volkmar Vogt und Frau Martina Tanner, den wissenschaftlichen Volontären Frau Danuta Kapturska, Frau Sandra Lehmann, Herrn Jarod Rollins, Frau Tabea Birk, Frau Mandy Schöne, Frau Daniela Köhler, Frau Maria Michael, Frau Olivia Jakschik, Frau Cornelia Horn, Frau Annchristin Zierold, Herrn Michael Görnitz, Frau Mandy Koitzsch und Frau Claudia Dörschl für ihren Elan und die professionelle Mitarbeit.

Großer Dank gilt vor allem auch Herrn Prof. Dr. Thilo Fischer, Herrn Prof. Dr. Dieter Treutter, Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab und Frau Prof. Dr. Iris Szankowski mit denen ich über die vielen Jahre in enger Freundschaft zusammengearbeitet habe.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Schweizer Kollegen Herrn Prof. Dr. Cesare Gessler, Herrn Dr. Andrea Patocchi, Herrn Dr. Giovanni Brogini und Herrn Dr. Pierre-Marie Le Roux für die gemeinsame Zusammenarbeit, die konstruktive fachliche Kritik und die herzliche Freundschaft bedanken.

Bei meinen österreichischen Kolleginnen und Kollegen Herrn Prof. Dr. Karl Stich, Frau Dr. habil Heidrun Halbwirth, Herrn Dr. Christian Gosch und Frau Dr. Karin Schlangen möchte ich mich für die Möglichkeit der Zusammenarbeit und die schöne Zeit in Wien bedanken. Herrn Robert Höchtl und seiner Frau Sibylle danke ich für die nette Unterkunft, die anregenden Gespräche und die lehrreichen Ausflüge ins Wiener Umland.

Bei meinem Doktorvater und Lehrer Herrn Professor Dr. Wilhelm Eberhard Weber möchte ich mich vor allem für seine stetige Hilfsbereitschaft bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Holger B. Deising für die gute Zusammenarbeit und die wissenschaftliche Unterstützung.

Bei Herrn Dr. Matthias Fladung und Herrn Dr. Hans Hönicka möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Blütenbiologie bei mehrjährigen Gehölzpflanzen bedanken.

Bei allen bislang ungenannten Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst in Dresden-Pillnitz sowie bei den vielen Kolleginnen und Kollegen an anderen Instituten des Julius Kühn-Institutes bedanke ich mich für die vielfältige Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pillen bedanke ich mich für die Betreuung meiner Habilitationsarbeit seitens der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Bei meinen Eltern Johannes und Sabine Flachowsky möchte ich mich für die viele Unterstützung in all den Jahren bedanken.

Bei meiner Frau Kathrin und unseren Töchtern Gina und Lena möchte ich mich für die Rücksicht und das Verständnis bedanken, ohne die mir die notwendige Kraft und Ruhe zum Anfertigen dieser Arbeit gefehlt hätten.

Teile dieser Arbeit wurden u.a. finanziell vom Freistaat Sachsen, dem Ministerium für Wissenschaft und Kultur Niedersachsen, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, dem europäischen Forschungsprojekt ISAFRUIT, dem Österreichischen Ministerium für

Landwirtschaft, Forst, Wasser und Umwelt, dem Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF), dem Schweizer Bundesamt für Landwirtschaft (BLW), dem Schweizer Nationalfonds und der Europäischen COST-Aktion 864 unterstützt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Henryk Flachowsky

Adresse: Clara-Zetkin-Straße 28, 01445 Radebeul

Geburtsdatum: 05.10.1971 in Meerane

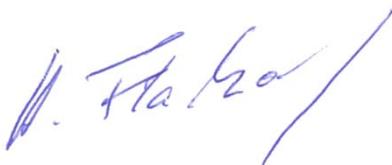
Familienstand: verheiratet mit Kathrin Sauer-Flachowsky,

Töchter: Gina Kathrin Flachowsky, Lena Sophie Flachowsky

Akademischer Werdegang

- | | |
|----------------------|---|
| 1998 | Diplom, an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Landwirtschaftliche Fakultät, Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz |
| 2003 | Promotion (Dr. agr., magna cum laude), an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Landwirtschaftliche Fakultät, Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz, auf dem Gebiet Pflanzenzüchtung und Genetik |
| 2001-2007 | Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Obstzüchtung, Dresden-Pillnitz, Postdoktorand |
| 2008-2009 | Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden-Pillnitz, Postdoktorand |
| 2009
(Mai – Juli) | Gastwissenschaftler an der Technischen Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften |
| Seit August
2009 | Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden-Pillnitz, Wissenschaftlicher Mitarbeiter |

Dresden, den 10.02.2012

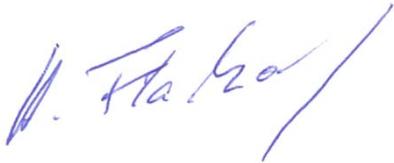


Dr. Henryk Flachowsky

Eidesstattliche Erklärung

Diese Habilitationsschrift wurde selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als Zitate gekennzeichnet.

Dresden, den 10.02. 2012



Dr. Henryk Flachowsky