

# **Funktionelle Analyse von *MLO* Genen im Rosengenom**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Juliane Geike (geb. Wehmeyer), M. Sc.

2018

Referent: Prof. Dr. Thomas Debener

Korreferentin: Prof. Dr. Traud Winkelmann

Tag der Promotion: 09.05.2018

## Zusammenfassung

Die Rose ist eine der beliebtesten und die ökonomisch bedeutendste Zierpflanze weltweit. Die Produktion von Schnittrosen im Gewächshaus begünstigt die Infektion mit dem Erreger des Echten Mehltaus *Podosphaera pannosa* (Wallr.: Fr.) de Bary, welche nur durch den wiederholten Einsatz von Fungiziden effektiv bekämpft werden kann. Aufgrund der komplexen Genetik der Rose und der starken Rassenbildung des Pathogens ist die Etablierung von monogenen oder polygenen Resistenzen in Sorten besonders aufwendig und in der Regel nur von begrenzter Wirksamkeit. Die Etablierung einer rassenunspezifischen, rezessiven Nichtwirts-Resistenz, wie sie für die *mlo* vermittelte Resistenz beschrieben wurde, stellt hier eine hochwirksame Alternative dar.

In dieser Arbeit wurden daher vier bereits charakterisierte *RhMLO* Gene (*RhMLO1* bis *RhMLO4*), die als Kandidaten für die Vermittlung der Mehltau-Anfälligkeit identifiziert wurden, zunächst mittels RNAi vermittelten Gen-Silencings funktionell untersucht. Durch transiente *Agrobacterium*-Infiltration von Petalen und anschließender Inokulation konnte für alle vier untersuchten *RhMLO* Gene ein Effekt auf die Vermittlung der Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau nachgewiesen werden. Auch in stabil transgenen Linien konnte dies durch quantitative Inokulationen bestätigt werden. Der stärkste Effekt konnte für *RhMLO1*, gefolgt von *RhMLO2*, beobachtet werden. Für *RhMLO3* und *RhMLO4* konnte in ihrer Kombination nur ein schwacher Effekt nachgewiesen werden. Die *RhMLO* Gene scheinen in der Vermittlung der Anfälligkeit additiv zu wirken. Diese Ergebnisse reihen sich in die Untersuchungen anderer dikotyler Arten ein: Auch in *A. thaliana* und Tomate wurde das Zusammenspiel mehrerer *MLO* Gene in der Vermittlung der Anfälligkeit gegenüber dem Erreger des Echten Mehltaus beschrieben. Des Weiteren konnte in diesen Arten auch ein unterschiedlich ausgeprägter Effekt der einzelnen *MLO* Gene beobachtet werden.

Durch Genome Editing Methoden ist es heute möglich, gezielte Mutationen in Genen zu setzen und diese so auszuschalten. Für polyploide und vegetativ vermehrte Arten liegen bislang jedoch nur Studien an Kartoffeln vor. Daher wurde in dieser Arbeit die Anwendbarkeit von TALENs und CRISPR/Cas zur gezielten Mutagenese der *RhMLO* Gene in der *Rosa hybrida* Sorte 'Pariser Charme' untersucht. Durch Amplifikation der Bindestellen und Auftrennung auf Polyacrylamid-Gelen konnten Insertionen und Deletionen bis auf eine Base genau detektiert werden. Alle stabil transgenen Linien wiesen ein Mosaikmuster an InDels auf und keine vollständige Mutation der *RhMLO* Allele konnte festgestellt werden. Durch eine kaskadenartige Vermehrung von In-vitro-Sprossen konnte der Anteil an mutierten Sequenzen innerhalb weniger Multiplikationsschritte zum Teil auf bis zu 90 % gesteigert werden. Mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung von Amplikons konnte die Abwesenheit von off-target Effekten bestätigt sowie die erzielten Mutationen eingehend analysiert werden. Die vorliegende Arbeit liefert somit wichtige Erkenntnisse und methodische Ansätze für die Erzeugung mehltaresistenter, nicht transgener Rosensorten.

Schlagwörter: *mildew resistance locus o*, *Rosa hybrida*, TALEN, CRISPR/Cas9, RNAi

## Abstract

Roses are amongst the most popular and economically important ornamental plants worldwide. The production of cut roses in the greenhouse favours the infection with the causative agent of powdery mildew *Podosphaera pannosa* (Wallr.: Fr.) de Bary. An infestation can only be controlled effectively by the repeated use of fungicides. The establishment of monogenic or polygenic resistances against this disease is particularly complex and usually only of limited use due to the complex nature of roses and the fast evolving of new races of the pathogen. A highly effective alternative depicts the establishment of race-unspecific and recessive non-host resistances, as described for the *mlo*-mediated resistance in diverse plant species.

In this study, four previously characterized *RhMLO* genes (*RhMLO1* to *RhMLO4*), which were identified as candidates to mediate susceptibility towards powdery mildew, were functionally analyzed by RNAi-mediated gene silencing. Using transient *Agrobacterium*-infiltration of petals and subsequent inoculation, an effect on the mediation of susceptibility towards powdery mildew could be demonstrated for all four investigated *RhMLO* genes. This effect could be confirmed in stable transgenic lines as well. The strongest effect was observed for *RhMLO1* followed by *RhMLO2*. The combination of *RhMLO3* and *RhMLO4* only revealed a weak effect for both. The mediation of susceptibility by the *RhMLO* genes appears to function in an additive manner. These results are in line with the studies of other dicotyledonous species: In *A. thaliana* and tomato, the interaction of more than one *MLO* gene was described in mediating susceptibility towards powdery mildew. A differently pronounced effect of the individual *MLO* genes could be demonstrated in those species as well.

By using Genome Editing methods, it is now possible to make specific mutations in genes to create knock-out mutants. For polyploid and vegetatively propagated species only studies on potatoes are available so far. Therefore, the applicability of TALENs and CRISPR/Cas for the directed mutagenesis of *RhMLO* genes in the *Rosa hybrida* variety 'PariserChrame' was analyzed. By amplification of the binding sites and separation on polyacrylamide gels, insertions and deletions could be accurately detected down to one base pair. No complete mutation of the *RhMLO* alleles could be detected in the transgenic lines. Moreover the lines showed a mosaic pattern of diverse InDels. By a cascading propagation of *in vitro* shoots, the mutation frequency could be increased up to 90% within a few multiplication steps. High-throughput sequencing of amplicons was used to demonstrate the absence of off-target effects and for an in depth analysis of the induced mutations. The present work thus provides important insights and methodological approaches for the production of mildew-resistant, non-transgenic rose varieties.

Keywords: *mildew resistance locus o*, *Rosa hybrida*, TALEN, CRISPR/Cas9, RNAi

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Abstract.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Rose.....	1
1.2 Der Echte Mehltau an Rosen.....	2
1.3 Resistenzzüchtung und Resistenzmechanismen in Rosen.....	3
1.3.1 Monogene Resistenzen.....	4
1.3.2 Polygene Resistenzen.....	6
1.3.3 Nichtwirts-Resistenzen.....	8
1.4 <i>mlo</i> -vermittelte Resistenz gegen den Echten Mehltau.....	10
1.5 Methoden zur gezielten Mutagenese.....	14
1.5.1 RNA Interferenz.....	15
1.5.2 TALEN.....	18
1.5.3 CRISPR/Cas9.....	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Pflanzenmaterial.....	26
2.1.2 Echter Mehltau.....	26
2.1.3 Bakterienstämme.....	26
2.1.4 Sequenzen.....	27
2.1.5 Vektoren.....	27
2.1.6 Kulturmedien und Puffer.....	28
2.1.7 Primer und Tags.....	28
2.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.9 Programme und Online Tools.....	28
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 In-vitro-Kultur.....	28
2.2.1.1 Induktion und Erhalt somatischer Embryonen von <i>R. hybrida</i> .....	28
2.2.1.2 Sprossregeneration und -proliferation von <i>R. hybrida</i> .....	29
2.2.1.3 Bewurzelung und Akklimatisierung.....	29
2.2.2 Transformation.....	29
2.2.2.1 Transformation von Bakterien.....	29
2.2.2.1.1 Herstellung elektrokompenter Zellen.....	29
2.2.2.1.2 Elektroporation.....	30
2.2.2.1.3 Anlegen von Glycerin-Kulturen.....	31
2.2.2.2 Transiente Transformation von Petalen.....	31
2.2.2.3 Stabile Transformation somatischer Embryonen.....	32
2.2.3 Quantitative Mehltau-Inokulation.....	33
2.2.3.1 Inokulation von Probenmaterial.....	33
2.2.3.2 Probennahme, Probenvorbereitung und mikroskopischen Auswertung.....	34
2.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.4.1 DNA-Isolation.....	35
2.2.4.2 RNA-Isolation.....	35

2.2.4.3	Plasmid-Präparation.....	36
2.2.4.4	PCR-Reaktionen .....	36
2.2.4.4.1	Reverse Transkription.....	36
2.2.4.4.2	Standard-PCR Protokoll .....	37
2.2.4.4.3	Kolonie-PCR .....	38
2.2.4.4.4	PCR mit IRD-markierten Primern.....	38
2.2.4.4.5	M13-PCR.....	39
2.2.4.4.6	Proof-reading PCR .....	40
2.2.4.4.7	q-RT-PCR.....	42
2.2.4.5	Auftrennung der Nukleinsäure nach Größe.....	43
2.2.4.5.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	43
2.2.4.5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	44
2.2.4.6	Ligation.....	45
2.2.4.7	Probenvorbereitung für die Sequenzierung nach Sanger.....	46
2.2.4.8	Probenvorbereitung für die Amplikon-Sequenzierung.....	46
2.2.5	Bioinformatische und rechnergestützte Methoden.....	47
2.2.5.1	Primererstellung.....	47
2.2.5.2	Vektorerstellung .....	47
2.2.5.2.1	RNAi Vektoren.....	47
2.2.5.2.2	CRISPR/Cas Vektoren .....	48
2.2.5.3	Bearbeitung von Sequenzen .....	49
2.2.5.4	Bearbeitung und Auswertung der Amplikon-Sequenzierung.....	50
2.2.5.5	Statistische Auswertungen.....	51
3	Ergebnisse.....	52
3.1	RNAi-basierte Methoden zur Regulierung der <i>RhMLO</i> Gene.....	52
3.1.1	Transiente Transformation der RhMLO-RNAi Konstrukte.....	52
3.1.1.1	Transiente Transformationsexperimente .....	52
3.1.1.2	Expressionsanalysen der transienten Transformation .....	53
3.1.1.3	Quantitative Inokulationsexperimente mit dem Echten Mehltau .....	56
3.1.2	Stabile Transformation der <i>RhMLO</i> -RNAi Konstrukte .....	60
3.1.2.1	Stabile Transformationsexperimente.....	60
3.1.2.2	Überprüfung des transgenen Charakters der regenerierten RhMLO-RNAi Linien.....	62
3.1.2.3	Expressionsanalysen der RhMLO-RNAi Linien.....	64
3.1.2.4	Quantitative Inokulationsexperimente der RhMLO-RNAi Linien.....	71
3.1.2.4.1	Auswertung der Inokulationsexperimente der Linien von RhMLO1-RNAi und RhMLO2-RNAi.....	73
3.1.2.4.2	Auswertung der Inokulationsexperimente der Linien von RhMLO3/4-RNAi.....	77
3.1.2.4.3	Auswertung aller RhMLO-RNAi Linien als Gruppen .....	79
3.2	TALEN-vermittelte Mutation der <i>RhMLO</i> Gene.....	82
3.2.1	Transiente Transformation der TALEN Konstrukte .....	82
3.2.2	Stabile Transformation der TALEN Konstrukte.....	85
3.2.2.1	Transformationseffizienz und Überprüfung des transgenen Charakters .....	85
3.2.3	Kaskadenvermehrung.....	87
3.2.3.1	Kaskade der Linie T3/4A.....	89
3.2.3.2	Kaskade der Linie T3/4C.....	91
3.2.3.3	Kaskade der Linie T3/4D.....	92
3.2.4	Amplikon-Sequenzierung der TALEN Linien.....	93
3.2.4.1	Auswertung der Amplikons der Proben von Linie T3/4A.....	95
3.2.4.2	Auswertung der Amplikons der Proben von Linie T3/4C.....	97
3.2.4.3	Auswertung der Amplikons der Proben von Linie T3/4D.....	101
3.2.4.4	Position der gesetzten Mutation aller analysierten TALEN Proben.....	105

3.2.4.5	Analyse der off-target Effekte der TALEN Linien.....	108
3.3	CRISPR/Cas-vermittelte Mutation der <i>RhMLO</i> Gene .....	109
3.3.1	Transiente Transformation der CRISPR/Cas Konstrukte .....	109
3.3.2	Stabile Transformation der CRISPR/Cas Konstrukte .....	110
3.3.2.1	Transformationseffizienz und Überprüfung des transgenen Charakters .....	110
3.3.3	Kaskaden-Vermehrung der CRISPR/Cas Linien .....	113
3.3.3.1	Kaskaden der Linien von CCMlo1 .....	113
3.3.3.2	Kaskaden der Linien von CCMlo2 .....	114
3.3.3.3	Kaskaden der Linien von CCMlo3/4.....	117
3.3.4	Amplikon-Sequenzierung der CRISPR/Cas Linien .....	120
3.3.4.1	Auswertung der Amplikons der Probe von Linie CC1A.....	122
3.3.4.2	Auswertung der Amplikons der Linien von CCMlo2 .....	122
3.3.4.2.1	Auswertung der Amplikons der Kaskade von CC2C .....	122
3.3.4.2.2	Auswertung der Amplikons der Probe von Linie CC2G.....	129
3.3.4.3	Auswertung der Amplikons der Linien von CCMlo3/4 .....	132
3.3.4.3.1	Auswertung der Amplikons der Kaskade von CC3/4A.....	134
3.3.4.3.2	Auswertung der Amplikons der Probe von Linie CC3/4E.....	139
3.3.4.4	Analyse der Positionen der gesetzten Mutationen.....	141
3.3.4.5	Analyse der Insertions-Sequenzen der CRISPR/Cas Linien .....	143
3.3.4.6	Analyse der off-target Effekte der CRISPR/Cas Linien.....	146
4	Diskussion.....	148
4.1	Transformationseffizienzen.....	148
4.1.1	Transformationseffizienzen durch Optimierung des Protokolls .....	148
4.1.2	Transformationseffizienzen mit den TALEN Konstrukten.....	151
4.1.3	Beobachtete Phänotypen .....	153
4.1.4	Feststellung des transgenen Charakters.....	155
4.2	Funktionelle Analysen der <i>RhMLOs</i> mittels RNAi Silencing .....	158
4.2.1	Expressionsanalysen zur Regulation der <i>RhMLOs</i> .....	158
4.2.1.1	Expressionsanalysen der transienten Transformation von Petalen.....	158
4.2.1.2	Expressionsanalysen der stabil transgenen RhMLO-RNAi Linien .....	160
4.2.2	Quantitative Inokulationsversuche .....	163
4.2.2.1	Quantitative Inokulationsversuche der transienten Transformation von Petalen..	163
4.2.2.2	Quantitative Inokulationsversuche der RhMLO-RNAi Linien .....	165
4.2.2.3	Rolle der <i>RhMLOs</i> in der Anfälligkeitsvermittlung gegenüber <i>P. pannosa</i> ...	169
4.3	Einsatz von TALEN und CRISPR/Cas9 zur gezielten Mutation von <i>RhMLO</i> Genen in <i>R. hybrida</i> .....	172
4.3.1	Transiente Analysen der TALEN und CRISPR/Cas Konstrukte .....	173
4.3.2	Kaskaden-Vermehrung der stabil transgenen TALEN und CRISPR/Cas Linien.	176
4.3.3	Amplikon-Sequenzierung ausgewählter Proben .....	182
4.3.4	Off-target Effekte .....	190
5	Fazit und Ausblick .....	193
6	Literaturverzeichnis .....	196
7	Anhang.....	221

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der ETI.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der PTI.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur der Argonauten Proteine.....	17
Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung des RNAi-vermittelten Gen-Silencings. ....	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der TAL Effektoren. ....	20
Abbildung 6: Schematische Darstellung der RNA-geleiteten DNA Spaltung durch CRISPR/Cas9. ....	24
Abbildung 7: Genstruktur der vier der <i>RhMLOs</i> und Lokalisation der klonierten Fragmen- te in den Vektor p9U10-RNAi.....	48
Abbildung 8: Lage der <i>Protospacer</i> der CRISPR/Cas Konstrukte in der Genstruktur der <i>RhMLOs</i> . 49	
Abbildung 9: Mit dem dsRed-Kontrollkonstrukt infiltrierte Petale von 'Pariser Charme' unter LED-Licht im Vergleich zur Kontrolle. ....	52
Abbildung 10: Agarosegelelektrophorese der RNA-Proben der transienten Infiltration der RhMLO-RNAi Konstrukte von Versuch 2 zur Qualitätskontrolle.....	53
Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese der GAPDH-PCR mit synthetisierter cDNA der Pro- ben der transienten Infiltration der RhMLO-RNAi Konstrukte von Versuch 2. ....	53
Abbildung 12: Boxplot der relativen Expression der <i>RhMLO</i> Gene in der transienten Transformation mit RhMLO1-RNAi.....	55
Abbildung 13: Boxplot der relativen Expression der <i>RhMLO</i> Gene in der transienten Transformation mit RhMLO2-RNAi.....	55
Abbildung 14: Boxplot der relativen Expression der <i>RhMLO</i> Gene in der transienten Transformation mit RhMLO3/4-RNAi.....	56
Abbildung 15: Anteil der myzelbildenden Konidien des Echten Mehltaus der Infiltrations/Inokulations-Versuche mit Petalen der Sorte 'Pariser Charme'. ....	57
Abbildung 16: Anteil der myzelbildenden Konidien des Echten Mehltaus der einzelnen Infiltrations/Inokulations-Versuche.....	58
Abbildung 17: In-vitro-Spross mit abweichendem Phänotyp aus Transformation A der RNAi-Konstrukte im Vergleich zu einem normal entwickelten Spross.....	61
Abbildung 18: Regenerierte und akklimatisierte RhMLO-RNAi Linien und Kontroll-Pflanzen... 62	
Abbildung 19: Repräsentatives Ergebnis der Agarosegelelektrophorese der <i>NPTII-PCR</i> der RhMLO-RNAi Linien. ....	63
Abbildung 20: Repräsentatives Ergebnis der Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung auf persistierende Agrobakterien in den RhMLO-RNAi Linien. ....	63
Abbildung 21: Ergebnis der Agarosegelelektrophorese des Tests auf Expression der RNAi- Kassette mit cDNA von RhMLO1-RNAi Linien. ....	64
Abbildung 22: Repräsentative Agarosegelelektrophorese von RNA-Proben der RhMLO- RNAi Linien zur Qualitätskontrolle. ....	65
Abbildung 23: Repräsentative Agarosegelelektrophorese der GAPDH-PCR mit syntheti- sierter cDNA von Proben der RhMLO-RNAi Linien. ....	65
Abbildung 24: Boxplot der RQ-Werte der <i>RhMLO1</i> -Expression der RhMLO1-RNAi Linien relativ zur Kontrolle. ....	67
Abbildung 25: Boxplot der RQ-Werte der <i>RhMLO2</i> -Expression der RhMLO2-RNAi Linien relativ zur Kontrolle. ....	68

Abbildung 26: Boxplot der RQ-Werte der <i>RhMLO3</i> -Expression der RhMLO3/4-RNAi Linien relativ zur Kontrolle. ....	69
Abbildung 27: Boxplot der RQ-Werte der <i>RhMLO4</i> -Expression der RhMLO3/4-RNAi Linien relativ zur Kontrolle. ....	70
Abbildung 28: Myzelbildende und gekeimte Konidien des Echten Mehltaus an Rosen. ....	72
Abbildung 29: Boxplot der Daten der Mehltau-Inokulationsexperimente mit den RhMLO-RNAi Linien. ....	73
Abbildung 30: Boxplots der Ergebnisse der Inokulationen mit den RhMLO1-RNAi Linien im Vergleich zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung. ....	79
Abbildung 31: Boxplots der Ergebnisse der Inokulationen mit den RhMLO2-RNAi Linien im Vergleich zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung. ....	80
Abbildung 32: Boxplots der Ergebnisse der Inokulationen mit den RhMLO3/4-RNAi Linien im Vergleich zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung. ....	80
Abbildung 33: PAA-Gelelektrophorese der amplifizierten Bindestellen der transienten Transformation mit dem Konstrukt TMlo3/4-2. ....	83
Abbildung 34: PAA-Gelelektrophorese der amplifizierten Bindestellen der transienten Transformation mit den Konstrukten TMlo3/4-1 und TMlo3/4-1*. ....	84
Abbildung 35: Agarosegelelektrophorese der <i>NPTII</i> -PCR der TALEN Linien. ....	86
Abbildung 36: Agarosegelelektrophorese der PCR zur Überprüfung auf persistierende Agrobakterien in den TALEN Linien. ....	86
Abbildung 37: Schematische Darstellung der Kaskaden-Vermehrung. ....	88
Abbildung 38: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der TALEN-Bindestellen der Kaskade von T3/4A. ....	90
Abbildung 39: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der TALEN-Bindestellen der Kaskade von T3/4C. ....	91
Abbildung 40: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der TALEN-Bindestellen der Kaskade von T3/4D. ....	93
Abbildung 41: Grafische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der detektierten Mutationen von T3/4A. ....	96
Abbildung 42: Bandenmuster der PAA-Gelelektrophorese der Probe T3/4C 1. ....	98
Abbildung 43: Bandenmuster der PAA-Gelelektrophorese der Probe T3/4C 1.2.1.2. ....	100
Abbildung 44: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Deletionen der Proben T3/4C 1 und T3/4C 1.2.1.2. ....	101
Abbildung 45: Bandenmuster der PAA-Gelelektrophorese der Probe T3/4D 1. ....	103
Abbildung 46: Bandenmuster der PAA-Gelelektrophorese der Probe T3/4D 1.1.2.1.3. ....	104
Abbildung 47: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Deletionen der Proben T3/4D 1 und T3/4D 1.1.2.1.3. ....	105
Abbildung 48: Positionen der gesetzten Mutationen der TALEN Linien. ....	106
Abbildung 49: Deletionsvarianten der TALEN Linien im Vergleich zur Referenzsequenz. ....	107
Abbildung 50: Sequenzen der TALEN-Bindestellen von <i>RhMLO3</i> und <i>RhMLO4</i> im Vergleich zu den homologen Sequenzbereichen von <i>RhMLO1</i> und <i>RhMLO2</i> . ....	108
Abbildung 51: PAA-Gelelektrophorese der amplifizierten Bindestellen der transienten Transformation mit den CRISPR/Cas Konstrukten der ersten und zweiten Generation. ....	109
Abbildung 52: Repräsentatives Ergebnis nach Agarosegelelektrophorese der <i>NPTII</i> -PCR von regenerierten CRISPR/Cas Linien. ....	111

Abbildung 53: Repräsentatives Ergebnis nach Agarosegelelektrophorese einer PCR zum Test auf persistierende Agrobakterien der CRISPR/Cas Linien. ....	111
Abbildung 54: Agarosegelelektrophorese der RT-PCR zum Test auf CasD10A Expression. ....	112
Abbildung 55: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen der Kaskade von CC1A.....	113
Abbildung 56: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen der Kaskade von CC1B.....	114
Abbildung 57: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen der Kaskaden von CC2B und CC2C.....	115
Abbildung 58: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen weiterer Linien von CCMlo2. ....	116
Abbildung 59: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen der Kaskade von CC3/4A und CC3/4C.....	118
Abbildung 60: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen weiterer Linien von CCMlo3/4. ....	119
Abbildung 61: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCMlo2 Bindestelle der Probe CC2C 2.....	124
Abbildung 62: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCMlo2 Bindestelle der Probe CC2C 2.3.....	127
Abbildung 63: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Deletionen und Insertionen der Probe CC2C 2.....	128
Abbildung 64: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Deletionen und Insertionen der Probe CC2C 2.3.....	128
Abbildung 65: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCMlo2 Bindestelle der Probe CC2G 8x. ....	131
Abbildung 66: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Deletionen und Insertionen der Probe CC2G 8x. ....	132
Abbildung 67: Detektierte Varianten in der Kontrollprobe von <i>RhMLO3</i> und <i>RhMLO4</i> .....	134
Abbildung 68: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCMlo3/4 Bindestelle der Probe CC3/4A 2. ....	135
Abbildung 69: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCMlo3/4 Bindestelle der Probe CC3/4A 2.2.2. ....	137
Abbildung 70: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der detektierten Insertionen der Probe CC3/4A 2. ....	138
Abbildung 71: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der detektierten Insertionen und Deletionen der Probe CC3/4A 2.2.2.....	138
Abbildung 72: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCMlo3/4 Bindestelle der Probe CC3/4E 5x.....	140
Abbildung 73: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der detektierten Insertionen und Deletionen der Probe CC3/4E 5x.....	141
Abbildung 74: Position der gesetzten Mutationen von CCMlo2 in der Bindestelle.....	142
Abbildung 75: Position der gesetzten Mutationen von CCMlo3/4 in der Bindestelle.....	142
Abbildung 76: Insertionsvarianten der Probe CC2C 2.3.....	144
Abbildung 77: Insertionsvarianten der Probe CC3/4E 5x.....	145
Abbildung 78: Sequenzen der Bindestellen der CRISPR/Cas Konstrukte im Vergleich zu den homologen Sequenzbereichen der anderen <i>RhMLO</i> Gene aus Klade V.....	147

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten <i>A. tumefaciens</i> Stämme.....	27
Tabelle 2: <i>RhMLOs</i> und <i>Accession</i> -Nummern.....	27
Tabelle 3: Reaktionsansatz der reversen Transkription.....	37
Tabelle 4: Bedingungen der reversen Transkription.....	37
Tabelle 5: Standardprotokoll der PCR-Reaktionen.....	37
Tabelle 6: Bedingungen des Standard-PCR Protokolls.....	38
Tabelle 7: Reaktionsansatz der Kolonie-PCR.....	38
Tabelle 8: Reaktionsbedingungen der Kolonie-PCR.....	38
Tabelle 9: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation der Bindestellen der TALEN Konstrukte...	39
Tabelle 10: PCR-Bedingungen zur Amplifikation der Bindestellen der TALEN Konstrukte.	39
Tabelle 11: PCR-Reaktionsansatz der M13-PCR zur Amplifikation der Bindestellen der CRISPR/Cas Konstrukte.....	40
Tabelle 12: Reaktionsbedingungen der M13-PCR zur Amplifikation der Bindestellen der CRISPR/Cas Konstrukte.....	40
Tabelle 13: Reaktionsansatz der <i>proof-reading</i> PCR unter Verwendung der TAKARA- PrimeSTAR HS DNA Polymerase.....	41
Tabelle 14: Reaktionsbedingen der <i>proof-reading</i> PCR zur Amplifikation der <i>RhMLO</i> - Sequenzen für die Klonierung mit der PrimeSTAR Polymerase.....	41
Tabelle 15: Bedingungen der <i>proof-reading</i> PCR zur Synthese der Amplikons mit der PrimeSTAR Polymerase.....	41
Tabelle 16: Bedingungen der <i>proof-reading</i> PCR zum Anfügen der Tags an die Amplikons mit der PrimeSTAR Polymerase.....	42
Tabelle 17: Reaktionsansatz der <i>proof-reading</i> PCR unter Verwendung der Phusion High- Fidelity DNA Polymerase.....	42
Tabelle 18: Bedingungen der <i>proof-reading</i> PCR zur Synthese der Amplikons mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase.....	42
Tabelle 19: Reaktionsansatz der q-RT-PCR Analysen.....	43
Tabelle 20: Reaktionsbedingungen der q-RT-PCR.....	43
Tabelle 21: Zusammensetzung der PAA-Gele.....	44
Tabelle 22: Laufbedingungen der PAA-Gele.....	45
Tabelle 23: HindII und BamHI Verdau des p9U10-RNAi Vektors.....	45
Tabelle 24: Reaktionsmix der Ligation der <i>RhMLO</i> -RNAi Fragmente in den Vektor p9U10-RNAi.	46
Tabelle 25: <i>Spacer</i> Sequenzen der sgRNAs der verwendeten CRISPR/Cas Konstrukte.....	49
Tabelle 26: Mapping Parameter der Amplikonsequenzen.....	50
Tabelle 27: Gesamteffekte der transienten Infiltrations/Inokulations-Versuche mit den <i>RhMLO</i> -RNAi Konstrukten.....	59
Tabelle 28: Effekte der <i>RhMLO</i> -RNAi Konstrukte gepoolt über die vier transienten Infiltrations/Inokulations-Versuche auf die Myzel-Bildung.....	59
Tabelle 29: Übersicht über die stabilen Transformationsexperimente mit den <i>RhMLO</i> -RNAi Konstrukten.....	61
Tabelle 30: Übersicht über die verwendeten <i>RhMLO</i> -RNAi Linien für die q-RT-PCR Analysen.	66
Tabelle 31: Übersicht über die verwendeten <i>RhMLO</i> -RNAi Linien der Inokulations- experimente, die Wiederholungen und die Anzahl der untersuchten Proben.....	71

Tabelle 32: Test der Inokulationen der Linien von RhMLO1- und RhMLO2-RNAi auf Gesamt-Effekte mittels ANOVA. ....	74
Tabelle 33: Ergebnisse des Vergleichs der RhMLO1- und RhMLO2-RNAi Linien gegen die Kontrolle über alle Inokulationsexperimente auf die Myzel-Bildung.....	74
Tabelle 34: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO1- und RhMLO2-RNAi zur Kontrolle der Inokulation A auf die Myzel-Bildung.....	75
Tabelle 35: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO1- und RhMLO2-RNAi zur Kontrolle der Inokulation B auf die Myzel-Bildung.....	75
Tabelle 36: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO1- und RhMLO2-RNAi zur Kontrolle der Inokulation C auf die Myzel-Bildung.....	76
Tabelle 37: Test der Inokulationen der Linien von RhMLO3/4-RNAi auf Gesamt-Effekte mittels ANOVA.....	77
Tabelle 38: Ergebnisse des Vergleichs der RhMLO3/4-RNAi Linien gegen die Kontrolle über alle Inokulationsexperimente auf die Myzel-Bildung.....	77
Tabelle 39: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO3/4-RNAi zur Kontrolle der Inokulation D auf die Myzel-Bildung.....	78
Tabelle 40: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO3/4-RNAi zur Kontrolle der Inokulation E auf die Myzel-Bildung.....	78
Tabelle 41: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO3/4-RNAi zur Kontrolle der Inokulation F auf die Myzel-Bildung.....	78
Tabelle 42: Ergebnisse der Vergleichs aller RhMLO1-RNAi Linien als Gruppe zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung.....	81
Tabelle 43: Ergebnisse der Vergleichs aller RhMLO2-RNAi Linien als Gruppe zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung.....	81
Tabelle 44: Ergebnisse der Vergleichs aller RhMLO3/4-RNAi Linien als Gruppe zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung.....	82
Tabelle 45: Übersicht über die Transformationsexperimente mit den TALEN Konstrukten..	85
Tabelle 46: Eingesetzte Proben der TALEN Linien für die Amplikon-Sequenzierung und erhaltene Anzahl der Reads pro Probe.....	94
Tabelle 47: Übersicht über die detektierten Mutationen der Probe T3/4A 1.1.....	95
Tabelle 48: Übersicht über die detektierten Mutationen der Probe T3/4A 1.1.2.2.1.1.....	95
Tabelle 49: Frequenzen der Deletionen gleicher Länge der Probe T3/4C 1.....	97
Tabelle 50: Frequenzen der Deletionen gleicher Länge der Probe T3/4C 1.2.1.2.....	99
Tabelle 51: Übersicht über die detektierten Mutationen der Probe T3/4D 1.....	102
Tabelle 52: Übersicht über die detektierten Mutationen der Probe T3/4D 1.1.2.1.3.....	103
Tabelle 53: Übersicht über das Transformationsexperiment mit den CRISPR/Cas Konstrukten....	110
Tabelle 54: Schema zur Bezeichnung der CRISPR/Cas Linien.....	112
Tabelle 55: Eingesetzte Proben der CRISPR/Cas Linien für die Amplikon-Sequenzierung und erhaltene Anzahl der Reads pro Probe.....	121
Tabelle 56: Detektierte Varianten gleicher Länge der Probe CC2C 2.....	123
Tabelle 57: Detektierte Varianten gleicher Länge der Probe CC2C 2.3.....	126
Tabelle 58: Detektierte Varianten gleicher Länge der Probe CC2G 8x.....	130
Tabelle 59: Detektierte Varianten der Probe CC3/4A 2.....	135
Tabelle 60: Detektierte Varianten der Probe CC3/4A 2.2.2.....	136
Tabelle 61: Detektierte Varianten gleicher Länge der Probe CC3/4E 5x.....	139

## Abkürzungsverzeichnis

2-iP	6-( $\gamma$ - $\gamma$ -Dimethylallylamino)-Purin
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
AD	Aktivierungsdomäne
AGO	Argonauten Protein
ALS	Acetolactat Synthase Gen
APS	Ammoniumpersulfat
AtMLO	<i>Arabidopsis thaliana</i> mildew resistance locus o Gen
ATP	Adenosintriphosphat
Avr	Avirulenz-Gen/Proteine
BAP	Benzylaminopurin
bp	Basenpaar(e)
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
Cas	CRISPR-assoziiertes Protein
Cas9n	Cas9 Nickase
CC	coiled coil
cDNA	komplementäre DNA(complementary DNA)
CLKs	Cystein-rich receptor like kinase
CRISPR	clustered regularly interspaced palindromic repeats
crRNA	CRISPR RNA
dCas9	dead Cas9
DCL	Dicer like proteine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dpi	days post inoculation
dsRBD	double-stranded RNA binding domain
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamtetraessigsäure
ETI	Effector triggered immunity
FB-Medium	Freezing-Broth-Medium
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
GA <sub>3</sub>	Gibberellinsäure A3
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Gen
GBSS	granule-bound starch synthase Gen
GO	Gen-Ontologie
gRNA	guide RNA
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
HDR	homologous directed recombination
hpRNA	hairpin RNA
HR	hypersensitive Reaktion
HvMLO	<i>Hordeum vulgare</i> mildew resistance locus o Gen
IBA	Indol-3-buttersäure

InDel	Insertion/Deletion
IRD	Infrared dye
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LED	Lichtemittierende Diode
LRR	Leucine rich repeat
MAMP	microbe-associated molecular patterns
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MCS	multiple cloning site
miRNA	micro RNA
MLO	mildew resistance locus O
mRNA	messenger RNA
NB	nucleotide binding
NGS	next generation sequencing
NHEJ	non homologous end joining
NLS	nuclear localization signal
NPTII	neomycin phosphotransferase II Gen
OCS	octopine synthase gene
PAA	Polyacrylamid
PAM	protospacer adjacent motif
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PAZ	Piwi-Argonaute-Zwille Domäne
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEN1	Penetration
PGR	plant growth regulators
PhMLO	<i>Petunia hybrida</i> mildew resistance locus o Gen
PIWI	P-element induced wimpy testis
PTGS	post-transcriptional gene silencing
PTI	PAMP triggered immunity
q-RT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase PCR
QTL	quantitative trait loci
R	Resistenz-Gen/Protein
RdDM	RNA-dependent DNA methylation
Rdr1	Resistenzgen gegen <i>Diplocarpon rosae</i>
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase
RhMLO	<i>Rosa hybrida</i> mildew resistance locus o Gen
RLKs	receptor-like kinases
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
Ror2	required for mlo-specified resistance
ROS	reactive oxygen species
Rpp1	Resistenzgen gegen <i>Podosphaera pannosa</i>
RQ	Relative Expression
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RVDs	repeat variable diresidues

SAND	Gen der SAND-Familie
sgRNA	single guide RNA
siRNA	small interfering RNA
SIMLO	<i>Solanum lycopersicum</i> mildew resistance locus o Gen
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
SNP	single nucleotide polymorphism
SOB/SOC-Medium	Super-Optimal-Broth-Medium /Glucose added
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAL Effektoren	transcription activator-like effector
TALLEN	TAL Effektoren Nuklease
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
T-DNA	transfer DNA
TDZ	Thidiazuron
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIR	Toll and Interleukin-1 receptor
TMV	Tabak Mosaik Virus
tracrRNA	transaktivierende crRNA
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UBC	ubiquitin conjugating enzyme Gen
VIGS	Virus-induced gene silencing
w/v	Gewicht pro Volumen
WGA	wheat germ agglutinin
WGS	whole genome sequencing
YEP-Medium	Yeast-Extract-Peptide-Medium

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Rose

Neben ihrer kulturhistorischen Bedeutung, die sich in Kunst, Literatur und Musik widerspiegelt, ist die Rose von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Sie stellt die kommerziell bedeutendste Schnittblume dar und auch bei den unter Glas produzierten Kulturen belegt sie den ersten Rang (Gudin 2000, Horst und Cloyd 2007). Laut Statistisches Bundesamt (2017a) wurden 2016 rund 1,53 Mrd. Rosen (Stückzahl frischer Rosen) in einem Wert von rund 327 Millionen Euro nach Deutschland importiert, mehr als 70 % davon aus den Niederlanden und rund 17 % aus Kenia (Statistisches Bundesamt 2015, Statistisches Bundesamt 2017b). Ursprünglich auf der nördlichen Hemisphäre heimisch (Phillips und Rix 1988), werden Rosen heute auf der ganzen Welt kultiviert. Große Produktionszentren für Schnittrosen im Gewächshaus sind hauptsächlich in den Hochlagen der südlichen Hemisphäre, vor allem in Kenia und Kolumbien gelegen (Gacheri et al. 2015, Pemberton 2003).

Rosen sind der Gattung *Rosa* der Unterfamilie der *Rosoideae* in der Familie der *Rosaceae* (Ordnung *Rosales*) zugeordnet. Die Gattung *Rosa* ist in die Untergattungen *Rosa*, *Hesperhodos*, *Hulthemia* und *Platyrrhodon* unterteilt (Horst und Cloyd 2007). Die Untergattung *Rosa* umfasst mit 120 bis 200 Arten rund 95 % der Vertreter der Gattung und ist in die Sektionen *Banksiae*, *Bracteatae*, *Caninae*, *Carolinae*, *Cinnamomeae*, *Indicae*, *Laevigatae*, *Pimpinellifoliae*, *Rosa* und *Synstylae* untergliedert (Nybom 2009, Wissemann und Ritz 2005). Die heute kultivierten Sorten zählen dabei fast ausschließlich zur Sektion *Rosa*. Die taxonomische Einordnung der Rosen ist aufgrund ihrer genetischen und morphologischen Komplexität nicht trivial und die hier beschriebene Einteilung bis heute nicht unumstritten – verschiedene Autoren haben Änderungen und Überarbeitungen der Klassifizierungen anhand von Marker-basierten Untersuchungen vorgeschlagen (z.B. Koopman et al. 2008, Wissemann und Ritz 2005). Rosen sind stark heterozygot, haben eine Basischromosomenzahl von sieben und kommen von diploid ( $2x$ ,  $2n=14$ ) bis oktaploid ( $8x$ ,  $2n=56$ ) vor, wobei die meisten Kultursorten tetraploid und Wildarten überwiegend diploid sind (Nybom 2009). Mit 0,78 bis 1,29 pg pro haploiden Genomsatz zeichnen sich Rosen durch ein relativ kleines Genom aus (Yokoya et al. 2000). Der genetische Hintergrund heutiger Kultursorten rührt von vielen interspezifischen Kreuzungen zwischen sieben bis zehn verschiedenen Arten aus vier Sektionen her (Gudin 2000, Gudin 2003, Zlesak 2007). Durch intensive Zuchtbemühungen sind heute welt-

weit über 10.000 Rosensorten registriert (Debener 1999, Nybom 2009). Bourke et al. (2017) beschreiben für tetraploide Rosen eine segmentale allotetraploide Vererbung, wobei die Autoren nicht vorhersagen können, ob dies auf die gesamte Gattung zutrifft oder spezifisch für die verwendete tetraploide Kreuzungspopulation von *Rosa hybrida* ist. Das meiotische Kreuzungsverhalten variierte zwischen den untersuchten Genotypen und Chromosomen und könnte auch innerhalb der chromosomalen Arme unterschiedlich sein (Bourke et al. 2017). Generell wird von einer tetrasomen Vererbung bei *R. hybrida* ausgegangen (Gar et al. 2011) und Bourke et al. (2017) konnten dies auch als anwendbar für die Berechnung genetischer Karten bestätigen. Neben den Analysen von Bourke et al. (2017) wurden noch weitere Kartierungen in tetraploiden Rosenpopulationen durchgeführt (Gar et al. 2011, Koning-Boucoiran et al. 2012, Vukosavljev et al. 2016, Yu et al. 2014a) sowie integrierte Konsensus-Kartierungen im diploiden Hintergrund vorgenommen (Spiller et al. 2011, Yan et al. 2005).

## 1.2 Der Echte Mehltau an Rosen

Wie alle Pflanzen, sind Rosen einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt, die ihre Kultivierung im Freiland und Gewächshaus erschweren. Neben dem Sternrußtau (*Diplocarpon rosae*), welcher besonders im Freiland Schäden hervorruft, dem Falschen Mehltau (*Peronospora sparsa*), Botrytis (*Botrytis spp.*) und Rost (*Phragmidium mucronatum*), gehört der Echte Mehltau, hervorgerufen durch *Podosphaera pannosa* (Wallr.: Fr.) de Bary, zu den am weitesten verbreiteten und schwerwiegendsten Rosenkrankheiten, die insbesondere im Gewächshaus hohe Schäden verursacht (Horst und Cloyd 2007, Leus et al. 2006, Noack 2003).

Der Echte Mehltau ist eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten im Pflanzenreich – mehr als 10.000 Pflanzenarten können von den mehr als 400 Arten von Mehltapilzen befallen werden – mit hoher wirtschaftlicher Bedeutung nicht nur im Rosenanbau (Agrios 1997, Glawe 2008, Takamatsu 2004). Die obligat biotrophen Ascomyceten aus der Ordnung der *Erysiphales* sind leicht durch ihr weißes bis graues epiphytisches Myzelwachstum und Konidienträger auf der Blattoberseite befallener Rosen zu erkennen (Linde und Shishkoff 2003, Wheeler 1978). Nach dem Auskeimen der Konidie oder Ascospore, bildet sich nach wenigen Stunden ein Appressorium am Keimschlauch und die Kutikula und Zellwand der Mesophyllzelle wird penetriert, ohne dass jedoch die Zellmembran durchbrochen wird (Glawe 2008, Horst und Cloyd 2007, Hückelhoven und Panstruga 2011, Kuhn et al. 2016, Zhang et al. 2005). Die Ausbildung von Haustorien kann bereits einen Tag nach Beginn der Infektion beobachtet werden, die nicht nur die Nährstoff- und Wasserversorgung des Pilzes und so das

Wachstum von vegetativen Hyphen sicherstellen, sondern auch als Oberfläche zum Austausch von Signalmolekülen dienen (Glawe 2008, Linde und Shishkoff 2003, Wheeler 1978). Bei erfolgreicher Infektion können unter optimalen Bedingungen nach 72 Stunden reife Konidienträger beobachtet werden (Horst und Cloyd 2007, Wheeler 1978). Konidien werden passiv, meist mittels Wind übertragen, und können sich somit schnell in einem Bestand ausbreiten (Butt 1978, Grove 1998, Linde und Shishkoff 2003). Die optimalen Bedingungen für die Keimung von Konidien herrschen bei hoher relativer Luftfeuchte (jedoch ohne freies Wasser) und Temperaturen um 22°C (Butt 1978, Horst und Cloyd 2007, Xu 1999). Diese Bedingungen sind in Gewächshäusern zur Schnittrosenproduktion das ganze Jahr anzutreffen, was den hohen Befallsdruck durch *P. pannosa* erklärt. Im Freiland kann *P. pannosa* in Form von Myzel in dormanten Knospen oder auch nach sexueller Reproduktion in Form von gebildeten Kleistothecien überwintern, welche im Frühjahr reife Ascosporen für eine erneute Infektion entlassen (Agrios 1997, Glawe 2008, Horst und Cloyd 2007, Kuhn et al. 2016). Letzteres stellt jedoch eher die Ausnahme dar und spielt insbesondere im Gewächshaus eine zu vernachlässigende Rolle, da hier aufgrund der ganzjährlichen Produktion keine Überwinterungsstrategien notwendig sind. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die – wenn auch unregelmäßig – auftretende sexuelle Reproduktion zur Erhöhung der genetischen Vielfalt von *P. pannosa* beiträgt (Linde und Shishkoff 2003). Die genetische Diversität innerhalb der Population von *P. pannosa* ist mitunter sehr hoch und die Ausbildung von Rassen ist stark ausgeprägt – bislang wurden 15 unterschiedliche Rassen charakterisiert (Leus et al. 2006, Linde und Debener 2003, Wolfe und McDermott 1994).

Durch Echten Mehltau befallene Rosen weisen oftmals ein reduziertes Wachstum mit verminderter Blütenqualität und Blütenzahl auf, was neben dem offensichtlichen Befall durch Myzel- und Konidienträger-Wachstum an Blättern, Stängeln und Blüten zu einem reduzierten ästhetischen Wert führt und so die Verkaufsfähigkeit stark beeinträchtigt (Horst und Cloyd 2007, Wheeler 1978)

### **1.3 Resistenzzüchtung und Resistenzmechanismen in Rosen**

Züchtungsbemühungen an Rosen konzentrierten sich lange Zeit auf phänotypische Charakteristika wie Blütenfarbe und Blütenqualität, die Resistenzzüchtung spielte eher eine untergeordnete Rolle (Dewitte et al. 2007, Gudin 2003). Dieser Trend hat sich jedoch innerhalb der letzten Dekaden gewandelt. Dies kann mit der Nachfrage nach nachhaltig produzierten Gütern und einem gesteigerten Umweltbewusstsein der Verbraucher, aber auch durch höhere Auflagen und Kosten für den Fungizid-Einsatz und somit einer potentiellen Kostenreduktion

erklärt werden (Debener und Linde 2009, Gudin 2003, Yan 2005, Zlesak 2007). Die Kontrolle des Echten Mehltaus erfolgt unter Glas hauptsächlich durch den Einsatz von Fungiziden und elementarer Schwefel, wobei die Applikation bei hohem Befallsdruck wöchentlich oder noch öfter durchgeführt werden muss (Agrios 1997, Horst und Cloyd 2007, Yan et al. 2006). Dieser hohe Einsatz birgt das Risiko von Resistenzbildungen und somit einer möglichen Verknappung an zugelassenen und effektiven Wirkstoffen zur Bekämpfung des Erregers. Die Züchtung resistenter Sorten stellt also eine nachhaltigere und umweltschonende Alternative dar, wobei auch hier besonders in Monokulturen ein integriertes Resistenzmanagement notwendig ist. Die Züchtung resistenter oder weniger krankheitsanfälliger Sorten kann zum einen durch die Etablierung von monogenen, vertikalen Resistenzenerfolgen, welche in der Regel rassenspezifisch sind, oder durch die Etablierung von polygenen, horizontalen Resistenzen, welche sich durch ein breites Wirkungsspektrum gegen Rassen und einer in der Regel höheren Beständigkeit auszeichnen. Ein alternatives System dazu stellt die Wiederherstellung der Nichtwirts-Resistenz dar (zusammengefasst in Hammond-Kosack und Parker 2003).

### **1.3.1 Monogene Resistenzen**

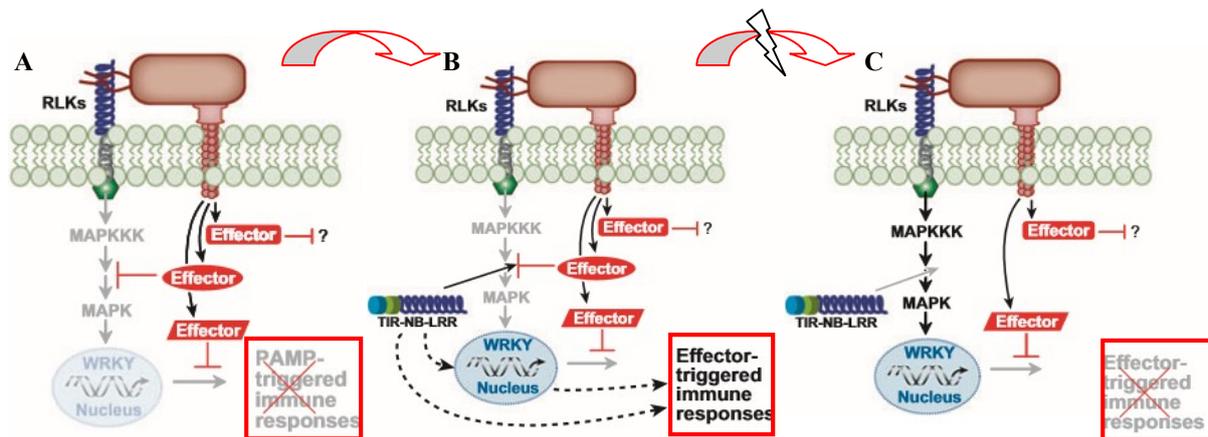
Monogene Resistenzen zeichnen sich durch einen dominanten und rassenspezifischen Charakter aus und folgen dem Gen-für-Gen Modell (Flor 1971). Vereinfacht gesagt erkennen Resistenz-Proteine (R) des Wirts korrespondierende Avirulenz-Proteine (Avr), auch Effektoren genannt, des Pathogens und lösen so eine kaskadenartige Resistenzreaktion aus (Bent und Mackey 2007, Dangl und Jones 2001, Flor 1971, Maheshwari 2012). Effektoren bewirken die Unterdrückung der basalen Immunabwehr der Zellen und dienen somit der Virulenz des Pathogens. Liegt ein R Proteine in der Zelle vor, welches den Effektor erkennt, so wirkt dieser als Avirulenz-Faktor in der Resistenzreaktion (Bent und Mackey 2007). Diese Form der Entwicklung von Anfälligkeit und Resistenz wird auch als ETI (*effector-triggered immune response*) bezeichnet und ist im Modell in Abbildung 1 dargestellt. Die am häufigsten vertretene Klasse von R Genen kodieren für intrazellulär lokalisierte NB-LRR (*nucleotide binding – leucine-rich repeats*) Proteine. NB-LRR Proteine haben einen variablen N-Terminus, der häufig aus einer CC (*coiled coil*) oder TIR (*Toll and Interleukin-1 receptor*) Domäne besteht. Weniger häufig vertreten sind Proteine der Klasse der Serin/Threonin Kinasen und extrazellulärer LRR Domäne (eLRR) (Bent und Mackey 2007, Hammond-Kosack und Parker 2003). Die LRR Domänen weisen eine hohe Variabilität auf und stellen die Orte der Pathogen Erkennung mit Bindspezifitäten für Effektoren dar (Bent und Mackey 2007, Dangl und Jones 2001).

Die Erkennung des Effektors – entweder direkt oder indirekt – durch R Proteine bewirkt in den meisten Fällen eine schnelle hypersensitive Reaktion (HR) der Zelle, es können aber auch die Produktion antimikrobieller Verbindungen und Änderungen der Gewebestruktur ausgelöst werden (McDonald und Linde 2002, Narayanasamy 2008). Durch eine HR wird die Besiedlung des Wirtes durch biotrophe Pilze, wie *P. pannosa*, unterbunden, in dem sich die befallene Zelle durch einen programmierten Zelltod abtötet, welcher einem aktiven, genetischem Programm folgt und somit die Resistenz verursacht (Dangl et al. 1996, Lucas 1998, Mur et al. 2008, Shirasu und Schulze-Lefert 2000, Thordal-Christensen et al. 1997). Die HR wird durch eine massive Akkumulation von ROS (*reactive oxygen species*) wie  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  und  $HO_2^\bullet$  ausgelöst und kann sich auf eine einzelne Zelle beschränken, oder sich auf mehrere Zellen in direkter Nachbarschaft zur befallenen Zelle ausweiten (Agrios 1997, Dangl et al. 1996, Thordal-Christensen et al. 1997). Weitere Verbindungen, die in der Pathogenabwehr mittels HR beteiligt sind, sind unter anderem Stickstoffmonoxid, Kalzium und Salicylsäure (Dangl et al. 1996, Mur et al. 2008, Shirasu und Schulze-Lefert 2000).

Für Rosen konnten rassenspezifische Resistenzen gegen *P. pannosa* beschrieben werden (Leus et al. 2006, Linde und Debener 2003, Linde et al. 2004). In diesen, aber auch in seltenen Fällen in kompatiblen Systemen, konnte das Auftreten von HR beobachtet werden. Eine HR die mehrere Zellen betrifft und als dunkle, nekrotische Läsionen im Gewebe makroskopisch zu erkennen ist, tritt dabei erst nach einem begrenztem Myzelwachstum samt Haustorienbildung auf (Dewitte et al. 2007, Hajlaoui et al. 1991, Linde und Shishkoff 2003, Moghaddam et al. 2013). Bislang wurden in Rosen zwei dominante R Gene beschrieben und kartiert: *Rdr1* gegen Sternrußtau und *Rpp1* gegen Echten Mehltau (Biber et al. 2010, Linde und Debener 2003, Linde et al. 2004, Malek und Debener 1998, Malek et al. 2000). Der Locus von *Rdr1* wurde sequenziert und insgesamt konnten neun nah verwandte TIR-NB-LRR Kandidaten-Gene identifiziert und funktionell charakterisiert werden (Terefe-Ayana et al. 2011). *Rpp1* wurde in der diploiden Kreuzungspopulation 97/9 identifiziert, in der eine 1:1 Spaltung in der Resistenz gegen Rasse 9 von *P. pannosa* beobachtet werden konnte (Linde und Debener 2003). Linde et al. (2004) konnten *Rpp1* auf der Kopplungsgruppe A3 der Karte von Debener und Mattiesch (1999) lokalisieren, während *Rdr1* auf der Kopplungsgruppe B1 lokalisiert ist.

Monogene Resistenzen zeichnen sich, wie bereits beschrieben, durch ihre Rassenspezifität aus. Hierin ist auch ihr Nachteil für das Resistenzmanagement begründet. Zum einen kann sich die Zusammensetzung der Population von *P. pannosa* zwischen zwei Anbaugebieten deutlich unterscheiden und auch innerhalb der Population eine hohe Diversität vorliegen, wo-

durch eine monogene, rassenspezifische Resistenz nur einen begrenzten Schutz bietet (Linde und Debener 2003, McDonald und Linde 2002, Noack 2003, Wolfe und McDermott 1994). Zum anderen können monogene Resistenzen innerhalb kürzester Zeit durch das Aufkommen neuer Rassen (durch Mutation und Rekombination in den Avr-Proteinen) gebrochen werden (Linde et al. 2006, Malek und Debener 1998, Parlevliet 2002, Strange 2003, Zlesak 2007). Dieser Wettlauf in der ETI zwischen Anfälligkeit und Resistenz ist schematisch Abbildung 1 zu entnehmen.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der ETI.**

Durch die Sekretion von Effektoren wird die basale Immunität, auch Nichtwirts-Resistenz, des Wirts unterdrückt und es kommt zur Pathogenese (A). Durch die Expression des korrespondierenden R-Proteins (hier: TIR-NB-LRR) wird die Funktion des Effektor geblockt und es kommt zur Ausprägung der ETI (*effector-triggered immune response*) (B). Diese Resistenz kann wiederum durch die Mutation des Effektors umgangen werden, so dass das R-Protein nicht mehr spezifisch für diesen Effektor ist und die Wirtszelle wieder anfällig für das Pathogen wird (C). RLKs: *receptor-like kinases*, MAPK: *mitogen-activated protein kinases*, Kinase, NB (Nucleotide-binding), TIR (Toll-interleukin 1 Rezeptor), LRR (*Leucine-rich repeats*). Quelle: Bent und Mackey (2007), leicht verändert.

NB (Nucleotide-binding), TIR (Toll-interleukin 1 Rezeptor), LRR (*Leucine-rich repeats*). Quelle: Bent und Mackey (2007), leicht verändert.

### 1.3.2 Polygene Resistenzen

Viele pflanzenspezifische Merkmale – wie Größe, Ertrag und Toleranz/Resistenz gegen Krankheiten – werden nicht von einem einzelnen Gen, sondern durch das Zusammenspiel vieler Gene kontrolliert. Diese polygenen Merkmale werden auch als quantitative Merkmale bezeichnet. Regionen im Genom, wo diese Merkmale lokalisiert werden konnten, werden als QTLs (*quantitative trait loci*) angesprochen. Durch QTLs kontrollierte Resistenzen werden als horizontale Resistenzen bezeichnet. Der Beitrag einzelner QTLs zur Resistenz variiert, kann mitunter marginal sein und wirkt additiv (Bent und Mackey 2007). Die Identifizierung von QTLs im Genom mittels QTL Analysen von Kopplungskarten wird als QTL Kartierung bezeichnet und zur Identifizierung von Markern für die Züchtung eingesetzt (Collard et al. 2005, Narayanasamy 2008, Poland et al. 2009, Young 1996). Durch QTLs kontrollierte, polygene Resistenzen oder auch Toleranzen wirken rassenunspezifisch, sind unvollständig, in

ihrer Ausprägung stark von der Umwelt beeinflusst und in der Regel wesentlich beständiger als monogene Resistenzen (Agrios 1997, Bittel und Robatzek 2007, Parlevliet 2002, Zlesak 2007). Das Brechen der Resistenz des Wirtes ist bei polygenen Resistenzen aufgrund der Beteiligung mehrerer Gene wesentlich komplexer und der Selektionsdruck auf bestimmte Mutationen zur Resistenz-Brechung deutlich reduziert (Parlevliet 2002, Zlesak 2007). Die Kombination von QTLs innerhalb der Population kann also zu einer dauerhaften und breit wirksamen Resistenz des Zuchtmaterials beitragen (Strange 2003).

Polygene und unvollständige Resistenzen in Rosen gegen den Echten Mehltau sind sortenspezifisch und Teil der Sortenbeschreibung von Züchtern (Dewitte et al. 2007, Leus et al. 2006, Linde und Debener 2003, Linde et al. 2006). In Rosen konnte im Zusammenhang mit unvollständigen Resistenzen das Auftreten von Papillen unterhalb des Penetrationskeils von ausgekeimten Konidien beobachtet werden (Linde und Shishkoff 2003). Auch Dewitte et al. (2007) beschreiben in ihren Untersuchungen zelluläre Abwehrreaktionen, die durch das Auftreten von Papillen an der Penetrationsstelle zu einer Unterbindung der Pilzentwicklung führten. Bei der strukturellen Abwehr von Erregern des Echten Mehltaus durch Papillen, kommt es unterhalb des Appressoriums an der Zellinnenseite zu Ablagerungen von Zellwandmaterial, welches als Barriere zur Verhinderung der Zellpenetration dienen kann (Agrios 1997, Thordal-Christensen et al. 1997). Die Ablagerungen an der Zellwand bestehen hauptsächlich aus Kallose ( $\beta$ -1,3 verknüpftes Glukan), es werden aber auch weitere Bestandteile wie Proteine, Lignin, Suberin, Calcium und Phenole gebunden (Linde und Shishkoff 2003, Lucas 1998, Strange 2003).

In Rosen wurde beobachtet, dass innerhalb von 36 Stunden nach dem ersten Kontakt mit *P. pannosa* nur nach erfolgreicher Papillenbildung die Entwicklung des Pilzes unterbunden werden konnte (Dewitte et al. 2007). Dies zeigt, dass eine Papillenbildung *per se* nicht zur Resistenz führt, sondern noch weitere Faktoren wie auch das Timing bei der Abwehr eine wichtige Rolle spielen. In Papillen, welche erfolgreich die Besiedlung des eindringenden Pilzes unterbunden haben, konnte  $H_2O_2$  detektiert werden (Hückelhoven et al. 1999). Dies trägt neben seinem direkten toxischen Effekt auf den Pilz in der Abwehrreaktion auch zur oxidativen Vernetzung von Proteinen mit der Zellwand und somit zur Verstärkung der strukturellen Barriere bei (Shirasu und Schulze-Lefert 2000, Thordal-Christensen et al. 1997). Bei erfolgreicher Pathogenabwehr konnten des Weiteren antimikrobielle Stoffe wie Peroxidasen und phenolische Verbindungen nachgewiesen werden (Hückelhoven et al. 1999). Neben der Pathogenabwehr gibt es auch Berichte über eine mögliche Funktion von Papillen in der Pathogenese, weshalb ihre tatsächliche Funktion umstritten ist (Lucas 1998, Schulze-Lefert 2004).

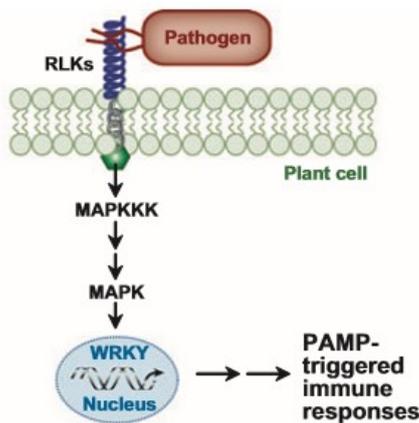
QTL Kartierungen in Rosen für phänotypische Merkmale wie Pflanzenarchitektur, Blühzeitpunkt und -verhalten, Anzahl der Petalen, Blütenfarbe aber auch Stomatafunktion und ihr Einfluss auf die Haltbarkeit von Schnittrosen sind vielfach beschrieben worden (Carvalho et al. 2015, Dugo et al. 2005, Gitonga et al. 2016, Henz et al. 2015, Kawamura et al. 2015, Roman et al. 2015). Kartierungen von QTL-Regionen für Resistenzen gegen Pathogene sind hingegen seltener. Linde et al. (2006) führten QTL Analysen zur Resistenz gegen den Echten Mehltau in der diploiden Population 97/7 in verschiedenen Jahren und unter drei verschiedenen Bedingungen durch. Insgesamt konnten so 28 signifikante QTLs für die Mehlaresistenz in Rosen identifiziert werden. Dabei gingen die Autoren davon aus, aufgrund der Populationsgröße (270 Individuen) schwächere QTLs nicht detektiert zu haben. In der wesentlich kleineren diploiden Kreuzungspopulation von 90 Individuen, die künstlichen mit zwei Pathotypen inokuliert wurde, konnten Moghaddam et al. (2012) nur neun QTLs detektieren. Diese deckten sich zum Teil mit den von Linde et al. (2006) beschriebenen QTLs.

Die Identifizierung von QTLs kann dazu beitragen, den Anteil an Resistenzgenen innerhalb einer Population durch gezielte Züchtung zu erhöhen und somit auch die allgemeine Widerstandsfähigkeit im Zuchtmaterial zu steigern. Allerdings stellt das Einkreuzen von mehreren QTLs in Hinblick auf die Genetik der Rose eine große Herausforderung dar. Durch den stark heterozygoten und zumeist polyploiden Charakter ist die Kombination mehrerer QTLs in Rosen äußerst langwierig und komplex. Hinzukommt, dass die Wirkung der QTLs bei verschiedenen genetischen Hintergründen und unterschiedlichen Umweltbedingungen stark variieren kann.

### 1.3.3 Nichtwirts-Resistenzen

Pflanzen sind einer Vielzahl von Mikroorganismen und Viren ausgesetzt, aber nur wenige stellen eine Bedrohung als Pathogen dar – Pflanzen besitzen ihnen gegenüber eine grundlegende Nichtwirts-Resistenz (*non-host resistance*). Die Abwehr der Zelle wird durch die Erkennung von MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) durch Rezeptoren eingeleitet. MAMPs fungieren meist als wichtige Schlüsselkomponenten des Mikroorganismus, ohne jedoch an der eigentlichen Pathogenität beteiligt zu sein (Bent und Mackey 2007, Pavan et al. 2010, Thordal-Christensen 2003). Hierdurch sind sie zumeist konserviert und sehr stabil, da ihr Verlust eine Beeinträchtigung der Fitness bedeuten würde. Geläufige MAMPs sind zum Beispiel Chitin bei Pilzen oder Flagellin bei Bakterien (Hayashi et al. 2001, Nürnberger und Lipka 2005). Aber auch abgebaute/zersetzte Bestandteile der eigenen Zellwand können als Abwehreffektoren fungieren beziehungsweise erkannt werden (Bent und Mackey 2007). Re-

zeptoren, die die Erkennung der MAMPs und die dadurch ausgelöste Abwehrreaktion bewirken, sind Transmembran-Proteine, welche sich durch eine extrazelluläre LRR-Domäne und eine intrazelluläre Kinase-Domäne auszeichnen (Bent und Mackey 2007, Bittel und Robatzek 2007, Hückelhoven 2005). Nachgeschaltet an die Erkennung der MAMPs werden MAP-Kinase Kaskaden (*mitogen-activated protein*) in der Zelle aktiviert, die neben Botenstoffen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die Immunantwort der Zelle auslösen (Asai et al. 2002, Bittel und Robatzek 2007, He et al. 2006, Nürnberger und Lipka 2005). Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung dieses Modells der Nichtwirts-Resistenz, die auch als PTI (*PAMP [pathogen-associated molecular patterns] triggered immune response*) bezeichnet wird. Um die Zelle erfolgreich zu besiedeln, muss das Pathogen Effektoren zur Unterdrückung der PTI sekretieren (Eichmann und Hückelhoven 2008, Nürnberger und Lipka 2005). Dieses Schema wurde schon in Kapitel 1.3.1 eingeführt und stellt komplementär zur PTI die ETI dar (siehe auch Abbildung 1 in Kapitel 1.3.1). Die PTI kann von Mikroorganismen umgangen werden, in dem sie mittels Effektoren Proteine der Pflanzenzelle korrumpieren. Solche Anfälligkeitsfaktoren ermöglichen erst die Pathogenese und die Proliferation des Mikroorganismus (Pavan et al. 2010). Diese für die Pathogenese des Pathogens essentiellen Faktoren werden von Anfälligkeits-Genen, oder auch S-Genen (S für *susceptibility*), kodiert und ein Verlust (durch z.B. Mutation oder Kreuzung) führt in der Regel zu einer rezessiv vererbten, breiten Resistenz (Pavan et al. 2010). Der Verlust des S-Gens stellt somit die Nichtwirts-Resistenz wieder her, da das Pathogen außer Stande ist, die Wirtszelle zu besiedeln. Als Beispiel für die Wiederherstellung der Nichtwirts-Resistenz durch den Verlust bzw. Knock-out des S-Gens stellt die *mlo*-vermittelte Resistenz das am besten untersuchte Beispiel dar, welches zur Züchtung (klassisch wie auch mit den neuesten biotechnologischen Methoden) von mehltreueren Sorten in mehreren Pflanzen geführt hat.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der PTI.**

Werden MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) oder auch PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) von Rezeptoren, auch RLKs (*receptor-like kinases*), der Pflanzenzelle erkannt, aktiviert dies MAP-Kinase Kaskaden (MAPK, *mitogen-activated protein*), welche die PTI auslösen (*PAMP-triggered immune response*).  Kinase,  LRR (*Leucine-rich repeats*). Quelle: Bent und Mackey 2007.

#### 1.4 *mlo*-vermittelte Resistenz gegen den Echten Mehltau

*MLO* Gene (*mildew resistance locus O*) sind in Multi-Gen-Familien organisiert, bei denen der Verlust bzw. Knock-out bestimmter Vertreter zu einer breiten und dauerhaften Resistenz gegen den Echten Mehltau führt. Aufgrund ihres monogenen Charakters sowie breitem und rasenunspezifischem Wirkspektrum grenzt sich diese Art der Resistenz von den oben beschriebenen monogenen und polygenen Resistenzen ab.

Erstmals beschrieben wurde die *mlo*-vermittelte Resistenz in Gerste, bei welcher sie im Feld seit mehreren Dekaden erfolgreich zur Mehltau-Resistenz verwendet wird – rund die Hälfte aller in Europa angebauten Sorten der Sommergerste tragen die *mlo*-vermittelte Resistenz (Jorgensen 1992, McGrann et al. 2014). Die ursprünglich in einer äthiopischen Landrasse identifizierte, natürliche Variante *mlo-11*, ist, neben künstlich induzierten Knock-out-Varianten, eine der am häufigsten im Feld verwendeten (Jorgensen 1992, Piffanelli et al. 2004, Reinstädler et al. 2010). Außer in Gerste wurde der Knock-out der *MLO* Gene zur Induktion der Mehltau-Resistenz in diverse Pflanzenarten beschrieben, unter anderen in *A. thaliana*, Tomate, Erbse, Weizen, Tabak, Apfel, Wein, Petunie und Gurke (Acevedo-Garcia et al. 2017, Appiano et al. 2015, Bai et al. 2008, Berg et al. 2015, Pavan et al. 2011, Humphry et al. 2011, Jiang et al. 2016, Pessina et al. 2016a, Pessina et al. 2016b, Wang et al. 2014, Zheng et al. 2016). In Gerste und Weizen reicht der Knock-out der Allele eines *MLO* Gens für eine vollständige Resistenz (Büschges et al. 1997, Jorgensen 1992, Wang et al. 2014). In *A. thaliana* ist hingegen der Knock-out von drei *MLO* Genen (*AtMLO2/6/12*) notwendig (Consonni et al. 2006). Auch in anderen Gattungen wie Apfel, Tomate und Wein deuten Untersuchungen da-

rauf hin, dass mehr als ein *MLO* Gen an der Vermittlung der Anfälligkeit beteiligt ist (Pessina et al. 2016a, Pessina et al. 2017, Zheng et al. 2016).

*MLO* Gene weisen, je nach Pflanzenart, 10 bis 20 Vertreter auf (Acevedo-Garcia et al. 2014). Die kodierten *MLO* Proteine sind mit sieben Transmembrandomänen, mit dem N-Terminus extrazellulär und dem C-Terminus intrazellulär, in der Membran lokalisiert (Devoto et al. 2003). Der C-Terminus weist jeweils einen hohen Grad an Variabilität auf (Devoto et al. 1999, Devoto et al. 2003). Kusch et al. (2016) schlussfolgern daraus, dass er intrinsisch unstrukturiert und somit ohne bestimmte Sekundärstrukturen in der Zelle vorliegt. Auch die extrazellulär vorliegenden Bereiche weisen einen hohen Grad an Variabilität auf, wobei insgesamt vier konservierte Cysteine beschrieben wurden, denen eine Rolle in der Bindung von Liganden und/oder der Stabilisierung der Faltung durch Ausbildung von Disulfidbrücken zugeschrieben wird (Devoto et al. 1999, Devoto et al. 2003, Elliott et al. 2005). Im Gegensatz dazu weisen die Transmembrandomänen und intrazellulären Schlaufen (*loops*) des Proteins stark konservierte Bereiche auf, die zum Teil essentiell für die Funktionalität des Proteins sind (Devoto et al. 1999, Reinstädler et al. 2010). Die phylogenetische Einordnung der *MLO*-Proteine ergab eine Unterteilung in vier bis acht Kladen (Chen et al. 2006, Devoto et al. 2003, Feechan et al. 2008, Deshmukh et al. 2014, Pessina et al. 2014), wobei die Einteilung in insgesamt sieben phylogenetische Kladen die am ehesten zutreffende scheint (Acevedo-Garcia et al. 2014, Jiwan et al. 2013, Kusch et al. 2016, Zhou et al. 2013). *MLO* Vertreter, die an der Anfälligkeitsvermittlung gegenüber dem Echten Mehltau beteiligt sind, gruppieren sich in die Kladen IV (Monokotyle) und V (Dikotyle) (Acevedo-Garcia et al. 2014, Bai et al. 2008, Humphry et al. 2011, Panstruga 2005a, Pavan et al. 2011). Alle Vertreter dieser Klade haben gemein, dass sie ein Tetrapeptid-Motiv (D/E-F-S/T-F) im C-Terminus tragen, welches als diagnostisch für die Beteiligung der Proteine in der Mehltau-Reaktion beschrieben wurde (Panstruga 2005a).

Bis heute ist die genaue biochemische Funktion der *MLO* Proteine noch weitestgehend ungeklärt (Acevedo-Garcia et al. 2014). Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass sie eine gleiche oder ähnlich Funktionsweise wie diese aufweisen (Kim et al. 2002, Chen et al. 2009, Lorek et al. 2013). Als einzige funktionelle Domäne konnte eine Calmodulin-binde Domäne im C-Terminus identifiziert werden, deren Verlust zu einer Reduktion der Funktionalität in der Anfälligkeitsvermittlung gegenüber dem Echten Mehltau führt (Kim et al. 2002). Untersuchungen zur Evolution der *MLO* Proteine ergaben, dass sowohl die erste extrazelluläre Schlaufe als auch der C-Terminus einer starken positiven Selektion unterliegen und somit mögliche Stellen

der Protein-Protein-Interaktion darstellen (Iovieno et al. 2015). Es konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere die zweite und dritte im Cytoplasma lokalisierte Schlaufe essentiell für die Vermittlung der Mehltau-Anfälligkeit sind, da Punktmutationen in diesen Bereichen häufig den Funktionsverlust und somit die *mlo*-vermittelte Resistenz verursachen (Piffanelli et al. 2002, Reinstädler et al. 2010). Kusch et al. (2016) konnten den MLO Proteinen in Analysen zur Gen-Ontologie (GO Analysen) eine Funktion im Transmembran-Transport zuschreiben. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass der C-Terminus eine funktionell konservierte Funktion in der Bindung von Ziel-Proteinen haben könnte und daher MLO Proteine entweder als Transporter und/oder Regulatoren von molekularen Prozessen fungieren könnten (Kusch et al. 2016).

Frühere Untersuchungen zur Funktion der MLO Proteine führten zur Identifikation von *Syntaxin* Genen aus der Familie der SNARE-Proteine (*Ror2* aus Gerste und *PEN1* aus *A. thaliana*), welche die Exocytose von Vesikeln ermöglichen und für die Aufrechterhaltung der *mlo*-vermittelten Resistenz notwendig sind (Collins et al. 2003, Kwon et al. 2008, Nelson und Cox 2009, Freialdenhoven et al. 1996). *Ror2* und auch *PEN1* scheinen hierbei aktiv an der Sekretion von Vesikeln und der Akkumulation von  $H_2O_2$  in gebildeten Papillen am Ort der Penetration des Pilzes und somit essentiell an der Abwehr des Pathogens beteiligt zu sein (Assaad et al. 2004, Hückelhoven et al. 2000). Bhat et al. (2005) konnten in Gerste den direkten Kontakt von *Ror2* und HvMLO nachweisen, was die Schlussfolgerungen von Kusch et al. (2016) unterstützt, dass MLO Proteine beim Transport von Stoffen über die Membran beteiligt sind. Zudem scheinen MLO Proteine auch den Vesikeltransport zur Membran durch Korrumpierung der Actin Polymerisation negativ zu beeinflussen (Opalski et al. 2005). Auf Grund dieser vielfältigen Analysen wird vermutet, dass Echte Mehltau Pilze durch die Korruption der MLO Proteine die SNARE-Protein abhängigen und Vesikel assoziierten Abwehrmechanismen unterdrücken, um die Zelle erfolgreich zu besiedeln (Hückelhoven und Panstruga 2011, Panstruga 2005b). Die Beteiligung der *MLO* Gene bei der Abwehrreaktion der Zellen wird auch durch die Ko-Expression mit Proteinen der Pflanzenabwehr wie RLKs (siehe auch Kapitel 1.3.3) und dem Nachweis der funktionalen Verbindung dieser mit MLO Proteinen unterstützt (Humphry et al. 2010, Kessler et al. 2010, Lalonde et al. 2010). Des Weiteren wurde in Gerste die Akkumulation von cysteinreichen Rezeptor-ähnlichen Kinasen (CLKs) ausschließlich durch funktionale MLOs, nicht aber bei Defekt-Mutanten nachgewiesen, weshalb eine Funktion des MLO Proteins in der Unterdrückung der basalen Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau vermutet wird (Rayapuram et al. 2012). Die negative transkriptionelle Regulation von Genen der Pathogenabwehr durch MLOs konnte zudem auch in

*A. thaliana* nachgewiesen werden (Lorek 2012). Ein Zusammenhang mit Signalmolekülen, der oftmals für monogene und polygene Resistenzen beschrieben wurde, konnte für die *mlo*-vermittelte Resistenz jedoch nicht festgestellt werden. Sie scheint weder von Ethylen, Salicylsäure oder Jasmonsäure abhängig zu sein (Consonni et al. 2006, Mysore und Ryu 2004). Durch den Knock-out der *MLO* Gene sind nicht nur spezifische Reaktionen mit dem Erreger des Echten Mehltaus betroffen. Dies zeigen Untersuchungen an Gerste und *A. thaliana*, bei denen nachgewiesen wurde, dass *mlo*-defiziente Pflanzen zugleich resistenter gegen den necrotrophen Erreger *Botrytis cinerea* sind, gleichzeitig aber anfälliger gegenüber anderen necrotrophen, wie auch hemibiotrophen Erregern (Consonni et al. 2006, Jarosch et al. 1999). Sowohl in *A. thaliana* als auch in Gerste konnten pleiotrope Effekte in Form von spontaner Bildung von Papillen sowie dem Auftreten von chlorotischen und/oder nekrotischen Blättern bei *mlo*-Defektmutanten festgestellt werden (Consonni et al. 2006, Peterhänsel et al. 1997, Piffanelli et al. 2002, Wolter et al. 1993). Hierbei scheinen die Vorgänge der Blattseneszenz durch den *MLO*-Knock-out beschleunigt worden zu sein (Piffanelli et al. 2002). In anderen Arten, wie zum Beispiel Tomate und Erbse, konnten hingegen diese Effekte nicht beobachtet werden. Auch bei Untersuchungen an *mlo*-Weizen wurden keine pleiotropen Effekte beschrieben (Bai et al. 2008, Humphry et al. 2011, Wang et al. 2014). Ob es sich daher um ein spezifisches Phänomen von Gerste und *A. thaliana* handelt oder diese divergierenden Beobachtungen verschiedenen Umweltfaktoren, wie Licht- und Düngebedingungen, geschuldet sind, kann nicht eindeutig bestimmt werden (Bai et al. 2008, Humphry et al. 2011).

Neben den Klade IV und V zugeordneten *MLO* Genen, die in der Mehltau-Anfälligkeit beteiligt sind, konnte für *AtMLO4* und *AtMLO11* eine Funktion in der Thigmomorphogenese der Wurzeln (Klade I) und für *AtMLO7* eine Funktion in der Entwicklung und Hydratisierung des Pollenschlauches (Klade III) beschrieben werden (Acevedo-Garcia et al. 2014, Chen et al. 2009, Kessler et al. 2010). In *A. thaliana* konnte ein diverses und spezifisches Expressionsmuster für die Vertreter der *AtMLO* Genfamilie nachgewiesen werden (Chen et al. 2006). Die Autoren schlussfolgern aus dieser Tatsache, dass die Gene an unterschiedlichen Entwicklungsprozessen beteiligt sind.

In Rosen wurden bislang vier Vertreter der *MLO* Genfamilie identifiziert, die aufgrund ihrer phylogenetischen Einordnung in eine Klade mit den in der Mehltau-Anfälligkeit funktionalen Vertretern von Erbse, Tomate und *A. thaliana* (Klade V) sowie des Vorhandenseins des diagnostischen Tetrapeptidmotivs im C-Terminus, Kandidaten für die Vermittlung der Mehltau-Anfälligkeit sind: *RhMLO1*, *RhMLO2*, *RhMLO3* und *RhMLO4* (Kaufmann et al. 2012). Die Kartierung der vier *RhMLOs* in der diploiden Population 97/7 ergab für *RhMLO1* die Position

auf der Kopplungsgruppe 5 und für *RhMLO2* die Position auf Kopplungsgruppe 3 – bei beiden Loci konnten bislang keine QTLs für die Mehltau-Interaktion bestimmt werden (Kaufmann et al. 2012, Linde et al. 2006). *RhMLO3* und *RhMLO4* konnten gekoppelt auf Kopplungsgruppe 1 lokalisiert werden (Kaufmann et al. 2012). Neben der Nähe zum Locus des *Rdr1* Gens, welches als Resistenzgen gegen den Sternrußtau beschrieben wurde (Biber et al. 2010, Kaufmann et al. 2003), konnten Linde et al. (2006) einen schwachen QTL für die Mehltau-Resistenz in dieser Region nachweisen. Untersuchungen zur Induktion der Expression durch den Erreger des Echten Mehltaus lassen für *RhMLO1* und *RhMLO2* eine mögliche Funktion in der Vermittlung der Anfälligkeit vermuten (Wehmeyer 2012, Qiu et al. 2015b). Des Weiteren weisen erste Silencing-Analysen mittels RNAi auf eine Funktionalität in der Pathogen-Interaktion von *RhMLO1* hin (Qiu et al. 2015a).

## 1.5 Methoden zur gezielten Mutagenese

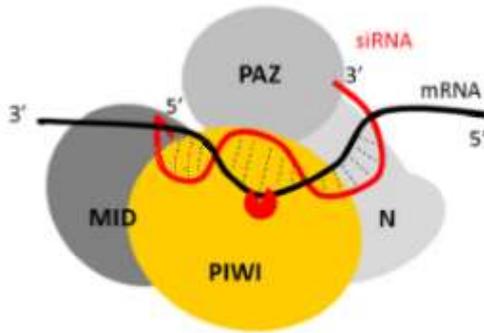
Der Einsatz gentechnischer Methoden an Rosen zur Verbesserung von Eigenschaften wurde schon vielfach in der Literatur beschrieben (Dohm et al. 2002, Firoozabady et al. 1994, Kim et al. 2004, Li et al. 2003, Marchant et al. 1998a, Souq et al. 1996, van der Salm et al. 1997, Vergne et al. 2010). Die Etablierung eines erfolgreichen Transformationsprotokolls mit genügend hohen Transformationseffizienzen stellt hierbei, neben der Etablierung der In-vitro-Kultur, einen wichtigen Schritt dar, wobei die Erfolgsraten stark vom Genotyp abhängen und daher oftmals noch experimentell angepasst werden müssen. Neben Merkmalen zur Optimierung der phänotypischen Qualität von Rosen, wie zum Beispiel zur Erzeugung der „Blauen Rose“ durch die Produktion von Delphinidin (Katsumoto et al. 2007), wurden auch antimikrobielle Gene (z.B. Chitinase) zur Erhöhung der Resistenz gegen Pathogene übertragen (Dohm et al. 2002, Li et al. 2003, Marchant et al. 1998b). Dohm et al. (2002) übertrugen für Pilze toxische (fungizide) Proteine ohne jedoch einen signifikanten Einfluss auf die Erhöhung der Sternrußtau-Resistenz nachweisen zu können. Marchant et al. (1998b) hingegen konnten durch die Übertragung eines *Chitinase* Gens eine Reduktion von 13-43% in der Entwicklung von *D. rosae*, dem Erreger des Sternrußtaus, beschreiben. Die *mlo*-vermittelte Resistenz stellt hier ein vielversprechenderes System zur Generierung von mehltaresistenten Rosen dar. Für die gezielte Mutagenese, entweder zum Knock-down oder Knock-out von Genen, stehen heutzutage mehrere biotechnologische Möglichkeiten zur Verfügung: Zum einen das Silencing von Genen mittels RNA Interferenz (RNAi) und zum anderen Genome Editing Methoden wie TALENs und CRISPR/Cas zum Ausschalten oder Editieren von Genen.

### 1.5.1 RNA Interferenz

Das Ausschalten oder Herunterregulieren eines bekannten Gens zur Untersuchung von dessen Funktion ist die Grundlage der reversen Genetik. In Modellorganismen wie *A. thaliana* wurde dieser Ansatz mittels T-DNA Insertionen oder auch Transposon-Taggings durchgeführt, was zu großen Sammlungen an Null-Mutanten führte, welche für die Analyse von Genfunktionen zur Verfügung stehen (Waterhouse und Helliwell 2003). Diese Ansätze unterliegen jedoch mehreren Nachteilen, die sich insbesondere in polyploiden Pflanzen äußern. Da hier mehrere Kopien eines Gens vorliegen, müssen diese simultan ausgeschaltet werden, um einen möglichen Effekt beobachten zu können. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen ist die Auslösung von RNA Interferenz (RNAi). Vereinfacht gesagt führt hierbei das Vorliegen doppelsträngiger RNA (dsRNA) in der Zelle zum gezielten Abbau komplementärer mRNA. Auf diese Art können – je nach Spezifität der dsRNA – alle Allele eines Gens oder auch mehrere Gene simultan ausgeschaltet bzw. herunter reguliert werden. In Pflanzen wurde dabei ursprünglich von post-transkriptionellem Gen-Silencing (PTGS) und bei Pilzen von Quelling gesprochen. In dieser Arbeit wird der, ursprünglich in tierischen Systemen verwendete, Begriff RNAi für das durch dsRNA induzierte Gen-Silencing verwendet. Der Begriff Gen-Silencing wird hierbei mangels einer adäquaten deutschen Übersetzung genutzt. Beim Gen-Silencing handelt es sich um einen evolutionär konservierten Mechanismus, der zur Verteidigung gegen Viren, virale/parasitäre DNA Elemente wie Transposons sowie zur Regulation zelleigener Entwicklungs-Prozesse dient (Bernstein et al. 2001b, Hannon 2002, Ruiz et al. 1998, Tabara et al. 1999). Im Zusammenhang mit dem RNAi Mechanismus wurde eine große Bandbreite an kleinen RNA Molekülen, unterschiedlich in Ursprung und Funktion in der Gen-Suppression, identifiziert, wie zum Beispiel endogene miRNA (siehe z.B. Brodersen und Voinnet 2006). Im Zusammenhang mit dem hier durch dsRNA induzierten Gen-Silencing, wird jedoch ausschließlich auf siRNAs (*small interfering RNA*) eingegangen, welche von von Transgenen transkribierter dsRNA stammen.

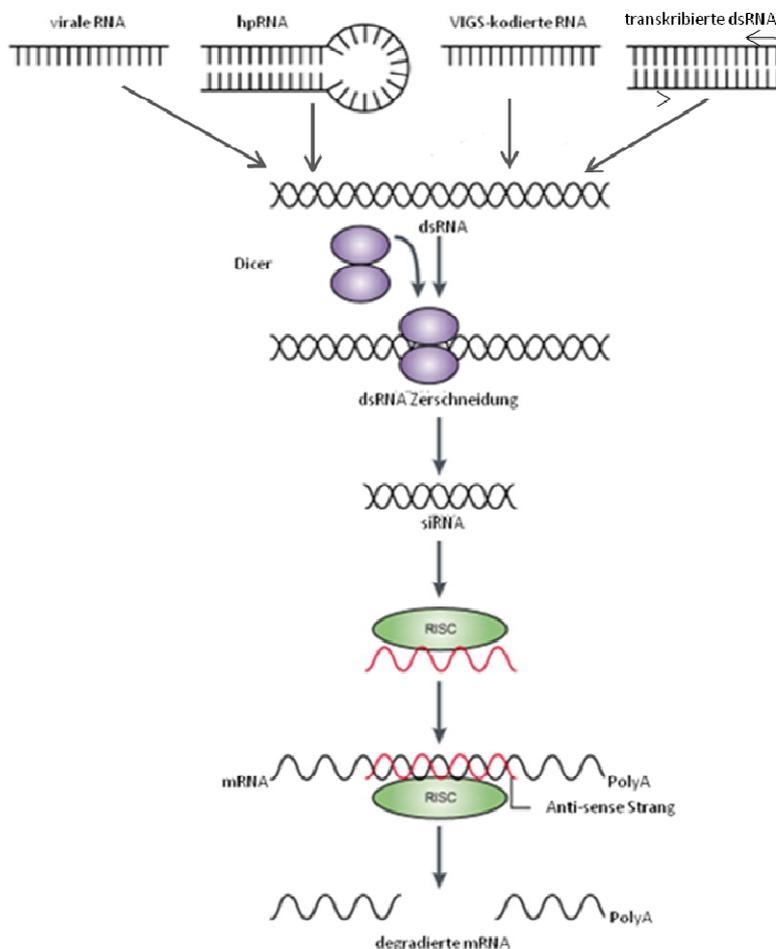
Anfang der 1990er Jahre wurde der RNAi Mechanismus durch Zufall in Petunien entdeckt, als das Einbringen einer zusätzlichen Chalkonesynthase nicht, wie gedacht, zu einer verstärkten Pigmentierung der Blüten, sondern zum Ausbleiben der Pigmentierung und somit zu zum Teil weißen Blüten führte (Napoli et al. 1990). Basierend auf den Ergebnissen von Guo und Kempthues (1995) in *Caenorhabditis elegans*, konnten Fire et al. (1998) den Nachweis erbringen, dass das Einbringen von *sense* und *anti-sense* RNA – also von doppelsträngiger RNA – in Zellen zur Auslösung von hoch effizientem Gen-Silencing führt. Hierauf aufbauend konnten Zamore et al. (2000) und Elbashir et al. (2001) nachweisen, dass dsRNA zur Bildung

von ~ 21 Basenpaaren langer, doppelsträngiger siRNA führt, welche sich durch eine 5'-Phosphorylierung und zwei Nukleotid-Überhänge am 3'-Ende auszeichnen. Verantwortlich für die Erkennung und das Schneiden der langen dsRNA Moleküle in der Zelle ist die ATP-abhängige Nuklease Dicer aus der Familie der RNase III Proteine. Diese weisen neben zwei katalytischen Domänen, ein Helikase- sowie ein PAZ-Motiv und eine C-terminale dsRBD (*double-stranded RNA binding domain*) auf (Bernstein et al. 2001a, Blaszczyk et al. 2001, Elbashir et al. 2001). In Pflanzen konnten vier verschiedene Dicer Proteine identifiziert werden, welche in ihrer Größe sowie der Anzahl der dsRBD Domänen variieren, unterschiedliche Affinitäten aufweisen und ferner unterschiedlich lange siRNA Moleküle produzieren. Die am häufigsten vertretenen Dicer im dsRNA-induzierten Gen-Silencing in Pflanzen sind DCL2/3/4 (*Dicer-like protein*) (zusammengefasst von Paces et al. 2017). Die so entstandenen siRNAs wiederum werden vom multi-Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) gebunden und als Matrize für die Erkennung und das Schneiden komplementärer mRNA herangezogen (Abbildung 4) (Hammond et al. 2000). Die Hauptkomponente des RISC Komplexes stellt ein Protein aus der Familie der Argonauten (*AGO, Argonaute protein*) dar. Die Struktur der Argonauten ist in vier Domänen unterteilt: Die C-terminale PIWI Domäne, die MID Domäne, eine zentrale PAZ Domäne und eine N-terminale Domäne (siehe Abbildung 3, zusammengefasst u.a. von Jinek und Doudna 2009 oder Paces et al. 2017). Die PAZ-Domäne ist für die sequenzunabhängige Bindung des 3'-Endes der siRNA, die MID Domäne für die Verankerung des 5'-Endes der siRNA und die PIWI Domäne, als Zentrum der Nuklease-Aktivität, für das Schneiden der mRNA mittig der Position der siRNA verantwortlich (Song et al. 2004). Der Abbau der mRNA ist transitiv sowohl in 3' → 5' Richtung als auch von 5' → 3' Richtung möglich (Vaistij et al. 2002). Pflanzen besitzen oftmals eine Vielzahl von AGO Homologen (meist mehr als 10), die in drei Klassen unterteilt sind, welche die unterschiedlichen Affinitäten für kleine RNA Moleküle widerspiegeln (Mirzaei et al. 2014, Zhang et al. 2015). Neben diesen oben beschriebenen Komponenten, sind in Pflanzen oftmals RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRP; *RNA-dependent RNA polymerase*) am Gen-Silencing beteiligt. Diese produzieren dsRNA, die entweder als Initiator des RNAi Signals oder auch als Multiplikatoren der bereits in Gang gesetzten RNAi Maschinerie dienen (Tang et al. 2003, zusammengefasst von Paces et al. 2017).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur der Argonauten Proteine.**

Zur siRNA (in rot) komplementäre mRNA (schwarz) wird im katalytischen Zentrum der PIWI Domäne geschnitten, welche von MID Domäne und der N-terminalen (N) Domäne umgeben ist. Das 3'-Ende der siRNA wird in der PAZ Domäne gebunden und das 5'-Ende in der MID Domäne verankert (Quelle: Paces et al. 2017, leicht verändert)



**Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung des RNAi-vermittelten Gen-Silencings.**

In der Zelle vorliegende dsRNA kann viralen Ursprungs sein, durch Haarnadel-Konstrukte (hp: *hairpin*) transkribiert werden, durch VIGS induziert sein oder, wie in dieser Arbeit, durch flankierende Promotoren transkribiert werden. Diese wird von Dicer Proteinen in ~21 Basenpaar lange siRNA Moleküle geschnitten, welche als Einzelstrang in den RISC-Komplex gebunden werden und mittels Basenpaarung mit homologer mRNA zum Abbau dieser führt (Quelle: Waterhouse und Helliwell 2003, leicht verändert).

Neben diesem Weg des post-transkriptionellen Gen-Silencings gibt es noch den Weg des transkriptionellen Gen-Silencings. Dabei kommt es zu einer Methylierung des Ziel-Gens auf DNA Ebene, was die Transkription unterbindet (Wassenegger et al. 1994). Diese RNA-abhängige DNA Methylierung (RdDM; *RNA-dependent DNA methylation*) tritt insbesondere bei Homologien der dsRNA zu Promotor-Regionen auf (Bernstein et al. 2001b, Mette et al. 2000). Die systemische Wirkung von RNAi, welche zur Ausbreitung des Effekts im ganzen Organismus führen kann und der Anwesenheit von RdRP bedarf (Fire et al. 1998, Hannon 2002, Palauqui et al. 1997, Voinnet et al. 1998), erlaubt in Pflanzen die Möglichkeit von transienten Analysen in infiltrierten oder infiziertem Gewebe. Hierbei dienen siRNAs, die sich als mobile Elemente über die Plasmodesmata im Gewebe ausbreiten, zur Verbreitung des Silencing-Effekts (Dunoyer et al. 2010, Liang et al. 2012).

Seit der Entdeckung des RNAi Mechanismus ist die Anzahl an Veröffentlichungen zur Erforschung dieses Phänomens und auch zum gezielten Einsatz in der Funktionsforschung von Genen in die Höhe geschneilt. Nichtsdestotrotz weist die Anwendung von RNAi in der funktionellen Analyse und der Mutationszüchtung Nachteile auf. Zum einen handelt es sich lediglich um eine Reduktion der Genexpression, nicht um eine vollständige Unterbindung. Darüber hinaus ist das Ausmaß der Reduktion relativ variabel zwischen einzelnen Events, wobei off-target Effekte oftmals nicht ausgeschlossen werden können. Zum anderen tragen die erzielten Endprodukte immer ein Transgen, was sie der geltenden Rechtsprechung in der EU nach zu gentechnisch veränderten Organismen macht. Ein Umstand, der nicht nur die regulatorischen Hürden nach sich zieht, sondern auch Bedenken in der Gesellschaft hervorruft. Neueste Entwicklungen in der Biotechnologie wie die Genome Editing Methoden TALEN und CRISPR/Cas ermöglichen es diese Nachteile zu umgehen.

### 1.5.2 TALEN

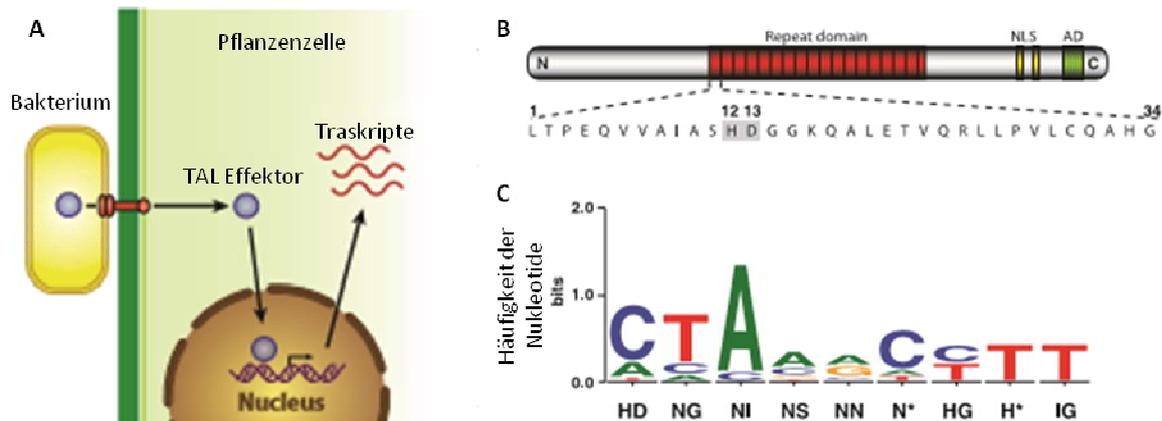
Genome Editing Methoden zum Einführen von gezielten Doppelstrangbrüchen in der DNA und somit zur Induktion von zufälligen, jedoch ortsspezifischen Mutationen oder auch gezielten Änderungen in der DNA, sind mittlerweile ein wichtiger Bestandteil der Grundlagenforschung wie auch der angewandten Forschung zu Optimierung von Eigenschaften. Nach der Entdeckung und Anwendung von Meganukleasen und Zink-Finger-Nukleasen (ZFN), wurde das Feld durch die Entdeckung der TAL Effektoren (*transcription activator-like effectors*) um eine weitaus flexiblere Methode zur Ansteuerung von DNA Bereichen erweitert.

Bei den natürlich vorkommenden TAL Effektoren handelt es sich um Effektoren von bakteriellen Pathogenen der Gattung *Xanthomonas* (und verwandter Gattungen), die über das Typ III

Sekretionssystem in die pflanzliche Wirtszelle eingebracht werden. Hier binden sie im Nukleus der Wirtszelle an Promotorbereiche von Genen und die Aktivator-Domäne führt zur Genexpression, welche die Infektion fördert und so die Virulenz der Bakterien erhöht (schematisch dargestellt in Abbildung 5A) (Kay et al. 2007, Moscou und Bogdanove 2009, Römer et al. 2007). Die Ziel-Gene der TAL Effektoren in der Wirtszelle dienen somit als S-Gene (siehe auch Kapitel 1.3.3). Resistenzen können durch eine Mutation im S-Gen, welche die Erkennungssequenz des TAL Effektors ändert und somit für diesen nicht mehr zugänglich macht, ausgelöst werden. Auch R-Gene, die entweder die TAL Effektoren erkennen und eine Resistenzreaktion auslösen oder welche die TAL Effektoren durch Homologien im Promotor-Bereich “ködern” und so zur Expression des Resistenz-Gens führen, ermöglichen eine Resistenz gegen das Pathogen (Römer et al. 2007, übersichtlich zusammengefasst von Boch und Bonas 2010).

Die Entschlüsselung des Codes zur Erkennung und Bindung spezifischer DNA-Sequenzen der TAL Effektoren ermöglichte ihre Nutzung für den gezielten Einsatz in der Biotechnologie (Boch et al. 2009, Moscou und Bogdanove 2009). Die zentrale Domäne der TAL Effektoren umfasst bis zu 33,5 Module sich wiederholender Sequenzen. Zumeist sind TAL Effektoren mit 13 bis 28 Modulen vertreten, die typischerweise aus je 34 Aminosäuren bestehen, wobei auch Varianten mit 33 oder 35 Aminosäuren vorkommen. Jedes dieser Module ist dabei für die Bindung einer Base in der DNA-Sequenzen verantwortlich, so dass eine 1:1 Erkennung zwischen Modul und DNA-Sequenz vorliegt (Boch et al. 2009, Boch und Bonas 2010, Moscou und Bogdanove 2009). Die DNA-Bindungsspezifität wird dabei von den sogenannten RVDs (*repeat variable diresidues*) an Position 12 und 13 der Module bestimmt (Boch et al. 2009). Die repetitiven Bereiche der 34 Aminosäuren jedes Moduls bilden eine links gedrehte Doppel-Helix-Struktur aus, so dass die RVDs an exponierter Lage zur DNA lokalisiert sind. Hierbei hat das RVD an Position 12 eine stabilisierende Funktion in der Protein-Faltung, während das RVD an Position 13 den eigentlichen Kontakt mit dem DNA-Strang in der großen Furche eingeht (Deng et al. 2012, Mak et al. 2012). Die verschiedenen RVD Zusammensetzungen haben unterschiedliche Präferenzen in der Nukleotid-Paarung (Abbildung 5). Die am häufigsten vorkommenden RVD-Basenpaarungen sind: HD:Cytosin (Histidin-Asparaginsäure), NG:Thymin (Asparagin-Glycin), NI:Adenosin (Asparagin-Isoleucin) und NN:Guanin/Adenosin (Asparagin-Asparagin). Weniger häufig, jedoch spezifischer in der Bindung zu Guanin sind die RVDs NH (Asparagin-Histidin) und NK (Asparagin-Lysin) (Streubel et al. 2012, Cong et al. 2012). Allerdings ist jeder spezifischen DNA-Erkennungssequenz gemein,

dass sie mit einem Thymin beginnt, was eine Bedingung für die erfolgreiche Bindung der TAL Effektoren ist (Boch et al. 2009, Moscou und Bogdanove 2009).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der TAL Effektoren.**

A) TAL Effektoren werden von pflanzenpathogenen Bakterien der Gattung *Xanthomonas* über Typ III Sekretionssysteme in die Pflanzenzelle eingebracht, wo sie im Nucleus die Expression bestimmter Gene zur Förderung der Pathogenität induzieren. Quelle: Boch und Bonas 2010, leicht verändert. B) Darstellung des AvrBs3 TAL Effektors: In der Aminosäuresequenz des ersten Moduls der zentralen Domäne zur Erkennung der DNA Sequenz (*repeat domain*, in rot) sind die RVDs (12 und 13) grau hervorgehoben. Der TAL Effektor besitzt darüber hinaus eine Domäne zur Lokalisation in den Nucleus (NLS, *nuclear localization signal*) und eine Aktivierungsdomäne (AD, *activation domain*) am C-Terminus. Quelle: Boch et al. 2009. C) Graphische Darstellung der Häufigkeit zur Bindung von Nucleotiden von RVDs in der DNA-Sequenz nach Boch et al. (2009). Die am häufigsten vertretenen Nucleotid-Bindungen spiegeln sich in der Größe der korrespondierenden Buchstaben wider (auf Basis der Analyse von acht TAL Effektoren und Ziel-DNA Bereichen). Das Sternchen markiert RVDs mit fehlenden RVD 13.

Trotz einiger tolerierter Fehlpaarungen in der Bindung der TAL Effektoren und der DNA-Sequenz, erlaubt die gezielte Assemblierung der Motive mit spezifischen RVDs die Konstruktion von Bindedomänen für jede beliebige DNA-Sequenz (Antony et al. 2010, Bogdanove und Voytas 2011, Reyon et al. 2012, Römer et al. 2009, Schmid-Burgk et al. 2012). Schnell wurde die Möglichkeit erkannt, die natürliche vorkommende Aktivierungs-Domäne gegen eine FokI Endonuklease-Domäne zu tauschen, um so gezielte Doppelstrangbrüche in der DNA zu induzieren (Christian et al. 2010, Li et al. 2011b, Miller et al. 2011, Mahfouz et al. 2011). Diese TAL Effektor Nucleasen (TALEN) müssen als Paar am plus- und minus-Strang der DNA binden, um die Bildung von Dimeren der FokI Nucleasen und somit das Schneiden der DNA zu ermöglichen (Bogdanove und Voytas 2011). Der Abstand zwischen den beiden Paaren (*spacer*) ist dabei wichtig für die Effektivität der TALENs. Ein Abstand zwischen 10 und 30 Basenpaaren wurde als optimal für die Induktion des Doppelstrangbruches beschrieben (Bogdanove und Voytas 2011, Christian et al. 2010, Miller et al. 2011, Mussolino et al. 2011). Die Assemblierung der TALEN Module ist jedoch durch die hoch repetitiven Bereiche nicht trivial und lässt sich nicht oder nur sehr schwer über PCR-basierte Methoden realisieren (Malzahn et al. 2017, Voytas 2013). Daher wurden eine Reihe von ligationsbasierten Metho-

den beschrieben, unter denen die *Golden Gate* Klonierung die am weitesten verbreitete ist (Cermak et al. 2011, Li et al. 2011a, Li et al. 2012b, Morbitzer et al. 2011, Sanjana et al. 2012).

Da die durch die TALENs induzierten Doppelstrangbrüche letal wären, müssen sie von den Zellen wieder repariert werden. Hierbei kommen hauptsächlich zwei unterschiedliche, zelleigene Reparatur-Mechanismen zum Einsatz: NHEJ (*non homologous end joining*) oder HDR (*homologous directed recombination*). (Oftmals wird hier von HR = homologe Rekombination gesprochen. Um Verwechslungen zur HR = hypersensitive Reaktion zu vermeiden, wird daher das Akronym HDR verwendet.) Bei der NHEJ werden die losen Enden der DNA wieder verknüpft, was oftmals mit Fehlern behaftet ist. Die HDR hingegen nutzt eine Matrize mit Sequenz-Übereinstimmungen zur Bruchstelle, zum Beispiel das Schwester-Chromatid, homologe Chromosomen oder eine eingebrachte weitgehend homologe Sequenz, um den Bruch zu reparieren (siehe hierzu die ausführlichen Zusammenfassungen von Chapman et al. 2012, Steinert et al. 2016, Waterworth et al. 2011 oder Wyman und Kanaar 2006). Durch die ungenaue Natur der Reparatur durch NHEJ, kommt es oftmals zu Deletionen oder Insertionen (InDels) in der Sequenz (Gorbunova 1997, Salomon und Puchta 1998). Diese InDels können zu einer Änderung des Leserasters und somit zum Knock-out des Gens führen. Der HDR Mechanismus kann in Kombination mit TALENs und einer zusätzlich eingebrachten Matrize dazu genutzt werden, gezielte und spezifische Änderungen in der DNA-Sequenz zu erzielen. Eine weitere Möglichkeit ist das zielgenaue Einbringen ganzer Gene zur Erzeugung transgener Organismen.

TALENs sind mittlerweile ein fester Bestandteil der Pflanzenforschung. Malzahn et al. (2017) fassen zusammen, dass bis 2017 mehr als 50 Gene in Pflanzen durch TALENs modifiziert wurden und das in diversen Arten wie *A. thaliana*, Gerste, Weizen, Mais, Reis, Soja, Tomate und Tabak. Die Etablierung von Krankheitsresistenzen wurde zum Beispiel in Reis durch die Mutation des *OsSWEET14* Promotors oder in Weizen durch den Knock-out aller Allele des *MLO* Gens zur Etablierung der Mehltau-Resistenz erzeugt (Li et al. 2012a, Wang et al. 2014). Auch über die Grenzen des Pflanzenreiches hinaus ermöglichte die universelle Einsatzmöglichkeit der TALENs die gezielte Mutation von Genen in Modell- und Nicht-Modellorganismen wie Mäusen, Drosophila, Zebrafisch, *Caenorhabditis elegans*, Frosch, Schwein, Schaf und menschlichen Zelllinien (Kim et al. 2017a, Kim et al. 2017b, Li et al. 2016, Li et al. 2017b, Nakai et al. 2016, Sugi et al. 2014, Wang et al. 2017, Yu et al. 2014b).

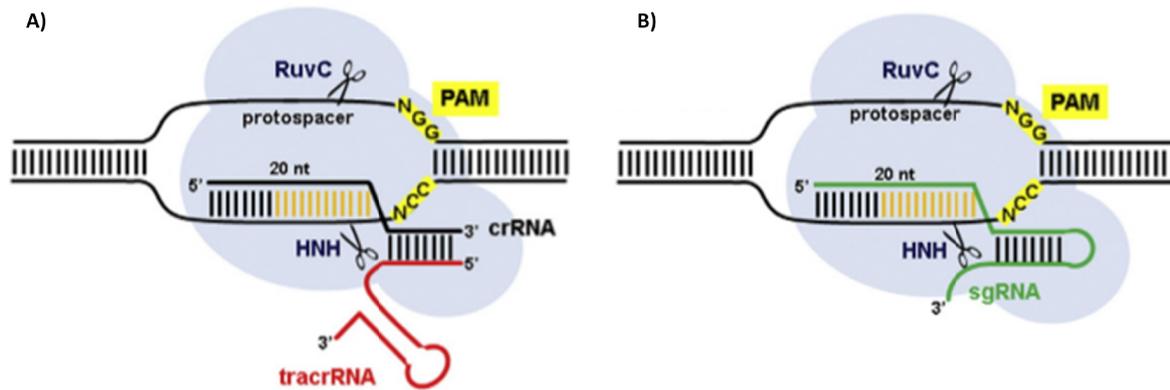
### 1.5.3 CRISPR/Cas9

Schon kurz nach der Entdeckung und den ersten Anwendungen der TALENs wurde das Feld der Genome Editing Methoden durch die Entdeckung des CRISPR/Cas Systems erweitert und durch dessen günstige, einfache und flexible Anwendung regelrecht revolutioniert. Aufgrund der enormen Anzahl an Publikationen und der breiten Anwendungsfelder ist davon auszugehen, dass CRISPR/Cas9 den Einsatz von TALENs mehr und mehr ablösen wird. Vereinfacht gesagt, handelt es sich bei CRISPR (*clustered regularly interspaced palindromic repeats*) um das adaptive Immunsystem von Bakterien und Archaeazum Schutz gegen Viren und Phagendurch RNA-geleitete DNA Spaltung (Barrangou et al. 2007, Marraffini und Sontheimer 2008, Wiedenheft et al. 2012).

Schon 1987 wurden CRISPR in *E. coli* beschrieben, obschon die Funktion damals noch unklar war (Ishino et al. 1987). Erst 2005 wurde deren Rolle im adaptiven Immunsystem erkannt (Bolotin et al. 2005, Mojica et al. 2005). Wenige Jahre später gelang es, durch den Nachweis RNA-geleiteter DNA Spaltung, die Funktion der CRISPR im Immunsystem aufzuklären (Barrangou et al. 2007, Deltcheva et al. 2011, Garneau et al. 2010). Wichtiger Bestandteil in dieser Funktion sind die CRISPR-assoziierten Gene (*Cas*). *Cas* Gene sind neben den CRISPR Sequenzen lokalisiert und kommen in unterschiedlicher Zusammensetzung in den verschiedenen CRISPR Systemen vor. Letztere können in sechs Typen und zwei Klassen unterteilt werden (Makarova et al. 2011, Makarova et al. 2015, Shmakov et al. 2015). Die Typen IV, V und VI sind erst seit kurzem identifiziert und daher nicht in dem Maße untersucht wie die Typen I, II und III. Zu den Systemen der Klasse 1 werden solche gezählt, deren Effektorkomplexe aus mehreren Untereinheiten bestehen (Typ I, III und IV), während die Klasse 2 Systeme (Typ II, V und VI) sich durch Effektorkomplexe bestehend aus einer Untereinheit auszeichnen (Makarova et al. 2015, Makarova et al. 2017, Shmakov et al. 2015). Das aktuell am intensivsten untersuchte System ist vom Typ II aus *Streptococcus pyogenes*, bestehend aus der Nuklease Cas9, der crRNA (CRISPR RNA) und der tracrRNA (transaktivierenden crRNA) (Gasiunas et al. 2012, Makarova et al. 2017, Wright et al. 2016). Bei Typ II Systemen werden bei einer Infektion mit Viren oder Phagen kurze Abschnitte invasiver DNA (20 bis 50 Basenpaare, bezeichnet als *Spacer*) zwischen zwei angrenzende Wiederholungssequenzen (*Repeats*) am proximalen Ende des CRISPR Locus integriert. Diese werden dann bei erneuter Infektion in kurze crRNA transkribiert, welche sich mit der tracrRNA zusammenschließt. Diese fusionierte crRNA/tracrRNA, auch als *guide* RNA (gRNA) bezeichnet, leitet die Cas9 zu homologer DNA, wo sie eine RNA/DNA Bindung zwischen dem *Spacer* und der Ziel-DNA Sequenz, dem sogenannten *Protospacer* ausbildet (Barrangou et al. 2007). Die

Cas9 besteht aus zwei Endonuklease-Domänen – HNH und RuvC-ähnliche Domäne – die beide einen DNA-Strang schneiden und so zusammen zum Doppelstrangbruch der DNA führen (Abbildung 6A). Die spezifische Erkennung und das Schneiden von homologer DNA durch den Cas9 Komplex erfordert die sogenannte *Seed* Sequenz, 12 bp vorgelagert der PAM Sequenzen (*protospacer adjacent motif*) in der crRNA und das Vorhandensein der spezifischen PAM Sequenz nachgelagert des *Protospacers* (Jinek et al. 2012). Die PAM Sequenzen können in den unterschiedlichen Systemen variieren. So besteht im System aus *S. pyogenes* die PAM Sequenz aus -NGG, oder seltener -NAG (Cong et al. 2013, Hsu et al. 2013, Jinek et al. 2012), im Systemen von *S. thermophilus* hingegen aus -NNAGAA oder -NGGNG (Garneau et al. 2010, Gasiunas et al. 2012).

Der Durchbruch, der zur Nutzung des CRISPR/Cas Systems als Genome Editing Methode in der Biotechnologie führte, beruhte auf der Entdeckung, dass mit dem Austausch von 20 Basenpaaren in der crRNA jede beliebige DNA Sequenz im Genom angesteuert werden kann und dass crRNA und tracrRNA zu einer einzelnen *guide* RNA, der sgRNA (*single guide* RNA; zum Teil auch als gRNA in der Literatur bezeichnet) fusioniert werden können (Abbildung 6B) (Bortesi und Fischer 2015, Jinek et al. 2012, Ran et al. 2013b). Die Einfachheit und Funktionalität dieses Zwei-Komponenten CRISPR/Cas Systems mit einzelner, fusionierter sgRNA (20 bp *Spacer*-Sequenz, gefolgt von 80 bp Fusions-Sequenzen der crRNA und tracrRNA) über die Grenzen des Reiches der Bakterien hinaus, wurde schon kurze Zeit später in menschlichen Zellen und Mäusen durch gezielte Induktion von Doppelstrangbrüchen bestätigt (Cong et al. 2013, Hsu et al. 2013, Mali et al. 2013). Nach diesen ersten *proof-of-concept* Analysen, schnellten die Anzahl an Veröffentlichungen mit CRISPR/Cas9 in die Höhe. Malzahn et al. (2017) fassen zusammen, dass CRISPR/Cas bis 2017 erfolgreich unter anderen in *A. thaliana*, Gerste, Baumwolle, Mais, Reis, Sorghum, Sojabohne, Weizen, Tomate, Kartoffel, Tabak, Löwenzahn, Petunie, Orange und Pappel angewendet wurde. Damit konnte die Anwendbarkeit von CRISPR/Cas nicht nur in Gehölzen wie Pappel und Orange, sondern auch in tetraploiden und hexaploiden Pflanzen nachgewiesen werden (Andersson et al. 2017, Braatz et al. 2017, Butler et al. 2015, Chen et al. 2017, Fan et al. 2015, Jia und Wang 2014, Jiang et al. 2017, Li et al. 2017a, Morineau et al. 2017, Peng et al. 2017, Wang et al. 2014, Zhou et al. 2015). Hierbei wurde neben Fragen der Grundlagenforschung auch ein großes Spektrum praktischer Merkmale wie Resistenzen gegen Pathogene oder abiotischen Stress, als auch Merkmale zur optimierten Zusammensetzung von Inhaltsstoffen untersucht.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der RNA-geleiteten DNA Spaltung durch CRISPR/Cas9.**

A) Die Cas9 (hellblau), bestehend aus den Domänen RuvC und HNH, wird durch die Fusion von crRNA (schwarz) und tracrRNA (rot) zur *Spacer* homologen *Protospacer* Region geleitet, welche als Doppelstrang geschnitten wird. Die crRNA bewirkt hierbei die Spezifität und die tracrRNA die Stabilisierung der Struktur und Aktivierung des Cas9. Die PAM Sequenz (gelb) als auch die Homologie der *Seed* Sequenz (orange) stellen essentielle Faktoren für die Bindung dar. B) Cas9 kann durch die aus crRNA und tracrRNA fusionierte sgRNA (grün) zum Scheiden der *Protospacer* Region geleitet werden. Quelle: Bortesi und Fischer 2015.

Neben dem häufig verwendeten CRISPR/Cas9 System vom Typ II, steht heute eine Vielzahl von Varianten zur Verfügung. Durch den Knock-out einer der Nuklease-Domänen von Cas9 (Cas9n, *Cas9 Nickase*; zum Beispiel Mutation von Aspartate zu Alanin in RuvC – D10A genannt) wird anstelle des Doppelstrangbruchs nur ein Einzelstrangbruch (*Nick*) induziert (Cho et al. 2014, Fauser et al. 2014, Ran et al. 2013a, Schiml et al. 2014). Somit kann die Spezifität des Systems erhöht werden, da zur Induktion des Doppelstrangbruchs ein Paar an CRISPR/Cas Komplexen benötigt wird, ähnlich dem System der TALENs. Mutierte Cas9, bei denen beide Nuklease-Domänen ausgeschaltet wurden (dCas9, *dead Cas9*), können mit verschiedenen funktionalen Domänen, wie zum Beispiel FokI Nukleasen oder Cytidin-Deaminasen zur Basen-Editierung fusioniert werden (Komor et al. 2016, Li et al. 2017c, Tsai et al. 2014, Zong et al. 2017). Des Weiteren bietet das CRISPR/Cpf1 System von Typ V durch mehrere Abweichungen zu CRISPR/Cas9 Vorteile. Zum einen benötigt Cpf1 nur die crRNA und zum anderen eine abweichende PAM Sequenz (-TTTN), was zusätzliche Flexibilität in der Zielsequenz erlaubt. Hinzu kommt, dass Cpf1 keinen glatten Schnitt in der DNA macht, sondern durch den Schnitt, welcher einige Basenpaare entfernt von der *Protospacer* Sequenz gesetzt wird, einen 5'-Überhang erzeugt. Dies bietet die Möglichkeit zur Optimierung von HDR Ansätzen (Endo et al. 2016, Tang et al. 2017, Yin et al. 2017, Zetsche et al. 2015). Einer der größten Vorteile der CRISPR/Cas-basierten Genome Editing Methoden ist die Möglichkeit zum Multiplexing und somit zur Bearbeitung mehrerer Loci im Genom zur selben Zeit durch den Einsatz mehrerer sgRNAs (Cong et al. 2013, Li et al. 2017d, Peterson et al. 2016, Xing et al. 2014). Peterson et al. (2016) konnten so die gezielte Mutation von 14 verschie-

denen Genen in *A. thaliana* nachweisen, ohne dass off-target Mutationen beobachtet wurden. Dies könnte die gezielte Änderung ganzer Stoffwechselwege ermöglichen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Resistente Sorten haben einen hohen Wert für Umwelt, Verbraucher und Produzenten. Zur möglichen Etablierung von Resistenzen gegen den Echten Mehltau in Rosenbestehen verschiedene Systeme. Diese zeichnen sich zum Teil jedoch durch Nachteile, wie zum Beispiel schnelles Brechen der Resistenz oder komplexe und langwierige Züchtungsstrategien, aus. Neue Methoden des Genome Editings sind heute zum Werkzeugkasten der Züchtung hinzugekommen und ermöglichen die gezielte Mutagenese von Genen. Die *mlo*-vermittelte Resistenz durch den Knock-out der S-Gene bietet hier großes Potential zur Generierung mehltau-resistenter Rosen. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst mittels RNAi-Ansatz geklärt, ob die identifizierten Kandidaten-Gene in der Mehltau-Anfälligkeit beteiligt sind. Hierzu wurden quantitative Inokulationsversuche in stabilen und transienten Systemen durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurde die Anwendbarkeit von TALENs und CRISPR/Cas9 an *R. hybrida* untersucht. Die Funktionalität wurde bereits in einer Vielzahl von Pflanzen nachgewiesen, unter anderen auch in polyploiden Arten und Gehölzen. Der Einsatz in vegetativ vermehrten, polyploiden Arten ist bisher allerdings nur in Kartoffeln beschrieben worden. Daher wurde die Effizienz der beiden Systeme zur Induktion von Mutationen und mögliche off-target Mutationen über die Zyklen der vegetativen Vermehrung hinweg untersucht. Des Weiteren wurden die angewendeten Methoden insbesondere zum Nachweis der gesetzten Mutationen und eventueller off-target Effekte auf ihre Praktikabilität und Effizienz hin bewertet. Das abschließende Fazit bewertet die Anwendbarkeit von RNAi und Genome Editing Methoden in Rosen und gibt einen Ausblick auf die Anwendbarkeit für zukünftige Forschungsprojekte zur Etablierung der *mlo*-Resistenz in Rosen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

Die tetraploide *R. hybrida* Sorte 'Pariser Charme' stammt aus der Züchtung von Matthias Tantau und wurde 1965 eingeführt. Die Sorte zeichnet sich durch gefüllte, rosafarbende Blüten mit rekurrentem Blühen sowie buschigem Wuchshabitus aus und ist stark anfällig für den Echten Mehltau sowie für weitere Rosenkrankheiten, wie den Sternrußtau.

Als Ausgangsmaterial für diese Arbeit wurden wurzelechte, im Gewächshaus und Freiland kultivierte Pflanzen verwendet. Neben der Stecklingsvermehrung wurden junge und gesunde Pflanzen aus der In-vitro-Kultur vermehrt, bewurzelt und akklimatisiert.

Für die Versuche stand bereits In-vitro-Material sowohl in Form von Sprosskulturen als auch somatischen Embryonen zur Verfügung. Beide Kulturen wurden 2011 etabliert. Für die Transformationsexperimente wurden weitere somatische Embryonen von den etablierten Sprosskulturen induziert.

#### 2.1.2 Echter Mehltau

Das in dieser Arbeit verwendete Inokulum des Echten Mehltaus wurde von im Gewächshaus befallenen 'Pariser Charme' Pflanzen gesammelt. Der Befall wurde durch ein *in vitro* etabliertes und kultiviertes, nicht näher definiertes Einsporisolat und den spontan auftretenden Befall mit *P. pannosa* in der Kabine hervorgerufen. Aufgrund der starken Rassenbildung von *P. pannosa* (Linde und Debener 2003) ist anzunehmen, dass es sich daher um ein unspezifisches Rassengemisch mit jeweils einer konstanten Rasse (aus der In-vitro-Kultur) als Grundlage für das Inokulum handelte.

#### 2.1.3 Bakterienstämme

Der in dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli* Stamm DH10B (Invitrogen, Carlsbad, USA) hat folgenden Genotyp:  $F^{mcrA} \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 endA1 araD139\Delta(ara, leu)7697 galU galK \lambda rpsL nupG$ .

Für die stabile und transiente Transformation von *R. hybrida* wurden die *Agrobacterium tumefaciens* Stämme GV2260, GV3101 und EHA105 verwendet (Hellens et al. 2000). In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die Eigenschaften der drei Stämme aufgeführt.

**Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten *A. tumefaciens* Stämme.**

Stamm	Chromosomaler Hintergrund	Marker Gen (Chromosom)	Ti Plasmid	Marker Gen (Ti Plasmid)	Opin
GV2260	C58	Rifampicin	pGV2260 (pTiB6S3ΔT-DNA)	Carbenicillin	Octopin
GV3101	C58	Rifampicin	-	-	Nopalins
EHA105	C58	Rifampicin	pEHA105 (pTiBo542DT-DNA)	-	Succinamopins

Quelle: Hellens et al. 2000.

#### 2.1.4 Sequenzen

Von den vier *RhMLO* Genen lagen klonierte cDNA Vollständigsequenzen in der Abteilung für Molekulare Pflanzenzüchtung des Instituts für Pflanzengenetik der Leibniz Universität Hannover vor (Kaufmann et al. 2012). In der nachfolgenden Tabelle sind jeweils die zu den Genen gehörigen *Accession*-Nummern aufgeführt.

**Tabelle 2: *RhMLOs* und *Accession*-Nummern.**

Gen	<i>Accession</i> -Nummer
<i>RhMLO1</i>	JX847131
<i>RhMLO2</i>	JX847132
<i>RhMLO3</i>	JX847133
<i>RhMLO4</i>	JX847134

#### 2.1.5 Vektoren

Das Plasmid p9U10-RNAi (RNAi Vektor) als auch das Plasmid pRedU10-35s (dsRed Vektor) stammt vom DNA Cloning Service (Hamburg, Deutschland). Die drei verwendeten CRISPR/Cas Nickase Konstrukte (CCMlo1, CCMlo2 und CCMlo3/4) wurden beim DNA Cloning Service in Auftrag gegeben und die *RhMLO* spezifischen sgRNAs, beziehungsweise *Protospacer* Sequenzen, vom DNA Cloning Service in den Vektor p9io-35SCas10 (erste Generation) und p9io-UbiCas10 (zweite Generation) kloniert. Die hier verwendeten TALEN Konstrukte wurden vom Kooperationspartner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Lahaye der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt und basieren auf dem Plasmid pICH50505 (Weber et al. 2011). Die vom Kooperationspartner zur Verfügung gestellt TALEN Konstrukte zweiter Generation basierten auf den pBinPlus Hintergrund (van Engelen et al. 1995). Die Vektorkarten mit den Spezifika der Plasmide sind in Anhang A.1 aufgeführt.

### **2.1.6 Kulturmedien und Puffer**

Die verwendeten Medien für die In-vitro-Kultur sowie die Kultur von *E. coli* und *A. tumefaciens* als auch die verwendeten Puffer, sind dem Anhang A.2 zu entnehmen.

### **2.1.7 Primer und Tags**

Primer und Tags, die für die PCR-Analysen und Sequenzierungen verwendet wurden, sind in Anhang A.3 aufgeführt.

### **2.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien samt Herstellerangaben sind dem Anhang A.4 zu entnehmen.

### **2.1.9 Programme und Online Tools**

Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten lizenzierten und frei erhältlichen Programme sowie der genutzten Online Tools ist in Anhang A.5 aufgeführt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 In-vitro-Kultur**

#### **2.2.1.1 Induktion und Erhalt somatischer Embryonen von *R. hybrida***

Die Induktion somatischer Embryonen der *R. hybrida* Sorte 'Pariser Charme' wurde nach Dohm et al. (2001) durchgeführt. Hierfür wurden junge, voll entfaltete Blätter von In-vitro-Sprossen entnommen, dreimal mit einem Skalpell eingeritzt und adaxial auf das Induktionsmedium 2.31 (Anhang A.2) in Petrischalen (Ø 9,0 cm) aufgelegt. Die Kultur erfolgte bei 24°C im Dunkeln. Nach vier Wochen wurde der embryogene Kallus vom verbleibenden Blattmaterial getrennt, mit dem Skalpell fein gehackt und auf das Medium 87.13D (Anhang A.2) übertragen. Weitere vier Wochen später sowie fortführend in vierwöchigem Rhythmus wurden die so erhaltenen und vermehrten somatischen Embryonen sowie embryogener Kallus von nicht-embryogenen Strukturen getrennt, gehackt und auf 87.13E Medium (Anhang A.2) ausgestrichen. In einem weiteren Ansatz wurden nicht weiter vermehrte Strukturen für die Induktion von Embryonen dem Protokoll von Kamo et al. (2004) folgend verwendet. Die Kultur der somatischen Embryonen erfolgte bei 24°C im Dunkeln.

### **2.2.1.2 Sprossregeneration und -proliferation von *R. hybrida***

Für die Regeneration von Sprossen wurden somatische Embryonen von *R. hybrida* auf das Sprossinduktions/Regenerations-Medium 87.51 (Anhang A.2) in Petrischalen (Ø 9,0 cm) überführt, bei 24°C und 16 h Photoperiode kultiviert und in einem vierwöchigen Rhythmus umgesetzt. Regenerierte Sprosse wurden entnommen, frisch angeschnitten und in 250 ml Kulturbecher (Ø 8,5 cm) mit Sprossproliferationsmedium 89.66 (Anhang A.2) überführt. Auf 89.66 Medium kultivierte und vermehrte Sprosse wurden alle vier Wochen vereinzelt und auf frisches Medium umgesetzt. Die Kultur erfolgte bei 24°C und 16 h Photoperiode.

### **2.2.1.3 Bewurzelung und Akklimatisierung**

Zur Bewurzelung von Sprossen wurden diese auf das Bewurzelungsmedium 86.04 (Anhang A.2) überführt. Die Kultur erfolgte bei 24°C für die ersten fünf Tage im Dunkeln und anschließend bei einer Photoperiode von 16 h. Nach ausreichender Bewurzelung der Sprosse, wurden diese dem Medium entnommen, Reste des Mediums gründlich von den Wurzeln gewaschen und in Ø 6,0 cm Pflanztöpfe mit Erde überführt. Die Akklimatisierungsphase erfolgte im Klimaschrank unter gradueller Reduzierung der Luftfeuchte bei 24°C und 16 h Photoperiode. Die Kultivierung der akklimatisierten Pflanzen erfolgte in der Phytokammer (22°C, Kurztag).

## **2.2.2 Transformation**

### **2.2.2.1 Transformation von Bakterien**

#### **2.2.2.1.1 Herstellung elektrokompenter Zellen**

Die Herstellung elektrokompenter *E. coli* DH10B Zellen erfolgte leicht geändert nach Sambrook und Russel (2001). Hierfür wurden 20 ml SOB-Medium (Anhang A.2) in 250 ml Erlenmeyerkolben mit einer frisch gewachsenen Einzelkolonie von *E. coli* DH10B angeimpft und über Nacht (üN) bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Mit 5 bis 10 ml üN Kultur wurden 500 ml SOB-Medium (1 l Erlenmeyerkolben) beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,95 ± 0,05 wachsen gelassen (37°C, 150 rpm). Die Kultur wurde anschließend in 250 ml Zentrifugationsröhrchen aufgeteilt (vorgekühlt) und für 15 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 10 % Glycerin gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in der Rest-Flüssigkeit gelöst, in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in einem bei -80°C gekühlten Metallblock gefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen von *A. tumefaciens* wurde leicht verändert nach Wise et al. (2006a) durchgeführt. Hierzu wurden 2 ml YEP-Medium (Anhang A.2) mit den entsprechenden Antibiotika mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28°C und 130 rpm inkubiert. Mit der Kultur wurden 100 ml YEP-Medium (mit Antibiotika) in 250 ml Kolben angeimpft ( $OD_{600}$ : ~0,2). Nach Erreichen der Ziel- $OD_{600}$  von ~1,0 (28°C, 110 rpm), wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt und in 50 ml Zentrifugationsröhrchen aufgeteilt. Nach dem Zentrifugieren bei 4°C und 4.000 rpm für 10 Minuten wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem 10 % Glycerin gelöst und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 400 µl 10% Glycerin gelöst und 40 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

#### 2.2.2.1.2 Elektroporation

Die Transformation der *E. coli* und *A. tumefaciens* Zellen erfolgte mittels Elektroporation im Elektroporator MicroPulser™ von Bio-Rad (München, Deutschland) nach Sambrook und Russel (2001), beziehungsweise Wise et al. (2006b), leicht verändert.

40 µl elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurden auf Eis mit 2 µl Ligationmix gemischt und in einer 0,1 cm Küvette bei 1,8 kV für 5 ms der Puls für die Elektroporation gesetzt. Nach der Zugabe von 1 ml SOC-Medium (Anhang A.2), wurden die Zellen für 1 h bei 37°C und 120 rpm inkubiert und anschließend auf festem LB-Medium (Anhang A.2) mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert (50 µl und 100 µl). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend gewachsene Kolonien in eine 96-Well Multititerplatte mit 200 µl FB-Medium (Anhang A.2) gepickt und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.2.4.4.3) auf das Insert überprüft und ausgewählte positive Klone für die Plasmid-Präparation (2.2.4.3) und anschließende Sequenzierung nach Sanger (2.2.5.2) weiter verwendet.

Für die Transformation von *A. tumefaciens* wurden 40 µl kompetente Zellen mit 50-200 ng Plasmid-DNA gemischt und in 0,2 cm Küvetten bei 2,5 kV für 5 ms der elektrische Puls gesetzt. Nach zügiger Zugabe von 1 ml YEP-Medium (Anhang A.2), wurden die aufgenommenen Zellen in einen weiteren Milliliter YEP-Medium gegeben und bei 28°C 2-4 h Stunden bei 130 rpm inkubiert. Anschließen wurden 10 µl und 50 µl auf festem YEP-Medium (Anhang A.2) mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und mindesten für 24 h bei 28°C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden auf eine Petrischale mit YEP-Medium überimpft und nach Inkubation bei 28°C mittels Kolonie-PCR (2.2.4.4.3) auf das Insert überprüft.

### 2.2.2.1.3 Anlegen von Glycerin-Kulturen

Für die Dauerkultur von ausgewählten Klonen wurden 10 ml LB- beziehungsweise 10 ml YEP-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit Einzelkolonien von *E. coli* und *A. tumefaciens* inokuliert und über Nacht bei 130 rpm und 37°C beziehungsweise 28°C inkubiert. Bei einer Ziel-OD<sub>600</sub> von jeweils 1 bis 1,5 wurden die Zellen auf Eis gekühlt und jeweils 1 ml Bakterienkultur mit 0,5 ml eiskaltem 60 % Glycerin in 1,5 ml Schraubdeckelreaktionsgefäße gemischt. Die Glycerin-Kulturen wurden sofort in vorgekühlten Metallblöcken auf -80°C herunter gekühlt/gefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.2.2 Transiente Transformation von Petalen

Für die transiente Transformation von Petalen, auch Agro-Infiltration genannt, wurden aus der Glycerin-Kultur von *A. tumefaciens* Stamm GV3101 Bakterien jeweils frisch ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 28°C inkubiert. Für die erste über Nacht (üN) Kultur wurden 10 ml YEP-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 28°C und 150 rpm inkubiert. Für die zweite üN Kultur wurden 25 ml YEP-Medium (mit Antibiotika) mit 200 µl üN Kultur beimpft und bei 135 rpm und 28°C inkubiert. Am Tag der Agro-Infiltration wurden von der zweiten üN Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bis 1,5 50 ml YEP Medium beimpft, so dass eine OD<sub>600</sub> von 0,2 vorlag. Die Kulturen wurden bei 110 rpm und 28°C inkubiert, bis eine Ziel-OD<sub>600</sub> von 1,0 ± 0,1 erreicht war. Per Zentrifugation in 50 ml Zentrifugationsröhrchen für 1 h bei 3.500 rpm und 22°C wurden die Bakterien pelletiert. Die Pellets wurden in Infiltrationspuffer (Anhang A.2) gelöst und eine OD<sub>600</sub> von 0,5 ± 0,02 eingestellt. Vor der Infiltration wurden die jeweiligen RhMLO-RNAi, TALEN und CRISPR/Cas Suspensionen 1:1 mit der dsRed Suspension gemischt.

Zur Vorbereitung der zu infiltrierenden Petalen wurden Blüten von 'Pariser Charme' frisch geerntet, die noch nicht voll erblüht, deren Petalen jedoch durch die Sepalen der noch halbgeschlossenen Blüte deutlich sichtbar waren. Die Sepalen und äußeren Petalen wurden verworfen und die mittleren Petalen vorsichtig vom Blütenboden gelöst und bis zur Infiltration in mit feuchten Papier ausgelegten Boxen gelagert. Für die transiente Transformation wurde die Basis der Petale vorsichtig mit einer Rasierklinge angeritzt und mit einer Spritze ohne Nadel die Bakterien-Suspension mit sanftem Druck in die Petale infiltriert. Die infiltrierten Petalen wurden in mit feuchtem Papier ausgelegten, transparenten Inokulations-Boxen bei 20°C inkubiert. Der Erfolg der Transformation wurde unter einer LED-Handlampe (480 – 530 nm, Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland) mit entsprechendem Filter überprüft.

Die infiltrierten Petalen wurden sechs Tage bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden unter LED-Licht Petalen mit starkem dsRed Signal für die RNA-Isolation und für die Inokulation mit dem Erreger des Echten Mehltaus verwendet. Von Petalen, die mit den TALEN und CRISPR/Cas Konstrukten Agro-infiltriert wurden, wurden nach sieben Tagen die dsRed positiven Bereiche für DNA-Isolationen entnommen.

### **2.2.2.3 Stabile Transformation somatischer Embryonen**

Die stabile Transformation von somatischen Embryonen der *R. hybrida* Sorte 'Pariser Charme' wurde verändert nach Dohm et al. (2002) durchgeführt. Die Transformationen der RhMLO-RNAi Konstrukte erfolgte zum Teil mit leicht veränderten Bedingungen (Transformation A und B), welche in dem hier beschriebenen optimierten Protokoll resultierten, welches sowohl für die letzten Runden der Transformation der RhMLO-RNAi Konstrukte (Transformation C und E) als auch für die Transformation der TALEN und CRISPR/Cas Konstrukte verwendet wurde. Unterschiede zu dem hier beschriebenen, optimierten Protokoll sind in Klammern angemerkt. Bei allen Versuchen wurde der Stamm GV2260 verwendet, außer bei Transformation B der RhMLO-RNAi Konstrukte und der ersten Transformation mit den TALEN Konstrukten (Transformation D), hier wurde der Stamm EHA105 verwendet.

Zur Vorbereitung der *A. tumefaciens* Kultur, wurden aus der Glycerin-Kultur frische Ausstriche auf YEP-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angelegt und für 2 bis 3 Tage bei 28°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde zur Beimpfung von 10 ml YEP-Medium (mit Antibiotika) verwendet und die Kultur über Nacht bei 28°C und 140 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 50 ml YEP-Medium (mit Antibiotika) mit 1 ml der ersten üN ( $OD_{600}$  von  $\sim 1,5$ ) angeimpft und über Nacht bei 28°C und 110 rpm inkubiert. Mit der zweiten üN Kultur (Ziel- $OD_{600}$  von  $\sim 1,5$ ) wurden am Tag der Transformation 100 ml Minimal A Medium (Anhang A.2) beimpft, so dass eine  $OD_{600}$  von  $0,2 \pm 0,05$  vorlag. Die Kultur wurde bei 28°C und 130 rpm für 3 bis 4 Stunden inkubiert, bis die Ziel- $OD_{600}$  von  $0,5 \pm 0,05$  erreicht wurde. Um ein optimales Wachstum der Zellen zu fördern, wurde das verwendete Medium vor der Inokulation mit *A. tumefaciens* jeweils auf ca. 22°C angewärmt.

Zur Vorbereitung der somatischen Embryonen wurden diese maximal zwei Tage vor der Transformation auf mit Filterpapier belegten 87.13 E Medium in Petrischalen gesammelt. Hierzu wurden Explantate von 0,1 bis 0,3 cm Durchmesser verwendet. Am Tag der Transformation wurden die gesammelten Embryonen in zu 1/3 mit 1/2 MS-Medium (Anhang A.2) gefüllte 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und im Ultraschallbad (Bandelin

Sonorex RK 106, 35kHz; Bandelin electronic GmbH, Berlin, Deutschland) für 1 Minute behandelt (bei Transformation A und B erfolgte die Behandlung für 1,5 Minuten).

Für die Ko-Kultur wurden bis zu 200 mittels Ultraschall verwundete Embryonen in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml der *A. tumefaciens* Suspension zusammengeführt und für 1 Stunde bei 24°C und 120 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen dicht auf Petrischalen mit 87.13 E Medium ausgelegt und für zwei Tage im Dunkeln bei 24°C inkubiert. Nach der Ko-Kultur wurden die Embryonen mit dem Skalpell gehackt und mit 500 mg/l Cefotaxim enthaltendem 1/2 MS-Medium mindestens dreimal gründlich gespült (bei Transformation A und B wurden die Embryonen nicht zusätzlich durch Hacken verwundet). Hier-nach wurden die Embryonen auf 87.13 E Medium mit 500 mg/l Cefotaxim ausgestrichen und für sieben Tage bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Embryonen bei Bedarf nochmals gewaschen und auf 87.13 E Medium mit 100 mg/l Kanamycin und 100 mg/l Ticarcillin überführt. Zur Sprossregeneration wurden die somatischen Embryonen nach vier Wochen auf 87.51 Medium mit 150 mg/l Kanamycin und 150 mg/l Ticarcillin überführt und alle vier Wochen subkultiviert (24°C, 16 h Photoperiode). Regenerierte Sprosse wurden auf 89.66 Medium (100 mg/l Kanamycin, 150 mg/l Ticarcillin) überführt und in einem vierwöchigen Rhythmus kultiviert (24°C, 16 h Photoperiode).

### **2.2.3 Quantitative Mehltau-Inokulation**

#### **2.2.3.1 Inokulation von Probenmaterial**

Für die Inokulationsversuche mit den stabil transgenenklonalen RhMLO-RNAi Linien und den Kontrollen (GUS-RNAi Linie und nicht-transgene Pflanzen), wurden von je drei Klonen pro klonaler Linie (im Folgenden wird auf den Zusatz „klonal“ verzichtet) das zweite bis dritte voll-ausgebildete Fiederblatt von oben entnommen und randomisiert in feuchte Inokulationsboxen verteilt. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte bei jeder Versuchswiederholung zur gleichen Tageszeit. Die Agro-infiltrierte Petalen wurden wie in Punkt 2.2.2.2 beschrieben vorbereitet.

Pipettenspitzen, Bechergläser und Zerstäuber wurden vor Gebrauch mit der Gel Repel<sup>TM</sup> Liquid Solution von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) behandelt und danach mehrfach mit destilliertem Wasser gespült (mind. fünfmal). Die Sporen des mit dem Echten Mehltau befallenen Blattmaterials (siehe 2.1.2) wurden mit 0,05 % Tween Lösung abgespült. Im Anschluss wurde die Sporenkonzentration mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer durch Auszählung von fünf Kleinquadraten bestimmt, wobei diese im Mittel zwischen 350.000 und 500.000 Sporen/ml liegen sollte. Die Lösung wurde kurz gemischt und mittels Zerstäuber gleichmäßig auf das

Probenmaterial aufgebracht. Hierbei wurde pro Inokulationsbox ca. 1 ml Sporensuspension verwendet. Anschließend wurden die Inokulationsboxen unter dem Abzug aufgestellt, um ein schnelles Abtrocknen des Materials zu ermöglichen. Vom ersten Kontakt der Sporen mit der Tween-Lösung bis zum Abtrocknen der Blätter wurde somit eine Zeitspanne von maximal 20 Minuten eingehalten. Um die Vitalität der Sporen nach Abschluss dieser Zeit zu bestimmen, wurden 10 µl der restlichen Sporensuspension mit 10 µl 0,05 % Phenosafraninlösung gemischt und die klaren, ungefärbten und somit lebenden Sporen in der Fuchs-Rosenthal-Kammer näherungsweise über drei Kleinquadrate bestimmt. Im Anschluss wurde das Probenmaterial bei 20°C und hoher Luftfeuchte gelagert.

### 2.2.3.2 Probennahme, Probenvorbereitung und mikroskopischen Auswertung

Die Inokulationen des Blattmaterials der klonalen RhMLO-RNAi Linien (und Kontrollen) wurden zwei Tage nach der Inokulation (2 dpi = *days post inoculation*) beprobt. Hierzu wurde mit einem Korkbohrer aus je drei Blättchen eines Fiederblatts eine Blattscheibe mit einem Durchmesser von 1,3 cm ausgestanzt. Die Probennahme der Agro-infiltrierten und inokulierten Petalen erfolgte 3 dpi. Hierzu wurden unter der LED-Lampe die Bereiche der Petalen mit starkem dsRed Signal ausgeschnitten. Die Fixierung des Probenmaterials erfolgte auf mit Ethanol-Essigsäure (3:1) getränktem Filterpapier mit der inokulierten, adaxialen Seite nach oben. Nach der Fixierung wurden die Proben dreimal für 5 Minuten in 10x PBS-Puffer (Anhang A.2) vorsichtig gewaschen, wobei darauf geachtet wurde, nicht über die adaxiale Seite des Probenmaterials zu spülen. Für die Färbung der Proben wurden diese mit Alexa-WGA (AlexaFlour 488 gekoppelt mit *wheat germ agglutinin* von Invitrogen, Carlsbad, USA), welches in 10x PBS-Puffer mit einem Tropfen Tween zu einer Konzentration von 10 µg/ml verdünnt wurde, bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 10x PBS Puffer einmal gewaschen und bis zur Auswertung auf mit 10x PBS-Puffer getränktem Filterpapier in 6-Well Platten bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Explantate wurden, eingebettet in 10x PBS Puffer, unter dem AxioSkope A1 der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) mit dem Filter Set 38 (Anregung: 493 nm, Emission: 520 nm, Zeiss, Jena, Deutschland) und 100- bis 200-facher Vergrößerung ausgewertet.

Bei den Inokulationen der stabil transgenen RhMLO-RNAi Linien wurden die Sporen mit Myzelbildung pro 3,981 cm<sup>2</sup> Fläche pro Klon ausgewertet. Bei den Inokulationen der Agro-infiltrierten Petalen wurden alle gekeimten Sporen pro Explantat gezählt und hiervon der Anteil derer mit Myzelbildung bestimmt.

## 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1 DNA-Isolation

Die DNA des Probenmaterials wurde mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Plant II Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben unter Verwendung des PL1 Puffers isoliert. Von In-vitro-Sprossen wurde jeweils Material in ein 2 ml Reaktionsgefäß für die Isolation gesammelt. Probenmaterial für die Kaskaden-Vermehrung stand nicht immer in diesem Umfang zur Verfügung, so dass hier alles zur Verfügung stehende Spross-Material für die DNA-Isolation eingesetzt wurde. Auf ein Abwiegen des gesammelten In-vitro-Materials wurde verzichtet. Von Pflanzen in der Phytokammer wurde 50 mg junges Blattmaterial für die DNA-Isolation eingesetzt und von Agro-infiltrierten Petalen wurde jeweils 150 mg Material eingewogen. In flüssigem Stickstoff gefrorenes Material wurde vor der Isolation in der Schwingmühle TissueLyser II von Qiagen (Hilden, Deutschland) bei  $25\text{ s}^{-1}$  für 2,5 Minuten aufgeschlossen. Die Quantifizierung (bei 260 nm) und die Bestimmung auf Verunreinigungen wurden mittels NanoDrop 2000c Spektrophotometer von PEQLAB (Erlangen, Deutschland) vorgenommen. Hierzu wurden die Quotienten von 260nm/280nm (Reinheitsbestimmung) und 260nm/230nm (sekundärer Messwert zur Bestimmung der Reinheit) herangezogen. Die isolierte DNA wurde kurzzeitig bei  $+4^{\circ}\text{C}$  und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  Langzeit gelagert.

### 2.2.4.2 RNA-Isolation

Die Isolation von RNA wurde mit dem RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei anstelle von  $\beta$ -Mercaptoethanol DTT (Dithiothreitol) dem RLC Puffer zugegeben wurde. Von in der Phytokammer angezogenen Pflanzen wurden ca. 10 bis 25 mg der jüngsten, nicht entfalteten Blätter entnommen und von Petalen 100 mg Material eingewogen. Das Material wurde sofort in flüssigem Stickstoff überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde in der Schwingmühle TissueLyser II von Qiagen (Hilden, Deutschland) bei  $25\text{ s}^{-1}$  für zweimal 2 Minuten aufgeschlossen und anschließend wieder bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gefroren. Der an die RNA-Isolation angeschlossene DNase-Verdau wurde mit dem DNA-free<sup>™</sup> DNA Removal Kit von Ambion (Life Technologies, Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Überprüfung der Integrität der RNA, wurde 1  $\mu\text{l}$  der Proben auf einem 1 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt (siehe hierzu Punkt 2.2.4.5.1). Die Quantifizierung (bei 260 nm) und die Bestimmung auf Verunreinigungen mit DNA und Proteinen wurden mittels NanoDrop 2000c

Spektrophotometer von PEQLAB (Erlangen, Deutschland) bestimmt. Hierzu wurden die Quotienten von 260nm/280nm (Reinheitsbestimmung) und 260 nm/230 nm (sekundärer Messwert zur Bestimmung der Reinheit) herangezogen. Die RNA wurde nach der Quantifizierung aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **2.2.4.3 Plasmid-Präparation**

Einzelkolonien von *E. coli* wurden über Nacht in 5 ml LB Medium mit entsprechenden Antibiotika bei 37°C und 150 rpm angezogen. Einzelkolonien von *A. tumefaciens* wurden in 10 ml YEP-Medium und entsprechenden Antibiotika bei 28°C und 120 rpm über Nacht angezogen. Die Plasmid-Präparation wurde mit dem High-Speed Plasmid Mini Kit von Avegene (DCS, Hamburg, Deutschland) und dem NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde jeweils das gesamte Bakterien-Suspensionsvolumen in mehreren Zentrifugationsschritten verwendet und die Zentrifugationsschritte im Protokoll jeweils um 30 Sekunden erhöht. Die eluierten Plasmide wurden im Anschluss quantifiziert (siehe hierzu 2.2.4.1).

### **2.2.4.4 PCR-Reaktionen**

Alle Reaktionen wurden in Thermocyclern der Marken Primus 96 advanced (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) und TGradient (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Reaktionen der q-RT-PCR wurden in der StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) ausgeführt.

#### **2.2.4.4.1 Reverse Transkription**

Die Synthese von cDNA aus RNA mittels reverser Transkription ist im engeren Sinne keine PCR-Reaktion. Aufgrund der Analogien der Reaktionsansätze und Bedingungen wird diese jedoch unter dem Punkt der PCR-Reaktionen mit aufgeführt. Der nachfolgenden Tabelle 3 ist der Reaktionsansatz der cDNA-Synthese, der mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems (Foster City, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde, zu entnehmen.

**Tabelle 3: Reaktionsansatz der reversen Transkription.**

Reagenz (Stammkonzentration)	Menge im Ansatz	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
RT Puffer (10 x)	1 x	2,0 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	4 mM	0,8 µl
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer* (100 µM)	10 µM	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL)	50 U	1 µl
RNase Inhibitor** (40 U/µl)	20 U	0,5 µl
RNA (25 ng/µl / 50 ng/µl)	250 - 500 ng	10 µl
H <sub>2</sub> O		ad 20 µl

\* Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer von ThermoFischer Scientific (Waltham, USA).

\*\* Ambion™ RNase Inhibitor von Invitrogen (Carlsbad, USA).

Für die Synthese von cDNA aus den Versuchen der transienten Infiltration von Petalen mit den RhMLO-RNAi Konstrukten, wurden 250 ng isolierte RNA pro Reaktion eingesetzt, bei allen anderen Reaktionen 500 ng RNA. In der nachfolgenden Tabelle 4 sind die Bedingungen der cDNA-Synthese aufgeführt. Für q-RT-PCR Analysen wurde die cDNA unmittelbar vor der PCR-Reaktion synthetisiert, bei 4°C (maximal über Nacht) gelagert und nicht eingefroren.

**Tabelle 4: Bedingungen der reversen Transkription.**

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25°C	37°C	85°C	4°C
Zeit	15 min	120 min	5 min	∞

#### 2.2.4.4.2 Standard-PCR Protokoll

Das in dieser Arbeit verwendete Standard-PCR-Protokoll ist in der folgenden Tabelle 5 aufgeführt. Es wurde unter anderem bei den Reaktionen mit GAPDH-Primern sowie denen mit NPTII- und Agro-Primern angewendet. Die eingesetzte Menge an DNA variierte zwischen 0,01 ng für Plasmid-DNA und 25 ng für gDNA. Zur Überprüfung auf Intaktheit von cDNA sowie auf Kontamination der cDNA mit gDNA mittels GAPDH-Primern, wurde 1 µl einer 1:10 Verdünnung cDNA eingesetzt.

**Tabelle 5: Standardprotokoll der PCR-Reaktionen.**

Reagenz(Stammkonzentration)	Menge im Ansatz	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
Williams Puffer (10 x)	1 x	2,5 µl
dNTP Mix (2 mM)	100 µM	1,25 µl
Forward Primer (5 µM)	0,2 µM	1 µl
Reverse Primer (5 µM)	0,2 µM	1 µl
DCSPol DNA Polymerase (5 U/µl)	1,25 U	0,25 µl
DNA	0,01 ng bis 25 ng	1 - 2 µl
H <sub>2</sub> O		ad 25 µl

Die Bedingung der PCR-Reaktion wurde für jede Reaktion in Bezug auf die Annealingtemperatur und Zyklenzahl angepasst (siehe hierzu Anhang A.3), folgten aber dem in Tabelle 6 aufgeführten Grundbedingungen.

**Tabelle 6: Bedingungen des Standard-PCR Protokolls.**

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	3 min	1 x
Denaturierung	95°C	30 s	} 30 – 35 x
Annealing	x	30 s	
Elongation	72°C	30 s / 1 kb	

#### 2.2.4.4.3 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung des Transformationserfolges von *A. tumefaciens* und *E. coli*, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Hierfür wurde Material der Einzelkolonien entweder mit einem sterilen Zahnstocher oder mittels 96er-Metallstempel in das Reaktionsvolumen von 25 µl überführt. Nachfolgend sind in den Tabellen der Reaktionsansatz sowie die Reaktionsbedingungen aufgeführt. Die Annealingtemperaturen (Tabelle 7) variierten je nach verwendetem Primerpaar (Anhang A.3).

**Tabelle 7: Reaktionsansatz der Kolonie-PCR.**

Reagenz (Stammkonzentration)	Menge im Ansatz	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
Williams Puffer (10 x)	1 x	2,5 µl
dNTP Mix (2 mM)	200 µM	2,5 µl
Forward Primer (5 µM)	0,25 µM	1,25 µl
Reverse Primer (5 µM)	0,25 µM	1,25 µl
DCSPol DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 U	0,1 µl
H <sub>2</sub> O		ad 25 µl

**Tabelle 8: Reaktionsbedingungen der Kolonie-PCR.**

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	5 min	1 x
Denaturierung	94°C	30 s	} 30 x
Annealing	x	45 s	
Elongation	72°C	30 s / 1 kb	
Elongation	72°C	10 min	1 x

#### 2.2.4.4.4 PCR mit IRD-markierten Primern

Die PCR zur Amplifikation der Bindestellen der TALEN Konstrukte wurde mit IRD700-markierten Forward-Primern (5'-DY682) durchgeführt. Hierfür wurde der in Tabelle 9 aufge-

fürte Reaktionsansatz verwendet. Die Bedingungen der Reaktionsind in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 9: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation der Bindestellen der TALEN Konstrukte.**

Reagenz (Stammkonzentration)	Menge im Ansatz	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
MyTaq Reaktions-Puffer*(5 x)	1 x	5,0 µl
Forward Primer** (5 µM)	0,5 µM	2,0 µl
Reverse Primer (5 µM)	0,5 µM	2,0 µl
MyTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	1,25 U	0,25 µl
DNA (10 ng/µl)	10 ng	1,0 µl
H <sub>2</sub> O		ad 25 µl

\* Puffer enthält 5 mM dNTPs und 15 mM MgCl<sub>2</sub>.

\*\*Forward Primer mit IRD700-Markierung (5'-DY682).

**Tabelle 10: PCR-Bedingungen zur Amplifikation der Bindestellen der TALEN Konstrukte.**

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	3 min	1 x
Denaturierung	95°C	15 s	} 22 x*/40 x**
Annealing	57°C	45 s	
Elongation	72°C	30 s	

\*Verwendete Zyklenzahl zur Überprüfung der stabil transgenen Linien.

\*\*Verwendete Zyklenzahl zur Überprüfung der transienten Infiltrationsversuche.

#### 2.2.4.4.5 M13-PCR

Für die Überprüfung der Bindestellen der CRISPR/Cas Konstrukte wurden genspezifische Primer mit einem M13-*tail* versehen und während der PCR-Reaktion an diese IRD-markierte (IRD700) M13-Primer gebunden (nach Schuelke 2000). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist Tabelle 11 zu entnehmen. In Tabelle 12 sind die Reaktionsbedingungen der M13-PCR aufgeführt. Die Annealingtemperaturen der genspezifischen Primer, die im ersten Schritt der PCR amplifiziert werden, sind dem Anhang A.3 zu entnehmen.

**Tabelle 11: PCR-Reaktionsansatz der M13-PCR zur Amplifikation der Bindestellen der CRISPR/Cas Konstrukte.**

Reagenz (Stammkonzentration)	Menge im Ansatz	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
MyTaq Reaktions-Puffer*(5 x)	1 x	4,0 µl
MyTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	1,0 U	0,2 µl
Forward Primer (5 µM)	0,25 µM	1,0 µl
Reverse Primer** (5 µM)	0,05 µM	0,2 µl
M13-Primer*** (0,25 µM)	0,0125 µM	1,0 µl
DNA (10 ng/µl)	20 ng	2,0 µl
H <sub>2</sub> O		ad 20 µl

\* Puffer enthält 5 mM dNTPs und 15 mM MgCl<sub>2</sub>.

\*\*Reverse Primer mit M13-tail. \*\*\*M13-Primer mit IRD700 Markierung.

**Tabelle 12: Reaktionsbedingungen der M13-PCR zur Amplifikation der Bindestellen der CRISPR/Cas Konstrukte.**

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	3 min	1 x
Denaturierung	95°C	15 s	} 33 x*/40 x**
Annealing	x	15 s	
Elongation	72°C	30 s	
Denaturierung	95°C	15 s	} 9 x*/10 x**
Annealing	52°C	15 s	
Elongation	72°C	30 s	

\*Verwendete Zyklenzahl zur Überprüfung der stabil transgenen Linien.

\*\*Verwendete Zyklenzahl zur Überprüfung der transienten Infiltrationsversuche.

#### 2.2.4.4.6 Proof-reading PCR

Zur Amplifikation der *RhMLO*-Sequenzen für die Klonierung der RNAi Konstrukte und anschließende Sequenzierung nach Sanger der Inserts, als auch für die Reaktion der Amplikons für die anschließende Sequenzierung, wurden Reaktionen mit *proof-reading* Polymerasen durchgeführt. In Tabelle 13 ist der Reaktionsansatz unter Verwendung der TAKARA-PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase (TAKARA Bio Inc., Kusatsu, Japan) aufgeführt, welcher sowohl für die Synthese der Sequenzen zur Klonierung und Sequenzierung nach Sanger, als auch für die Synthese der Amplikons und die PCR zum Anfügen der Tags an die Amplikons verwendet wurde. Verwendete Primer sowie die verwendeten Tags sind im Anhang A.3 aufgeführt.

**Tabelle 13: Reaktionsansatz der *proof-reading* PCR unter Verwendung der TAKARA-PrimeSTAR HS DNA Polymerase.**

Reagenz (Stammkonzentration)	Menge im Ansatz	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
PrimeSTAR Puffer(5 x)	1 x	5,0 µl
dNTP Mix (2,5 mM)	200 µM	2,0 µl
Forward Primer (5 µM)	0,3 µM / 0,2 µM*	1,5 µl / 1 µl*
Reverse Primer (5 µM)	0,3 µM / 0,2 µM*	1,5 µl / 1 µl*
PrimeSTAR Polymerase (2,5 U/µl)	0,625 U	0,25 µl
DNA (variabel)	variabel	variabel
H <sub>2</sub> O		ad 25 µl

\*Eingesetzte Mengen und Volumina bei der Reaktion zur Synthese der Produkte für die Amplikon-Sequenzierung als auch bei der PCR zum Anfügen der tags für die Sequenzierung.

Von der Plasmid-DNA wurden jeweils 0,1 ng pro Reaktion eingesetzt und von genomischer DNA 20 ng. Sowohl die Reaktionen für die Produkte der Amplikon-Sequenzierung, als auch die zum Anfügen der Tags, wurden jeweils mit doppelten Volumina angesetzt (Tabelle 13). Die Bedingungen der PCR-Reaktionen unterschieden sich zwischen den unterschiedlichen Ansätzen. In Tabelle 14 sind die Bedingungen zur Amplifikation der *RhMLO*-Sequenzen für die Klonierung in den RNAi-Vektor und anschließende Amplifikation der Inserts zur Sequenzierung aufgeführt, in Tabelle 15 die Bedingungen für die Amplikon-Synthese und in Tabelle 16 die Bedingungen der PCR zum Anfügen der Tags an die Amplikons.

**Tabelle 14: Reaktionsbedingen der *proof-reading* PCR zur Amplifikation der *RhMLO*-Sequenzen für die Klonierung mit der PrimeSTAR Polymerase.**

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	98°C	10 s	} 35 x
Annealing	55°C	15 s	
Elongation	72°C	45 s	

**Tabelle 15: Bedingungen der *proof-reading* PCR zur Synthese der Amplikons mit der PrimeSTAR Polymerase.**

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	98°C	10 s	} 30 x – 35 x
Annealing	55-60°C	10 s – 15 s	
Elongation	72°C	30 s	

**Tabelle 16: Bedingungen der *proof-reading* PCR zum Anfügen der Tags an die Amplikons mit der PrimeSTAR Polymerase.**

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	98°C	1 min	1 x
Denaturierung	98°C	10 s	} 12 x
Annealing	55°C	10 s	
Elongation	72°C	10 s	
Elongation	72°C	1 min	1 x

Die Bedingungen der Amplikonsynthese wurden zur optimalen Ausbeute an Amplifikaten leicht für die verschiedenen Primer variiert (siehe Tabelle 15). Bei Primern, die auch unter angepassten Bedingungen keine hohen Ausbeuten an Amplifikaten erbrachten, wurde die Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA) verwendet. Reaktionsansatz und Bedingungen sind Tabelle 17 und Tabelle 18 zu entnehmen.

**Tabelle 17: Reaktionsansatz der *proof-reading* PCR unter Verwendung der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase.**

Reagenz (Stammkonzentration)	Menge im Ansatz	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
Phusion HF Puffer (5 x)	1 x	5,0 µl
dNTP Mix (2 mM)	200 µM	2,5 µl
Forward Primer (5 µM)	0,2 µM	1,0 µl
Reverse Primer (5 µM)	0,2 µM	1,0 µl
Phusion Polymerase (2,5 U/µl)	0,625 U	0,25 µl
DNA (10 ng/µl)	20 ng	2 µl
H <sub>2</sub> O		ad 25 µl

**Tabelle 18: Bedingungen der *proof-reading* PCR zur Synthese der Amplikons mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase.**

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	98°C	1 min	1 x
Denaturierung	98°C	10 s	} 35 x
Annealing	55°C – 60°C	15 s	
Elongation	72°C	30 s	
Elongation	72°C	1 min	1 x

#### 2.2.4.4.7 q-RT-PCR

Für die q-RT-PCR Analysen wurden die Reaktionen mit dem Takyon<sup>™</sup> Rox SYBR Master-Mix dTTP Blue Kit von Eurogentec (Seraing, Belgien) nach Herstellerangaben angesetzt (Tabelle 19). Für jede Probe wurde der Mastermix mit cDNA angesetzt und in die Microtiter-

Platte aliquotiert. Die Primer wurden zum Schluss hinzugegeben. Jede Probe-Primer-Kombination wurde in drei technischen Wiederholungen durchgeführt.

**Tabelle 19: Reaktionsansatz der q-RT-PCR Analysen.**

Reagenz (Stammkonzentration)	Menge im Ansatz	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
Takyon™ MasterMix (2 x)	1 x	5,0 µl
Forward Primer (2,5 µM)	0,25 µM	1,0 µl
Reverse Primer (2,5 µM)	0,25 µM	1,0 µl
cDNA	-	1,0 µl
H <sub>2</sub> O	-	ad 10 µl

Die Bedingungen der quantitativen 2-Step PCR (nach Herstellerangaben) sind in der nachfolgenden Tabelle 20 aufgeführt. Die Annealingtemperaturen der verwendeten Primer sind dem Anhang A.3 zu entnehmen.

**Tabelle 20: Reaktionsbedingungen der q-RT-PCR.**

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Takyon Aktivierung	95°C	3 min	1 x
Denaturierung	95°C	10 s	} 40 x
Annealing / Elongation	x°C	60 s	

## 2.2.4.5 Auftrennung der Nukleinsäure nach Größe

### 2.2.4.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der amplifizierten PCR-Produkte und anschließende Visualisierung mittels Agarose-Gelelektrophorese folgte der Standardmethode nach Sambrook und Russel (2001). PCR-Produkte wurden mit 10 Vol.-% Ladepuffer (Ladepuffer der Agarose-Gelelektrophorese, Anhang A.2) versetzt und in 1,5 % (w/v) bis 3,5 % (w/v) Agarosegelen in 1 x TAE Puffer (Anhang A.2) bei ~6,7 V pro cm der Größe nach aufgetrennt. Zur Visualisierung wurden die Agarosegele mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid oder 0,25 µg/ml Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland) versetzt und nach der Elektrophorese unter UV-Licht des Transilluminators mit der Intas GDS Software (Göttingen, Deutschland) aufgenommen. Als Größenstandards wurden die GeneRuler™ 1kb DNA Ladder und GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder von ThermoScientific (Carlsbad, USA) eingesetzt.

### 2.2.4.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Visualisierung der Produkte der PCR-Reaktionen mit IRD700-markierten Primern (siehe Punkte 2.2.4.4.4 und 2.2.4.4.5) wurde mit Polyacrylamid-Gelen (PAA-Gele) in 4200 und 4300 Sequencern von LI-COR (Lincoln, USA) durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden 2,5 µl PCR-Produkt mit 100 µl Ladepuffer (Ladepuffer der PAA-Gele, Anhang A.2) versetzt und im Thermocycler bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Jeweils 0,5 µl Probenvolumen der PCR-Reaktionen mit markierten Primern der TALEN-Bindestellen wurden auf 8 % PAA-Gelen und die der M13-PCR der CRISPR/Cas-Bindestellen auf 6 % PAA-Gelen in 1 x TBE Puffer (Anhang A.2) aufgetrennt. Für die Zusammensetzung der PAA-Gele wurde das Rotiphorese<sup>®</sup> Sequenzier-Gelsystem der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) verwendet, die Zusammensetzung ist der nachfolgenden Tabelle 21 zu entnehmen.

**Tabelle 21: Zusammensetzung der PAA-Gele.**

Reagenz	6 % PAA-Gel	8 % PAA-Gel
Sequenziergel-Verdünner*	11,2 ml	9,6 ml
Sequenzier-Gelkonzentrat*	4,8 ml	6,4 ml
Sequenziergel-Pufferkonzentrat*	2,0 ml	2,0 ml
H <sub>2</sub> O	2,0 ml	2,0 ml
10 % Ammoniumpersulfatlösung	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
	20,11 ml	20,11 ml

\* Rotiphorese<sup>®</sup> Sequenzier-Gelsystem der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Die Reagenzien der PAA-Gele wurden in der in Tabelle 21 aufgeführten Reihenfolge zusammengeführt und zwischen zwei 25 cm lange Glasplatten mit einem Abstand von 0,25 mm gegossen. Die Polymerisation erfolgte für mindestens vier Stunden bei Raumtemperatur. Nachfolgend listet Tabelle 22 die Laufbedingungen der PAA-Gele auf.

**Tabelle 22: Laufbedingungen der PAA-Gele.**

	6 % PAA-Gel	8 % PAA-Gel
<b>Vorlauf</b>		
Spannung	1500 V	1500 V
Stromstärke	35 mA	35 mA
Leistung	35 W	42 W
Zeit	20 min	20 min
Temperatur	45°C	48°C
<b>Lauf</b>		
Spannung	1500 V	1500 V
Stromstärke	35 mA	35 mA
Leistung	35 W	42 W
Zeit	6 h	8 h
Temperatur	45°C	48°C
Scan Geschwindigkeit	langsam	moderat

#### 2.2.4.6 Ligation

Die Ligation der PCR-Fragmente in die Plasmide wurde mit dem In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Plus Kit von Clontech (Takara Bio USA, Mountain View, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür mussten zunächst die mittels *proof-reading* PCR (2.2.4.4.6, Primer im Anhang A.3 aufgeführt) amplifizierte Fragmente der *RhMLO* Gene aufgereinigt werden. Dies erfolgte mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) gemäß Herstellerangaben.

Der p9U10-RNAi Vektor wurde mittels Restriktionsverdau linearisiert und das Fragment des *GUS* Gens, welches zwischen die beiden flankierenden 35S Promotoren gesetzt war, herausgeschnitten. Für den Doppelverdau des Vektors wurden die Enzyme HindIII und BamHI (beide von ThermoScientific, Carlsbad, USA) eingesetzt. Die Reaktionszusammensetzung ist der nachfolgenden Tabelle 23 zu entnehmen.

**Tabelle 23: HindIII und BamHI Verdau des p9U10-RNAi Vektors.**

Reagenz (Stammkonzentration)	Menge im Ansatz	Eingesetztes Volumen
p9U10-RNAi Vektor-DNA (1 µg/µl)	2 µg	2 µl
10 x BamHI Puffer	1 x	2 µl
HindIII (10 U/µl)	0,5 U	1 µl
BamHI (10 U/µl)	0,25 U	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	-	ad 20 µl

Für den Mix aus Tabelle 23 wurde zunächst nur das Enzym HindIII zugesetzt und nach 3,5 Stunden bei 37°C BamHI hinzugefügt, bevor der Restriktionsansatz über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Nach dem Verdau erfolgte die Auftrennung des Vektors und des geschnittenen *GUS* Fragmentes mittels Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.5.1). Hierfür wurde ein

0,8% (w/v) Agarosegel verwendet und das gesamte Reaktionsvolumen mit Ladepuffer versetzt aufgetragen. Die Bande des Vektors wurde aus dem Gel ausgeschnitten und der Vektor mit dem GeneJET Gel-Extraktionskit von ThermoScientific (Carlsbad, USA) gemäß Herstellerangaben aus der Gel-Matrix gelöst und aufgereinigt. Die Quantifizierung erfolgte im Anschluss mittels Spektrophotometer (siehe 2.2.4.1).

Für das Ansetzen des Ligationsmixes wurden die Herstellerangaben des In-Fusion® HD Cloning Plus Kits von Clontech (Takara Bio USA, Mountain View, USA) befolgt, siehe hierzu Tabelle 24. Der Ligationsmix wurde im Anschluss direkt für die Transformation von *E. coli* Zellen eingesetzt (siehe 2.2.2.1).

**Tabelle 24: Reaktionsmix der Ligation der RhMLO-RNAi Fragmente in den Vektor p9U10-RNAi.**

Reagenz	Menge im Ansatz	Eingesetztes Volumen
PCR-Fragment, aufgereinigt	50 – 100 ng	variabel
linearisierter p9U10-RNAi Vektor	50 – 100 ng	variabel
5 x In-Fusion HD Enzyme Premix	1 x	2 µl
H <sub>2</sub> O	-	ad 10 µl

#### 2.2.4.7 Probenvorbereitung für die Sequenzierung nach Sanger

Zur Überprüfung des Inserts von ausgewählten Plasmiden mittels Sequenzierung nach Sanger (siehe Lottspeich und Zorbas 1998), wurden 400 - 500 ng DNA in 5 µl und mit 5 µl (5 pmol/µl) Insert-flankierende Primer (siehe Anhang A.3) versetzt und an die Firma GATC (Köln, Deutschland) versendet. Die Sequenz-Daten wurden als Download bereitgestellt.

#### 2.2.4.8 Probenvorbereitung für die Amplikon-Sequenzierung

Die Produkte für die Amplikon-Sequenzierung wurden in zwei separaten PCR-Reaktionen amplifiziert (siehe 2.2.4.4.6), die anschließend zu gleichen Teilen gepoolt wurden. In einer zweiten PCR-Reaktion erfolgte die Anfügung spezifischer Tags an die Produkte. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt, wobei die Inkubation des Waschpuffers für 5 min erfolgte und die Proben in 35 µl Elutionspuffer eluiert wurden. Die aufgereinigten Proben wurden mittels Spektrophotometer quantifiziert (siehe 2.2.4.1) und die Proben im Anschluss äquimolar gepoolt, so dass Proben mit Nuklease-spezifischen Sequenzen in doppelter Konzentration im Vergleich zu denen zur off-target Bestimmung im Gesamt-Pool vorlagen. Die Sequenzierung der Amplikons (Illumina MiSeq) erfolgte durch die Firma LGC Genomics

(Berlin, Deutschland). Die Sequenzdaten wurden getrimmt, die *forward* und *reverse* Reads vereinigt (*merged*, als Paired-Reads) und nach Tags sortiert bereitgestellt.

## 2.2.5 Bioinformatische und rechnergestützte Methoden

### 2.2.5.1 Primererstellung

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit dem Online Tool Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) erstellt. Der GC Gehalt wurde in einem Bereich von 40 % bis 60 % gewählt, mit einem Optimum von 50 %. Die restlichen Parameter wurden gemäß den Voreinstellungen belassen. Primer für Sanger-Sequenzierungen wurden so gewählt, dass sie mindestens 50 bp vom Insert entfernt liegen und Primer für die Amplikon-Sequenzierung so, dass Produkte von 190 bp bis 300 bp amplifiziert werden. Außerdem wurde darauf geachtet, dass alle Primer zur Amplifikation der TALEN und CRISPR/Cas Bindestellen spezifisch für alle Allele des jeweiligen *RhMLOs* sind, nicht jedoch die anderen drei nah-verwandten *RhMLOs* derselben Klade binden, welches mittels PCR überprüft wurde.

Die Primer der q-RT-PCR wurden von Frauke Schürmann in Rahmen ihrer MSc. Arbeit erstellt und überprüft (Schürmann 2015).

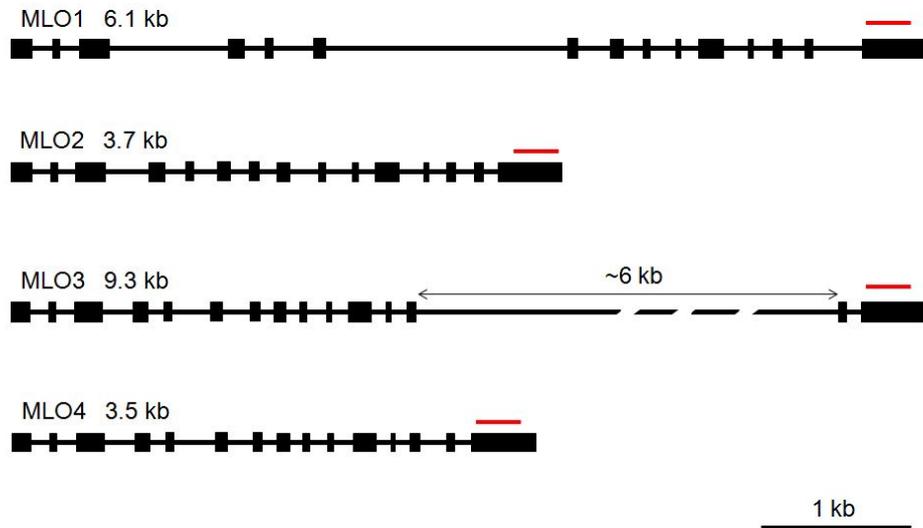
Die Synthese der Primer erfolgte bei der Firma Mycosynth (Balgach, Schweiz). IRD-markierte Primer wurden mit einer 700er Markierung am 5'-Ende (5'-DY682) bei der Firma Eurofins (Luxemburg, Luxemburg) in Auftrag gegeben.

### 2.2.5.2 Vektorerstellung

#### 2.2.5.2.1 RNAi Vektoren

Die Fragmente für die RNAi Vektoren der *RhMLO* Gene wurden mit Primern amplifiziert, die eine Diskriminierung zwischen den *RhMLOs*, nicht jedoch zwischen den Allelen der einzelnen Gene zuließen. Die Primer besaßen des Weiteren Überhänge zur Sequenz des Vektors p9U10-RNAi (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland) an der BamHI und HindIII Restriktionsschnittstelle für die Ligation der Fragmente in den Vektor (siehe 2.2.4.6 und Anhang A.3). Aufgrund der hohen Übereinstimmungen zwischen *RhMLO3* und *RhMLO4* wurde für beide Gene ein Fragment amplifiziert, das mit 99,3 % Übereinstimmung beide simultan regulieren sollte (im folgenden *RhMLO3/4-RNAi* genannt). Die Übereinstimmungen zwischen den Allelen der jeweiligen *RhMLOs* lagen bei einem Minimum von 98 % und die Identitäten der Fragmente zwischen den verschiedenen *RhMLO* Genen bei 50 % bis maximal 60 %. Die Sequenzabschnitte für die RNAi Konstrukte waren jeweils im variablen C-Terminus der

*RhMLO* Gene lokalisiert (Exon 15) und wiesen folgende Längen auf: RhMLO1-RNAi 283 bp, RhMLO2-RNAi 291 bp und RhMLO3/4-RNAi 311 bp. Siehe hierzu Abbildung 7 und auch Geike et al. (2015).



**Abbildung 7: Genstruktur der vier der *RhMLOs* und Lokalisation der klonierten Fragmente in den Vektor p9U10-RNAi.**

Die schwarzen Boxen stellen die 15 Exons der *RhMLO* Gene dar, die Linien die Intron-Bereiche. Die roten Balken über Exon Nr. 15 markieren die klonierten Fragmente der Gene, die in den Vektor p9U10-RNAi kloniert wurden. Der schwarze Balken gibt den Maßstab von 1 kb Länge an. Abbildung aus Geike et al. 2015, leicht verändert nach Kaufmann et al. 2012.

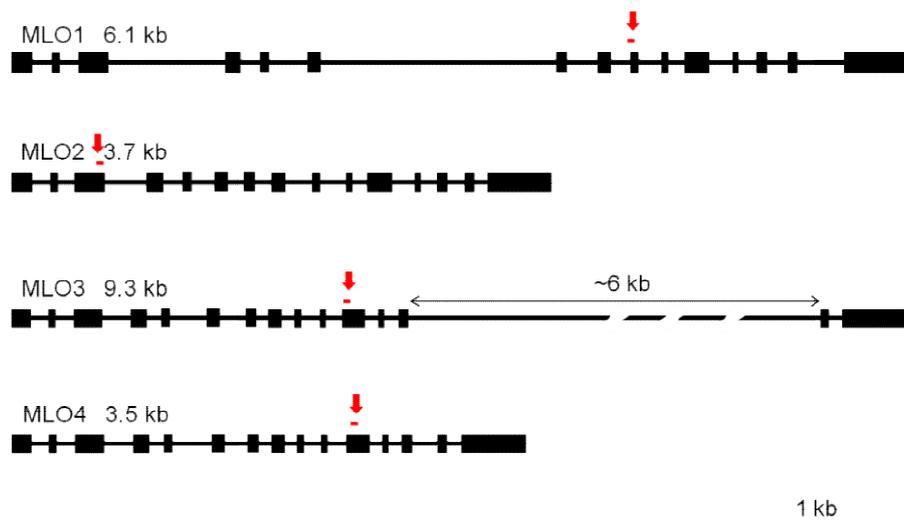
#### 2.2.5.2.2 CRISPR/Cas Vektoren

Die CRISPR/Cas Konstrukte wurden beim DNA Cloning Service (Hamburg, Deutschland) in Auftrag gegeben. Die *Spacer* Sequenzen der sgRNAs wurde mit Hilfe des Online gRNA Designers von DNA2.0 ([www.dna20.com](http://www.dna20.com), jetzt Atum [www.atum.bio](http://www.atum.bio)) bestimmt. Hierbei wurde die Verwendung von Nickase Konstrukten und als PAM-Sequenz „NGG“ ausgewählt. Die in dieser Arbeit verwendeten p9io-35SCas10 und p9io-UbiCas10 Konstrukte (Anhang A.1) basieren auf einer mutierten Cas9 Sequenz, die als zehnte Aminosäure anstelle eines Alanins eine Asparaginsäure aufweist. Die Veränderung bewirkt, dass die Cas9n Endonuklease (Cas9D10A) anstelle eines Doppelstrangbruches nur einen Einzelstrangbruch (*Nick*) verursacht. Aufgrund dieser Eigenart sind für jedes Ziel-Gen zwei sgRNAs nötig, die jeweils zum Plus- und Minusstrang homolog sind und somit einen Bruch der Doppelhelix ermöglichen. Die Bestimmung der *Spacer* Sequenz der sgRNAs erfolgte anhand von gDNA und cDNA Sequenzen der *RhMLOs*, wobei darauf geachtet wurde, dass sie nicht auf Intron/Exon-Grenzen lagen und zwischen den Allelen der *RhMLOs* maximal zwei Fehlpaarungen am PAM-distalen Ende sowie zwischen den *RhMLOs* der Klade mindestens 5 Fehlpaarungen in der Sequenz vorlagen (vorzugsweise in direkter Nähe zur PAM Sequenz), um die Spezifität

zu gewährleisten. Die hohen Übereinstimmungen zwischen *RhMLO3* und *RhMLO4* ließen auch hier keine Diskriminierung zwischen beiden Genen zu, so dass sgRNAs homolog zu beiden bestimmt wurden. Im Folgenden werden die Konstrukte CCMlo1, CCMlo2 und CCMlo3/4 (erste Generation unter Kontrolle des 35S Promotors), bzw. CCMlo1n, CCMlo2n und CCMlo3/4n (zweite Generation unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus *A. thaliana*) genannt, wobei Konstrukte der ersten und zweiten Generation die gleich sgRNA trugen. Die Lage der *Protospacer* Sequenz (Ziel-Region) der jeweiligen Konstrukte befindet sich bei *RhMLO1* in Exon 9, bei *RhMLO2* in Exon 3 und bei *RhMLO3* und *RhMLO4* jeweils in Exon Nummer 11. In der nachfolgenden Tabelle 25 sind die *Spacer* Sequenzen der CRISPR/Cas Konstrukte aufgeführt und in Abbildung 8 ist die Lage der *Protospacer* in der Genstruktur der *RhMLO* Gene abgebildet.

**Tabelle 25: *Spacer* Sequenzen der sgRNAs der verwendeten CRISPR/Cas Konstrukte.**

Konstrukt	<i>Spacer</i> Sequenz sgRNA 1	<i>Spacer</i> Sequenz sgRNA 2
CCMLO1(n)	TTTCTACTCTTTAATAACTCATGG	GGGAGGTTAAACCCCAAACGGC
CCMLO2(n)	GCAGCCGGATATGACAAATGCGG	GGCCACTCTCACGGGCTGCACAA
CCMLO3/4(n)	TTATAACCATGATGGGGATGAGG	GGAGAACCACCCTTGATTTGATG



**Abbildung 8: Lage der *Protospacer* der CRISPR/Cas Konstrukte in der Genstruktur der *RhMLOs*.**

Die schwarzen Boxen stellen die 15 Exons der vier *RhMLO* Gene dar, die Linien jeweils die Introns. Die Ziel-Regionen (Lage der *Protospacer*) der CRISPR/Cas Konstrukte sind mit roten Balken und zusätzlich mit Pfeilen markiert. Abbildung leicht verändert aus Kaufmann et al. 2012.

### 2.2.5.3 Bearbeitung von Sequenzen

Die Bearbeitung der nach Sanger sequenzierten Sequenzen, und auch der Deletions- und Insertionsvarianten der Amplikonsequenzierung, erfolgte mit dem Programm BioEdit (Version 7.2.5, Hall 1999). Hierzu wurden anhand der Chromatogramme der Sanger-Sequenzierung unklar bestimmte Basen am 3' und 5' Ende der Sequenz getrimmt und *forward* und

*reverse* Reads zusammengefügt. Alignments wurden mit den Funktionen „Pairwise alignment“ und „ClustalW multiple Alignment“ unter Verwendung der Voreinstellungen und manueller Nachjustierung durchgeführt. Für die Darstellung von Sequenzen wurde das Programm GeneDoc (Version 2.7, Nicholas und Nicholas 1997) verwendet und die vorherige Umwandlung der .fasta Dateien in .msf Dateien wurde unter Verwendung des ClustalX Programms (Version 2.0.11, Thompson et al. 1994) getätigt.

#### 2.2.5.4 Bearbeitung und Auswertung der Amplikon-Sequenzierung

Die Auswertung der Amplikonsequenzen erfolgte mit dem Programm CLC Genomics Workbench Version 9.5.2 (Qiagen, Hilden, Deutschland). Hierfür wurden die verschiedenen Pools mit der Funktion „maps to reference“ gegen die Referenzsequenzen gemappt, wobei als Referenz die jeweilige Wildtyp-Sequenz der Amplikons genutzt wurde. Mit dem Mapping wurde ein lokales Re-Alignment durchgeführt und mittels der Funktion „low variant detection“ die verschiedenen Varianten des Pools detektiert. Bei den Proben der CRISPR/Cas Linien stellte sich dieses Verfahren aufgrund der multiplen Insertionen und Deletionen als nicht praktikabel heraus, da das Mapping nicht akkurat durchgeführt wurde. Daher wurden die Pools in drei Sub-Pools unterteilt, mit denen das Mapping wiederholt wurde. Diese enthielten Sequenzen gleicher, kleinerer und größerer Länge im Vergleich zur Referenzsequenz. Im Anschluss daran wurden das lokale Re-Alignment und die Varianten-Detektion durchgeführt. Bei den Proben von Linien des Konstrukts CCMlo2 wurde zusätzlich die Funktion der „guidance tracks“ zur Optimierung während des „local realignments“ vor der Varianten Detektion gewählt, um das Mapping zu optimieren. Als *tracks* wurden hierfür randomisiert Sequenzen mit jeweils verschiedenen Insertionen und Deletionen aus den Sub-Pools verwendet. Die Parameter für das Mapping sind in der nachfolgenden Tabelle 26 angegeben. Für die Varianten-Detektion wurde ein Grenzwert von 1,0 % gewählt, um mögliche falschpositive Varianten durch Fehler während der PCR-Reaktionen und/oder der Sequenzierung auszuschließen.

**Tabelle 26: Mapping Parameter der Amplikonsequenzen.**

	Standard-einstellung	Einstellungen Subset < Referenzsequenz	Einstellungen Subset > Referenzsequenz
Match score	3	3	3
Mismatch cost	3	3	3
Insertion open cost	3	5	2
Insertion extend cost	1	1	1
Deletion open cost	3	2	5
Deletion extend cost	1	1	1
Length fraction	0,6	0,7	0,7
Similarity fraction	0,9	0,8	0,8

### 2.2.5.5 Statistische Auswertungen

Für die statistische Auswertung der Daten der quantitativen Inokulationen wie auch der q-RT-PCR Analysen wurde das Programm R Studio (Version 3.2.4, R Core Team 2016) unter Verwendung der Pakete ggplot2 (Wickham 2009) und lsmeans (Lenth 2016) verwendet.

Die Daten der q-RT-PCR Analysen wurden zunächst durch das Programm StepOnePlus™ (Version 2.3, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) verarbeitet. Hierbei wurden zunächst manuell Ausreißer ausgeschlossen und mit dem Programm LinRegPCR Software (Version 2016.1, Ramakers et al. 2003, Ruijter et al. 2009) die Primereffizienzen für jede Reaktion bestimmt. Mit diesen Werten wurde für jede Probe der RQ-Wert (relative Expression) zu der Kontrolle unter Verrechnung zweier Referenzgene (UBC, SAND; vergleiche Klie 2011) bestimmt. Die RQ-Werte (basierend jeweils auf drei technischen Wiederholungen) der drei biologischen Wiederholungen wurden anschließend für die statistischen Analysen mit R herangezogen. Die Daten wurden hierfür log-transformiert (natürlicher Logarithmus zur Basis e) und auf Basis eines linearen Modells signifikante Unterschiede im Mittelwertsvergleich und ANOVA zur Kontrolle untersucht ( $\alpha = 0,05$ ). Die p-Werte der Mittelwertsvergleiche wurden dafür mittels Dunnet-Tests adjustiert.

Für die Analysen der Daten der quantitativen Inokulationen transient infiltrierter Petalen, wurde über ein generalisiertes lineares gemischtes Modell der mittlere Anteil der myzelbildenden Konidien an der Gesamtanzahl der gekeimten Konidien unter Annahme einer Binomialverteilung geschätzt. Die Schätzung erfolgt auf dem logit link. Zur Überprüfung der Gesamteffekte wurde eine ANOVA durchgeführt. Zusammengefasst über die vier Wiederholungen wurden die Anteile der myzelbildenden Konidien der mit den RhMLO-RNAi Konstrukten infiltrierten Proben zur GUS-RNAi Kontrolle verglichen. Hierfür wurden das generalisierte lineare Modell unter der Annahme einer Poisson-Verteilung und die R-Funktion lsmeans herangezogen und die p-Werte nach Dunnett adjustiert.

Für die statistischen Analysen der quantitativen Inokulationen der transgenen RhMLO-RNAi Linien wurde über ein generalisiertes lineares gemischtes Modell die mittlere Anzahl der myzelbildenden Konidien unter Annahme einer Poisson-Verteilung geschätzt. Die Schätzung erfolgte auf dem log link. Mittels ANOVA und F-Test Analyse wurde auf die Gesamteffekte getestet. Die Effekte der einzelnen Linien und der Gruppen der jeweiligen RhMLO-RNAi Konstrukte erfolgte über ein generalisiertes lineares Modell unter der Annahme einer Poisson-Verteilung und der Funktion lsmeans. Auch hier wurden die p-Werte nach Dunnett adjustiert. Die R Codes der Analysen sind im Anhang aufgeführt (Anhang A.6 und A.7).

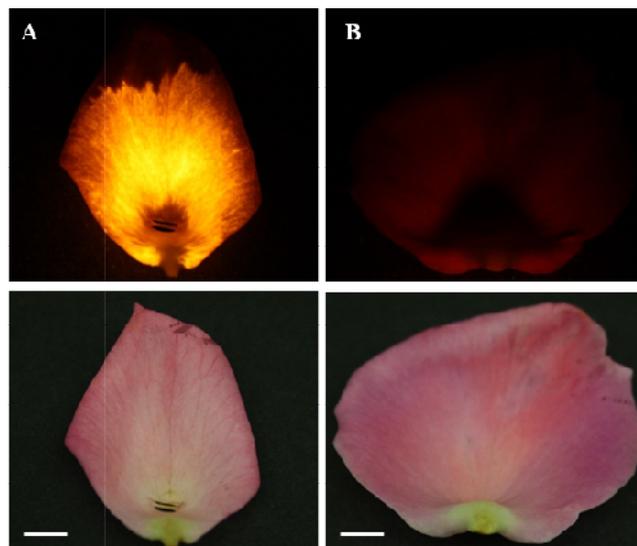
## 3 Ergebnisse

### 3.1 RNAi-basierte Methoden zur Regulierung der *RhMLO* Gene

#### 3.1.1 Transiente Transformation der *RhMLO*-RNAi Konstrukte

##### 3.1.1.1 Transiente Transformationsexperimente

Die unter 2.2.5.2.1 beschriebenen *RhMLO*-RNAi Konstrukte wurden für den transienten Test zur Überprüfung ihrer Funktion herangezogen. Hierzu wurden Petalen der Rosensorte 'Pariser Charme' transient mit einer Suspension aus dem jeweiligen RNAi Konstrukt im gleichen Verhältnis gemischt mit einem dsRed Reportergen-Konstrukt infiltriert. Nach sechs Tagen wurde der Erfolg der Transformation anhand des dsRed-Signals unter LED-Licht überprüft. Abbildung 9 zeigt eine mit dem dsRed Konstrukt infiltriert Petale unter LED-Licht im Vergleich zu einer nicht-transgenen Kontrolle.



**Abbildung 9: Mit dem dsRed-Kontrollkonstrukt infiltrierte Petale von 'Pariser Charme' unter LED-Licht im Vergleich zur Kontrolle.**

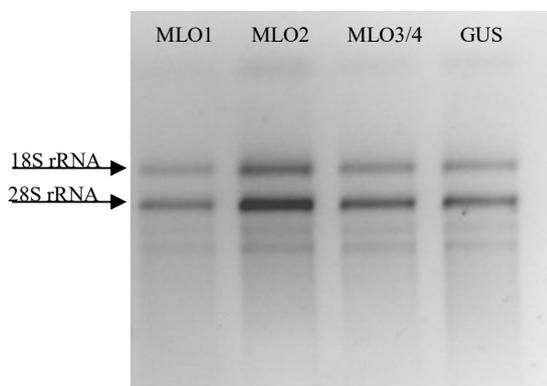
A) Agro-infiltrierte Petale von 'Pariser Charme' mit dem Vektor pRedU10 unter LED-Licht (oben) und Tageslicht (unten) im Vergleich zu B) nicht-infiltrierte Petale unter LED-Licht (oben) und Tageslicht (unten); Maßstabsbalken = 0,5 cm.

Aus Abbildung 9 wird das deutliche dsRed-Signal der infiltrierten Petale (A) unter LED-Licht im Vergleich zur Kontrolle (B) ersichtlich. Es ist auffällig, dass nicht alle Bereiche der infiltrierten Petale ein dsRed-Signal aufweisen. Daher wurden nur solche Teile der Petalen für nachfolgende Analysen beprobt, die ein starkes dsRed-Signal aufwiesen. Die nicht dsRed positiven Bereiche wurden bei der Probennahme verworfen. Die Infiltrations/Inokulationsversuche wurden insgesamt viermal wiederholt (Versuche 1, 2 3 und 4), wobei von jeweils

sechs (Versuch 1) bis 12 (Versuch 2, 3, und 4) unterschiedlichen Blüten geerntet und die inneren Petalen infiltriert wurden.

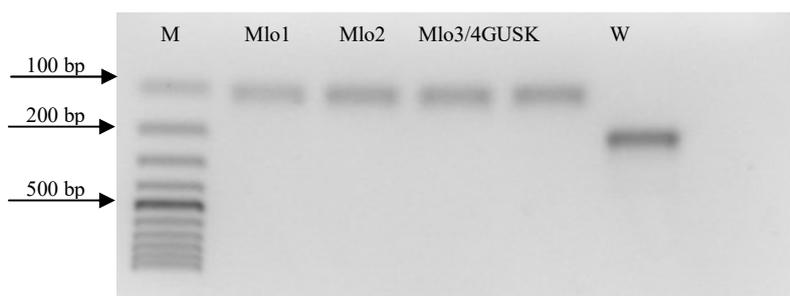
### 3.1.1.2 Expressionsanalysen der transienten Transformation

Von einem Teil der behandelten Petalen wurden die positiven Bereiche für die Isolation von RNA und anschließender reversen Transkription zur Herstellung von cDNA verwendet. Hierzu wurde bei jeder der vier Versuchs-Wiederholungen Material von mindestens drei unterschiedlichen Petalen gesammelt und die RNA dieser Mischprobe isoliert. Nachfolgend sind repräsentativ die Ergebnisse der Qualitätskontrolle der isolierten RNA mittels Gel-Elektrophorese (Abbildung 10) als auch die Kontrolle auf Integrität der cDNA und mögliche Verunreinigungen mit gDNA der Proben von Versuch 2 abgebildet (Abbildung 11).



**Abbildung 10: Agarosegelelektrophorese der RNA-Proben der transienten Infiltration der RhMLO-RNAi Konstrukte von Versuch 2 zur Qualitätskontrolle.**

Beispielhafte Darstellung der Proben der RNA-Isolation des Infiltrations/Inokulations-Versuches 2; MLO1, MLO2 und MLO3/4 bezeichnen die mit dem RhMLO-RNAi Konstrukt infiltrierte Probe, GUS für die mit dem GUS-RNAi Konstrukt infiltrierte Probe; die Pfeile markieren die Banden der 18S und 28S rRNA.



**Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese der GAPDH-PCR mit synthetisierter cDNA der Proben der transienten Infiltration der RhMLO-RNAi Konstrukte von Versuch 2.**

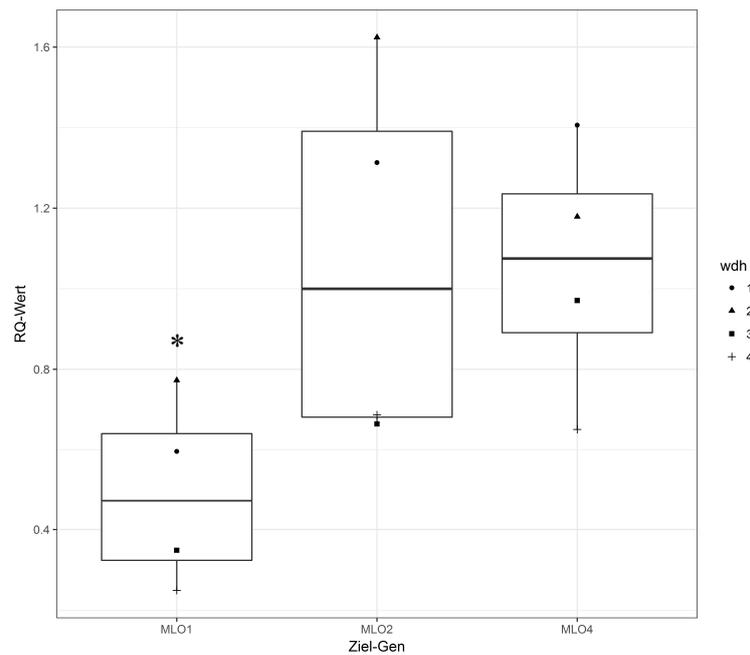
Aufgetragen sind die Produkte der GAPDH-PCR der cDNA Proben der mit den RhMLO-RNAi infiltrierten (MLO1, MLO2, MLO3/4) und dem GUS-RNAi Konstrukt (GUS) infiltrierten Proben von Versuch 2; K: genomische DNA von 'Pariser Charme'; W: Wasser-Kontrolle; M: GeneRuler 100bp DNA ladder (Thermo Scientific).

Aus beiden oben stehenden Abbildungen geht hervor, dass die RNA intakt und ohne Kontaminationen von gDNA vorlag. Die Reinheit und Qualität der RNA wurden zusätzlich mittels Messungen am NanoDrop (Thermo Scientific) bestimmt (Daten nicht aufgeführt).

Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass die Isolation von intakter RNA mit Werten, die für eine hohe Reinheit sprechen, sich schwierig gestaltete. Dies lag zum einen an der Infiltration mit der *Agrobacterium*-Suspension und zum anderen an der Inkubationszeit von von sechs Tagen. Beide Faktoren führten zu einer Verschlechterung des zu isolierenden Materials und folglich auch zu schlechteren Qualitäten der isolierten RNA. In den meisten Fällen konnte durch die Verwendung von Parallelproben ausreichend gute RNA, wie in Versuch 2 (siehe oben), isoliert werden.

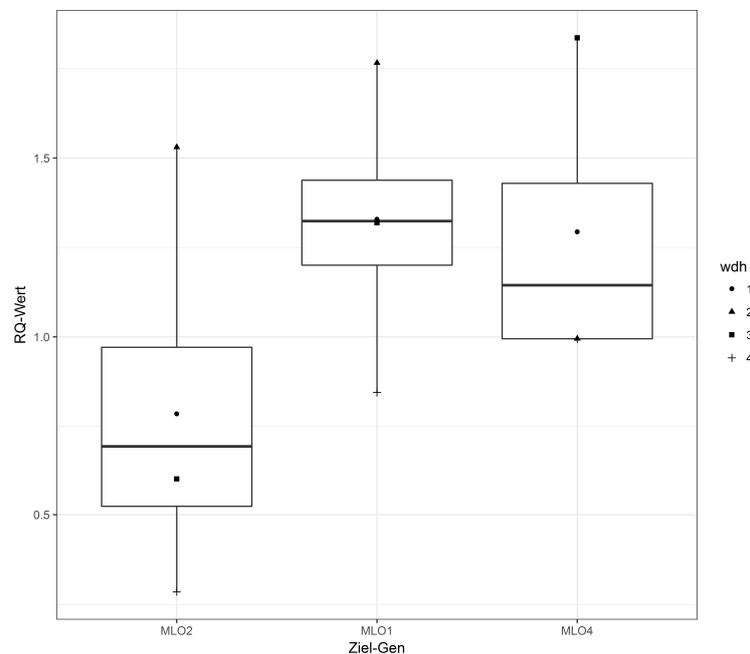
Mit den cDNA Proben wurden q-RT-PCR Experimente zur Bestimmung der Genexpression der vier *RhMLOs* in den infiltrierten Petalen durchgeführt. Hierbei sollte geklärt werden, ob eine Infiltration des RNAi Konstrukts zu einer Herunterregulierung des jeweiligen *RhMLOs* führte, ohne einen Einfluss auf die anderen, nicht durch das Konstrukt abgezielten *RhMLOs*, zu haben. Aus Gründen des Plattendesigns und der Annealingtemperatur der Primer wurde nur die Expression von *RhMLO1*, *RhMLO2* und *RhMLO4* im Vergleich zur GUS-Kontrolle untersucht. Aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmungen von *RhMLO3* und *RhMLO4* sollten beide Gene simultan durch das Konstrukt RhMLO3/4-RNAi reguliert werden. Dieses wurde in Vorversuchen nachgewiesen, weshalb hier die Spezifität des Konstrukts nur mittels *RhMLO4* Expression untersucht wurde. Ergebnisse der Vorversuche zur Unterdrückung der Expression von *RhMLO3* mit dem RhMLO3/4-RNAi Konstrukt können dem Anhang A.6.1 entnommen werden. Desweiteren können die statistischen Analysen (R Codes und tabellarische Ausführung der Ergebnisse) dem Anhang A.6.1 entnommen werden.

In den Proben der transienten Transformation mit dem RhMLO1-RNAi Konstrukt konnte nur für *RhMLO1* eine signifikante Reduktion in der Expression im Vergleich zur GUS-RNAi Behandlung nachgewiesen werden (p-Wert: 0,0104). In Abbildung 12 ist der Boxplot der RQ-Werte der Expression der drei *RhMLO* Gene in der RhMLO1-RNAi Behandlung (relativ zur GUS-RNAi Kontrolle) abgebildet. Für die RhMLO2-RNAi Behandlung konnte bei keinem der drei *RhMLO* Gene eine signifikante Reduktion nachgewiesen werden. Allerdings war die Expression von *RhMLO2* deutlich niedriger als die der anderen beiden Gene. In Abbildung 13 wird deutlich, dass der Median von *RhMLO2* deutlich geringer ist als der von *RhMLO1* und *RhMLO4*. Aufgrund der Streuung der Daten (ausgeprägte Längen der Whisker) lies sich jedoch keine Signifikanz nachweisen. Die transiente Infiltration mit dem RhMLO3/4-RNAi Konstrukt ergab eine signifikant niedrigere Expression von *RhMLO4* im Vergleich zu dessen Expression in der GUS-RNAi Kontrolle (p-Wert: 0,0098). Für *RhMLO1* und *RhMLO2* konnte keine signifikante Reduktion nachgewiesen werden (Abbildung 14).



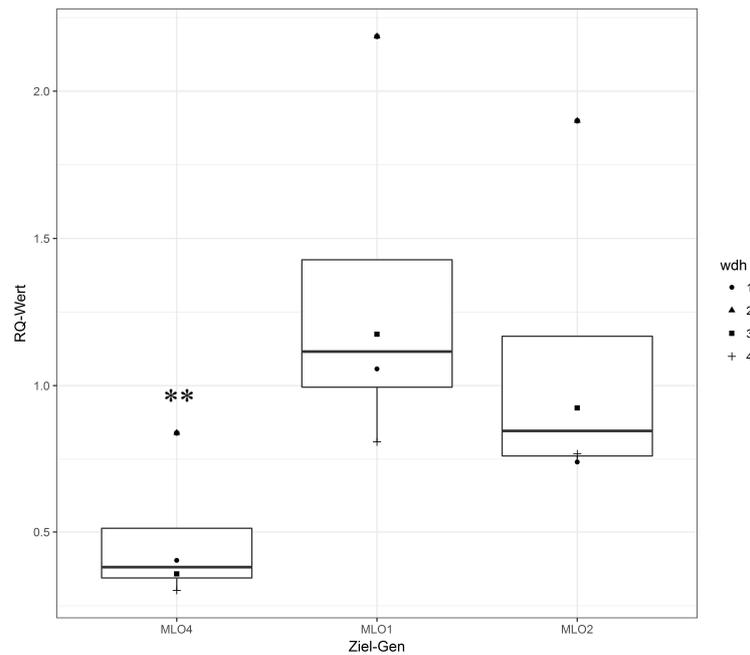
**Abbildung 12: Boxplot der relativen Expression der *RhMLO* Gene in der transienten Transformation mit *RhMLO1*-RNAi.**

Die relative Expression (RQ-Wert) der *RhMLO* Gene (Ziel-Gen) ist über die vier Wiederholungen (wdh) der transienten Transformation mit dem Konstrukt *RhMLO1*-RNAi in Petalen der Sorte 'Pariser Charme' im Bezug zu deren Expression in der GUS-RNAi Kontrolle mittels Boxplot aufgeführt. Der horizontale Balken markiert den Median der Werte. Innerhalb der Boxen sind die oberen und unteren Quartile der Daten abgebildet und die Whisker markieren Daten außerhalb dieses Bereiches, ohne Ausreißer. Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1.



**Abbildung 13: Boxplot der relativen Expression der *RhMLO* Gene in der transienten Transformation mit *RhMLO2*-RNAi.**

Die relative Expression (RQ-Wert) der *RhMLO* Gene (Ziel-Gen) ist über die vier Wiederholungen (wdh) der transienten Transformation mit dem Konstrukt *RhMLO2*-RNAi in Petalen der Sorte 'Pariser Charme' im Bezug zu deren Expression in der GUS-RNAi Kontrolle mittels Boxplot aufgeführt. Der horizontale Balken markiert den Median der Werte. Innerhalb der Boxen sind die oberen und unteren Quartile der Daten abgebildet und die Whisker markieren Daten außerhalb dieses Bereiches, ohne Ausreißer. Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1.



**Abbildung 14: Boxplot der relativen Expression der *RhMLO* Gene in der transienten Transformation mit *RhMLO3/4-RNAi*.**

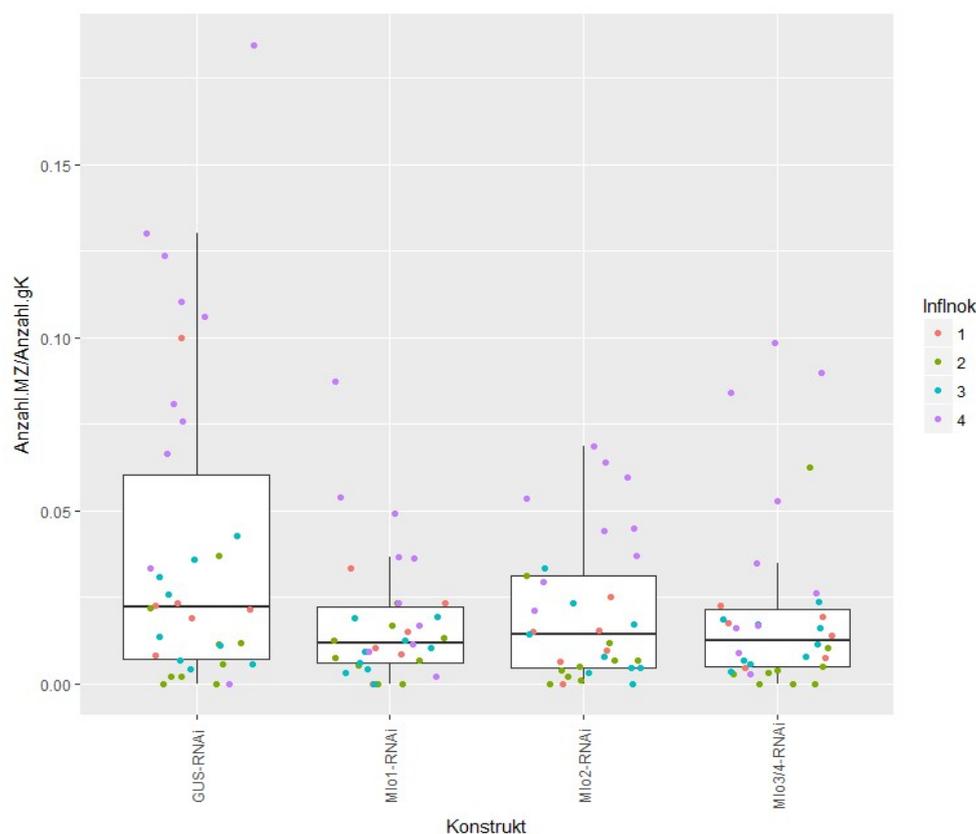
Die relative Expression (RQ-Wert) der *RhMLO* Gene (Ziel-Gen) ist über die vier Wiederholungen (wdh) der transienten Transformation mit dem Konstrukt *RhMLO3/4-RNAi* in Petalen der Sorte 'Pariser Charme' im Bezug zu deren Expression in der GUS-RNAi Kontrolle mittels Boxplot aufgeführt. Der horizontale Balken markiert den Median der Werte. Innerhalb der Boxen sind die oberen und unteren Quartile der Daten abgebildet und die Whisker markieren Daten außerhalb dieses Bereiches, ohne Ausreißer. Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1.

In jeder der drei oben abgebildeten Grafiken ist die relative Expression (RQ-Wert) der Ziel-Gene zur Expression der Gene in der GUS-RNAi Behandlung mittels Boxplots dargestellt. Die Expression in der GUS-RNAi Behandlung wurde als Referenz angenommen und daher auf 1 gesetzt. Deutlich wird, dass bei allen drei Behandlungen das jeweilige Ziel-Gen (jeweils an erster Stelle abgebildet) einen Median klar unterhalb des RQ-Werts von 1 aufweist, auch wenn dieser Unterschied bei *RhMLO2* in der *RhMLO2-RNAi* Behandlung (Abbildung 13) als nicht signifikant getestet wurde. Des Weiteren kann den Abbildungen entnommen werden, dass die jeweils anderen beiden *RhMLO* Gene (Boxplots der zweiten und dritten Position) im Median nicht stark von einem RQ-Wert von 1 abweichen. Auch die statistischen Analysen konnten weder eine niedrigere noch eine höhere Expression der Gene in Behandlungen nachweisen, die nicht von dem jeweiligen *RhMLO-RNAi* Konstrukt reguliert werden sollten.

### 3.1.1.3 Quantitative Inokulationsexperimente mit dem Echten Mehltau

Die Agro-infiltrierte Petalen mit den *RhMLO-RNAi* Konstrukten wurden für quantitative Inokulationsversuche mit *P. pannosa* herangezogen. Hierfür wurden sechs (Infiltrations/ Inokulations-Experiment 1) bis neun Petalen (Infiltrations/ Inokulationsexperimente 2, 3 und 4) pro Variante und biologischer Wiederholung quantitativ ausgewertet. Da in den transienten

Versuchen im Gegensatz zu Inokulationen der stabil transgenen Linien keine definierten Flächen, sondern eine bestimmte Anzahl an unterschiedlich großen Petalen ausgewertet wurde, wurde die Gesamtzahl der gekeimten Konidien erfasst. Insgesamt wurden pro Experiment 13939 (Experiment 4) bis 23155 (Experiment 2) gekeimte Konidien ausgezählt. Für alle vier Infiltrations/Inokulations-Experimente ergab sich eine Gesamtzahl an erfassten Konidien von 73918. Die Anzahl der ermittelten Kolonien mit Myzelbildung wurde durch die Anzahl der gesamten gekeimten Konidien geteilt und dieser Quotient in Abbildung 15 als Boxplots für die drei infiltrierten RhMLO-RNAi Konstrukte als auch die GUS-RNAi Kontrolle über alle vier Infiltrations/Inokulations-Experimente hinweg aufgetragen. In Anhang A.7.1 sind die R Codes der statistischen Auswertungen aufgeführt.



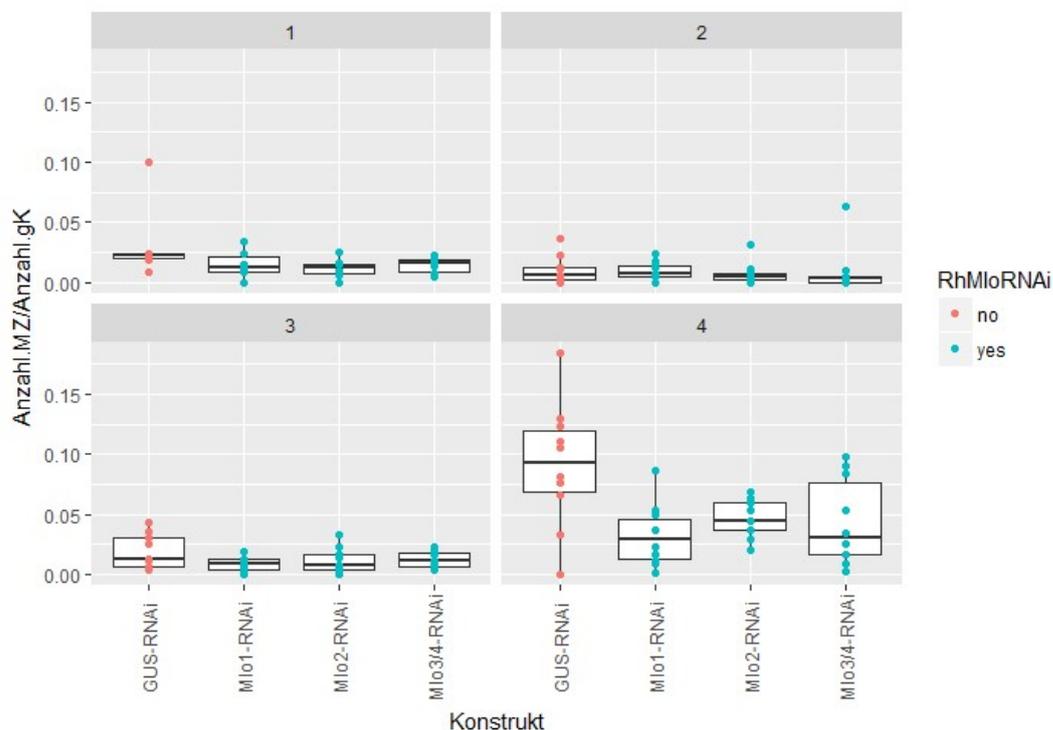
**Abbildung 15: Anteil der myzelbildenden Konidien des Echten Mehltaus der Infiltrations/Inokulations-Versuche mit Petalen der Sorte 'Pariser Charme'.**

Aufgetragen ist der Quotient der Anzahl der myzelbildenden Konidien durch die Anzahl der gekeimten Konidien insgesamt für jedes der infiltrierten RhMLO-RNAi Konstrukte und der GUS-RNAi Kontrolle für die vier Infiltrations/Inokulations-Experimente (Inf/Inok 1 bis 4). Die Daten von Inf/Inok 1 gehen auf jeweils 6 untersuchte Petalen zurück und die von Inf/Inok 2, 3 und 4 je auch 9.

Aus Abbildung 15 wird deutlich, dass die Streuung der Datenpunkte bei der GUS-RNAi Kontrolle am ausgeprägtesten war. Hier umfasst das obere Quartil, als auch der obere Whisker, deutliche größere Quotienten als bei den RhMLO-RNAi Konstrukten. Des Weiteren wird ersichtlich, dass bei der Infiltration/Inokulation 4 höhere Werte über alle Konstrukte hinweg beobachtet wurden als bei den anderen drei Experimenten. Insbesondere Infiltration/Inokulation

2 wies im Vergleich dazu geringere Werte auf, in dem nur ein bis zwei Datenpunkte für jedes Konstrukt im oberen Quartil liegen. Betrachtet man die Mediane der vier infiltrierten Konstrukte, so kann für alle drei RhMLO-RNAi Konstrukte ein niedrigerer Wert an myzelbildenden Konidien im Vergleich zur Kontrolle GUS-RNAi festgestellt werden.

In der nachfolgenden Abbildung ist der Quotient der Anzahl der Myzel-bildenden Konidien durch die Anzahl der gekeimten Konidien für die RhMLO-RNAi Konstrukte im Vergleich zur GUS-Kontrolle zur besseren Übersicht für jedes der Infiltrations/Inokulations-Experimente (1-4) einzeln aufgetragen.



**Abbildung 16: Anteil der myzelbildenden Konidien des Echten Mehltaus der einzelnen Infiltrations/Inokulations-Versuche.**

Aufgetragen ist der Quotient der Anzahl der myzelbildenden Konidien (Anzahl.MZ) durch die Anzahl aller gekeimten Konidien (Anzahl.gK) der infiltrierten RhMLO-RNAi Konstrukte (blaue Datenpunkte) im Vergleich zur GUS-RNAi Kontrolle (rote Datenpunkte) für jedes der Infiltrations/Inokulations-Versuche 1, 2, 3 und 4 einzeln. Die Daten von Inf/Inok 1 gehen auf jeweils 6 untersuchte Petalen zurück und die von Inf/Inok 2, 3 und 4 je auch 9.

Aus Abbildung 16 werden die Unterschiede in der Anzahl der ausgewerteten Konidien der vier Versuche (1 bis 4) deutlich. Bei Versuch 4 konnte eine höhere Dichte an myzelbildenden Konidien im Vergleich zur Gesamtzahl der gekeimten Konidien beobachtet werden. Hier liegt der Median der GUS-RNAi Kontrolle bei einem Quotienten von knapp 0,1, wohingegen bei den anderen drei Versuchen dieser unterhalb von 0,025 liegt. Durch die höheren Quotienten in Versuch 4 lässt sich der Unterschied zwischen der Kontrolle und den RhMLO-RNAi Konstrukten deutlicher erkennen. In den Versuchen 1, 2 und 3 lässt sich anhand dieser Abbildung

der Unterschied nicht so klar feststellen. Die Ergebnisse des Tests auf die Gesamt-Effekte der Versuche sind in Tabelle 27 aufgeführt.

**Tabelle 27: Gesamteffekte der transienten Infiltrations/Inokulations-Versuche mit den RhMLO-RNAi Konstrukten.**

	Df	Deviance	Resid.Df	Resid.Dev	F	Pr(>F)
NULL			134	1882,49		
InfInok	3	807,70	131	1074,79	36,2310	< 2,2e-16 ***
Konstrukt	3	181,46	128	893,33	8,1399	5,641e-05***
InfInok:Konstrukt	9	65,64	119	827,69	0,9815	0,459

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Im Durchschnitt können substantielle Unterschiede zwischen den Wiederholungen der Infiltrations/Inokulations-Versuche beobachtet werden (InfInok p-Wert: < 2,2e-16) (Tabelle 27). Dies ist zum Beispiel durch die höheren Raten an myzelbildenden Konidien aus Versuch 4 zu erklären (siehe auch Abbildung 16). Signifikante Unterschiede können auch zwischen den infiltrierten Konstrukten festgestellt werden (Konstrukt p-Wert: 5,641e-05). Unter dem Begriff Konstrukt sind hier sowohl die RhMLO-RNAi Konstrukte als auch das GUS-RNAi Kontroll-Konstrukt gefasst. Es konnte jedoch keine Interaktion zwischen den Versuchen und den Konstrukten festgestellt werden (InfInok:Konstrukt p-Wert: 0,459). Dies bedeutet, dass keine Heterogenität der Unterschiede zwischen den infiltrierten Konstrukten über die Versuchswiederholungen vorliegt, also der Effekt auf den Anteil myzelbildender Konidien in seinem Auftreten und Ausmaß der Konstrukte über die Wiederholungen stabil ist.

Zusammengefasst über die vier Wiederholungen wurden die Anteile der myzelbildenden Konidien der mit den RhMLO-RNAi Konstrukten infiltrierten Proben zur GUS-RNAi Kontrolle verglichen. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 28 angegeben.

**Tabelle 28: Effekte der RhMLO-RNAi Konstrukte gepoolt über die vier transienten Infiltrations/Inokulations-Versuche auf die Myzel-Bildung.**

contrast	estimate	SE	Df	z.ratio	p.value
Mlo1-RNAi - GUS-RNAi	-0,6743736	0,2347207	NA	-2,873	0,0116*
Mlo2-RNAi - GUS-RNAi	-0,5814200	0,2310675	NA	-2,516	0,0329*
Mlo3/4-RNAi - GUS-RNAi	-0,4017875	0,2133053	NA	-1,884	0,1517

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Aus Tabelle 28 geht hervor, dass sowohl die Infiltration von RhMLO1-RNAi als auch die Infiltration von RhMLO2-RNAi zu einer signifikanten Reduktion am Anteil myzelbildender Konidien im Vergleich zur GUS-RNAi infiltrierten Kontrolle führte (Mlo1-RNAi p-Wert: 0,0116; Mlo2-RNAi p-Wert: 0,0329). Hierbei fällt des Weiteren auf, dass der Effekt bei RhMLO1-RNAi deutlicher ausgeprägt ist, als bei RhMLO2-RNAi. Die Infiltration von

RhMLO3/4-RNAi führte im Durchschnitt zu einer Reduktion des Anteils myzelbildender Konidien im Vergleich zur Kontrolle, dieser Effekt ist jedoch nicht groß genug, um als statistisch signifikant zu gelten (Mlo3/4-RNAi p-Wert: 0,1517).

### 3.1.2 Stabile Transformation der *RhMLO*-RNAi Konstrukte

#### 3.1.2.1 Stabile Transformationsexperimente

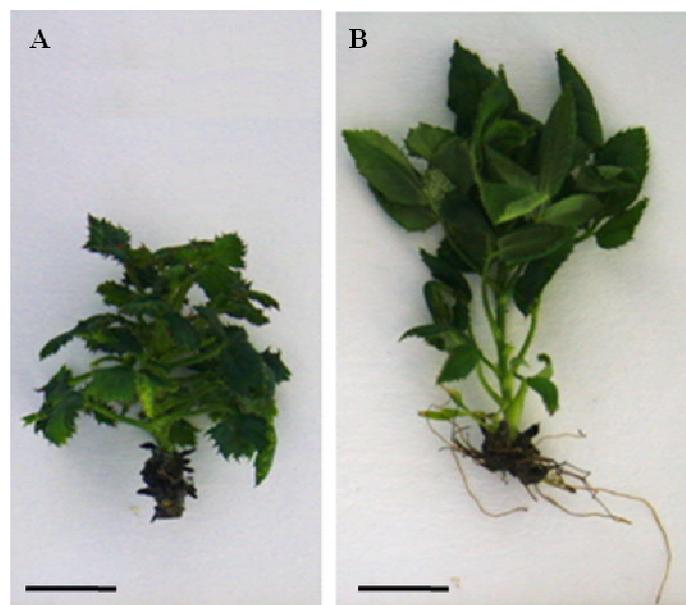
Die Transformation der somatischen Embryonen der tetraploiden *R. hybrida* Sorte 'Pariser Charme' mit den RhMLO-RNAi Konstrukten erfolgte in vier Transformationsexperimenten. Insgesamt wurden rund 3000 Cluster an somatischen Embryonen für die verschiedenen Transformationsexperimente eingesetzt (Tabelle 29). Transformation A wurde nur leicht verändert nach dem Protokoll von Dohm et al. (2002) durchgeführt. In diesem Experiment benötigten die Regenerate eine Subkultivierung von mindestens acht Monaten (bis zu zwölf Monaten) auf Regenerationsmedium, bis sich Sprosse entwickelten, die auf Proliferationsmedium überführt werden konnten. Die regenerierten Sprosse zeigten einen veränderten Phänotyp bei allen Varianten auf (einschließlich der GUS-RNAi Kontrolle), welcher sich in buschigen und gedrungenem Wachstum, stark gezackten Blättern und einer stark verminderten Befähigung zur Bewurzelung als auch einer allgemein verminderten Wüchsigkeit der Pflanzen äußerte (siehe Abbildung 17). Die in dieser Transformation erzielten Transformationseffizienzen betragen 1,3 % bis 23 % (vermehrungsfähiger Linien). Fehler in der Multiplikation der Linien haben hierbei zu einer vermeintlich zu hoch gegriffenen Transformationseffizienz für RhMLO1-RNAi (23 %) und GUS-RNAi (13 %) geführt (vergleiche Tabelle 29). Transformation B wurde im Gegensatz zu den anderen Experimenten (*A. tumefaciens* Stamm GV2260) mit dem *A. tumefaciens* Stamm EHA105 durchgeführt. Hier konnten nur für RhMLO2- und RhMLO3/4-RNAi Sprosse regeneriert werden, die auch den oben beschriebenen, veränderten Phänotyp aufwiesen. Hieraus ergibt sich eine Transformationseffizienz an vermehrungsfähigen Linien von 0 % bis 2 %. Das Transformationsexperiment C erfolgte nach dem optimierten Protokoll, welches nach der Ko-Kultur ein Hacken der somatischen Embryonen mit anschließender sekundärer Embryoproliferationsphase beinhaltet. Hier konnten schon nach zwei Monaten regenerierte Sprosse auf Proliferationsmedium überführt werden. Diese entsprachen dem Phänotyp der nicht-transgenen In-vitro-Sprosse. Insgesamt konnten in diesem Experiment Transformationsraten von 6 % bis 7,6 % erzielt werden. Bei Transformation D erwies sich die Regenerationsphase bis zum Erhalt von vermehrungsfähigen Linien ebenfalls als kurz (2-5 Monate), allerdings waren hier die erzielten Transformationseffizienzen mit 2 % bis 3,3 % geringer als in der Transformation C (vergleiche Tabelle 29). Die regenerierten Linien aus

Transformation C und D zeigten keine phänotypische Veränderung im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen auf (siehe Abbildung 18). Bei allen Transformationsexperimenten regenerierten Explantate, die ein starkes Kalluswachstum aufwiesen. Dieser Kallus differenzierte sich auch nach fortgeschrittener Subkultivierung nicht weiter, sondern wies eine feste und trockene Struktur. Trotz des nachgewiesenen transgenen Charakters dieser Kallus-Linien, wurden diese verworfen und für die Berechnung der Transformationseffizienz nicht berücksichtigt, da keine vermehrungsfähigen Sprosse hieraus resultierten.

**Tabelle 29: Übersicht über die stabilen Transformationsexperimente mit den RhMLO-RNAi Konstrukten.**

Experiment	Anzahl transformierter Explantate	Anzahl Explantate pro Konstrukt	Anzahl regenerierter Linien pro Konstrukt	Transformations-effizienz
A	600	150	2 bis 35	1,3 % bis zu 23 %
B	800	200	0 bis 2	0 % bis 1 %
C*	990	330	20 bis 25	6 % bis 7,6 %
D	600	150	3 bis 5	2 % bis 3,3 %
	$\Sigma$ 2990			

C\* keine GUS-RNAi-Kontrolle transformiert



**Abbildung 17: In-vitro-Spross mit abweichendem Phänotyp aus Transformation A der RNAi-Konstrukte im Vergleich zu einem normal entwickelten Spross.**

A) *In vitro* Spross aus Transformation A mit dem Konstrukt GUS-RNAi, der den typischen Phänotyp der Linien aus Transformation A und B aufweist: gedrungenes Wachstum, stark vermindertes Wurzelwachstum und gezackte Blätter. B) Normal entwickelter Spross aus Transformation C. Beide Sprosse wurden zur gleichen Zeit auf Bewurzelungsmedium überführt und wiesen zu diesem Zeitpunkt eine ähnliche Länge auf. Der schwarze Balken entspricht einem Maßstab von 1 cm.

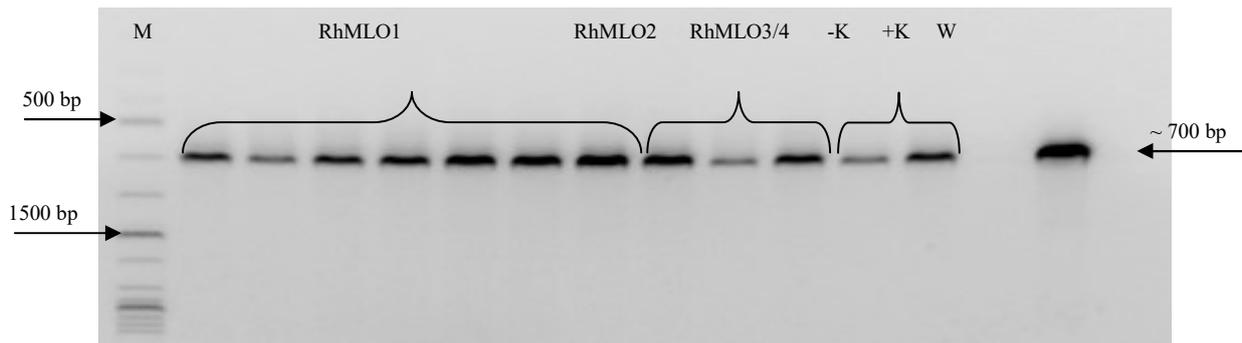


**Abbildung 18: Regenerierte und akklimatisierte RhMLO-RNAi Linien und Kontroll-Pflanzen.**

Fotografien von akklimatisierten Klonen der A) 'Pariser Charme' Kontroll-Linie (nicht transgen) und B) der GUS-RNAi Linie im Vergleich zu Klonen der C) RhMLO1-RNAi, D) RhMLO2-RNAi und E) RhMLO3/4-RNAi Linien. Die Pflanzen befanden sich zum Zeitpunkt der Aufnahme bereits einige Monate in der Phyto-kammer, die Pflanztöpfe haben jeweils einen Durchmesser von 9 cm.

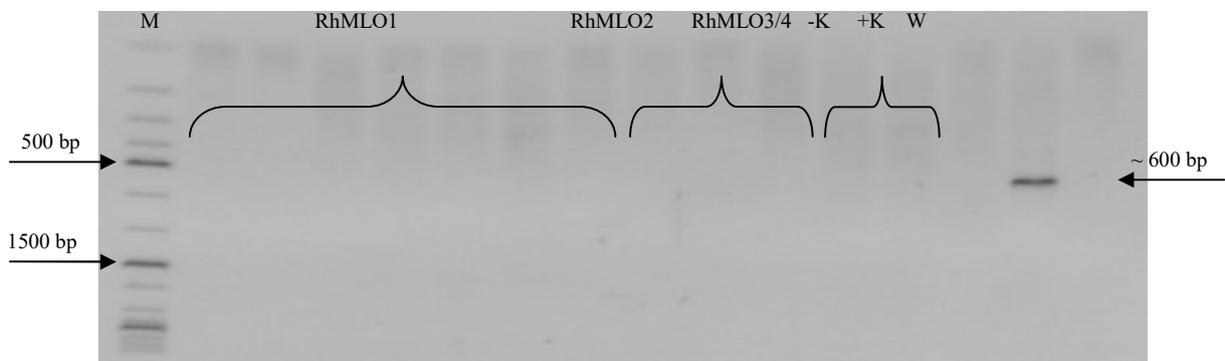
### 3.1.2.2 Überprüfung des transgenen Charakters der regenerierten RhMLO-RNAi Linien

Wie schon beschrieben, zeigten die regenerierten Linien der Transformation A und B Schwierigkeiten in der Fähigkeit der Bewurzelung, eine verminderte Wüchsigkeit und einen veränderten Phänotyp über alle Varianten. Daher wurden die folgenden Untersuchungen ausschließlich mit Pflanzen der Experimente C und D durchgeführt. Für die Bewurzelung und Akklimatisierung wurden je RhMLO-RNAi Variante 8 bis 11 Linien ausgewählt, von denen je drei Klone in die Phyto-kammer überführt wurden. Hierbei konnten keine phänotypischen Auffälligkeiten der RhMLO-RNAi Linien im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Als Kontrollen wurden sowohl eine GUS-RNAi Linie als auch eine nicht-transgene Linie, die den Transformationsprozess durchlaufen hat, verwendet. Von diesen Pflanzen wurde junges Blattmaterial für die Isolation von DNA entnommen. Die erfolgreiche Übertragung der T-DNA wurde mittels PCR mit Primern für das *NPTII*-Gen, welches auf der T-DNA vor der MCS lokalisiert ist, überprüft (Abbildung 19). Zur Überprüfung auf eventuell persistierende Agrobakterien in den Pflanzen, wurde eine PCR mit Primern für das Chromosom von Agrobakterien durchgeführt (Abbildung 20).



**Abbildung 19: Repräsentatives Ergebnis der Agarosegelelektrophorese der *NPTII*-PCR der RhMLO-RNAi Linien.**

Repräsentatives das Bild der Agarosegelelektrophorese der RhMLO1-RNAi Linien: 1C1, 1C2, 1C3, 1C4, 1C6, 1C7, 1C8; der RhMLO2-RNAi Linien: 2C1, 2C3, 2C4; der RhMLO3/4-RNAi Linien: 3/4C1, 3/4C5; -K: nicht-transgene 'Pariser Charme' (Negativ-Kontrolle); +K: Plasmid DNA p9U10-RNAi (Positiv-Kontrolle); W: Wasser-Kontrolle; M: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Die Abbildung stammt (mit leichten Änderungen) aus der M.Sc. Arbeit von Frauke Schürmann, 2015.



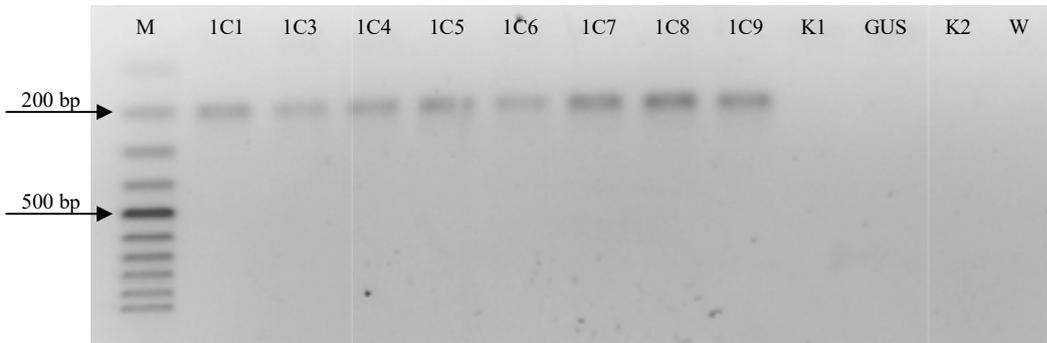
**Abbildung 20: Repräsentatives Ergebnis der Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung auf persistierende Agrobakterien in den RhMLO-RNAi Linien.**

Repräsentatives das Bild der Agarosegelelektrophorese der RhMLO1-RNAi Linien: 1C1, 1C2, 1C3, 1C4, 1C6, 1C7, 1C8; der RhMLO2-RNAi Linien: 2C1, 2C3, 2C4; der RhMLO3/4-RNAi Linien: 3/4C1, 3/4C5; -K: nicht-transgene 'Pariser Charme' (Negativ-Kontrolle); +K: DNA von *A. tumefaciens* GV2260 (Positiv-Kontrolle); W: Wasser-Kontrolle; M: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Die Abbildung stammt (mit leichten Veränderungen) aus der M.Sc. Arbeit von Frauke Schürmann, 2015.

Aus Abbildung 19 wird deutlich, dass alle getesteten Linien der RhMLO-RNAi Pflanzen das *NPTII*-Gen trugen, da die typische Bande bei 700 bp wie in der Positiv-Kontrolle mittels PCR nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für alle den nachfolgenden Analysen zugrundeliegenden Linien und stammt aus der Abschlussarbeit von Frauke Schürmann, 2015. Des Weiteren konnte in allen getesteten Linien eine Persistenz von Agrobakterien ausgeschlossen werden, da keine DNA mittels PCR in den Proben nachgewiesen werden konnte (vergleiche Abbildung 20). Auch dieses Ergebnis ist repräsentativ für alle der RhMLO-RNAi Linien und entstammt den Analysen von Frauke Schürmann, 2015.

Um die Expression der RhMLO-RNAi Kasette nachzuweisen, wurde von einer Auswahl an Linien eine RT-PCR mit Primern durchgeführt, welche sowohl im 35S-Promotor des Konstrukts binden, als auch in der *RhMLO* Sequenz des übertragenden Vektors. Hierbei konnte bei allen getesteten Linien die Expression der RNAi Kasette nachgewiesen werden. Repräsen-

tativ für diese Analysen ist nachfolgend das Ergebnis für die getesteten Linien von RhMLO1-RNAi abgebildet.



**Abbildung 21: Ergebnis der Agarosegelelektrophorese des Tests auf Expression der RNAi-Kassette mit cDNA von RhMLO1-RNAi Linien.**

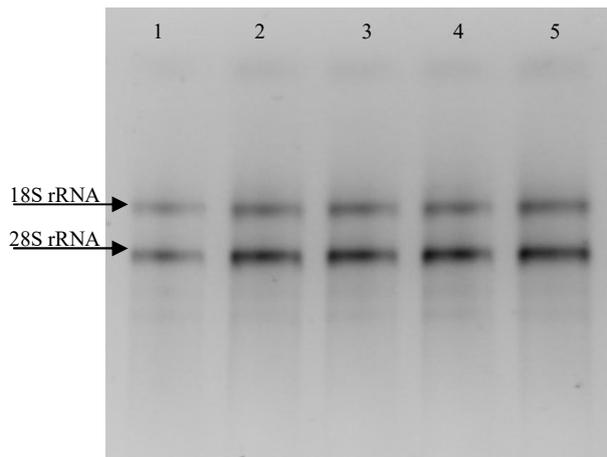
Repräsentatives Ergebnis der Gelelektrophorese der RhMLO1-RNAi Linien 1C1 bis 1C9; K1: nicht-transgene 'Pariser Charme' Kontrolle; GUS: GUS-RNAi Kontroll-Linie, K2: genomische DNA von nicht-transgener 'Pariser Charme'; W: Wasser-Kontrolle; M: GeneRuler 100bp DNA ladder (Thermo Scientific).

Für alle getesteten Linien der RhMLO1-RNAi Pflanzen konnte die Expression der RNAi-Kassette mittels RT-PCR nachgewiesen werden, da alle Linien die typische 200 bp große Bande in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte aufwiesen (Abbildung 21). Die nicht-transgenen Kontrollen (K1 und K2) sowie die transgene Kontrolle (GUS-RNAi) wiesen keine Banden auf. Die Primer wurden zuvor auf Spezifität für das RhMLO1-RNAi Konstrukt auf Plasmid-DNA getestet. Hier konnte ausschließlich ein Produkt mit diesem Konstrukt, nicht aber mit dem von RhMLO2-RNAi oder von RhMLO3/4-RNA nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt).

### 3.1.2.3 Expressionsanalysen der RhMLO-RNAi Linien

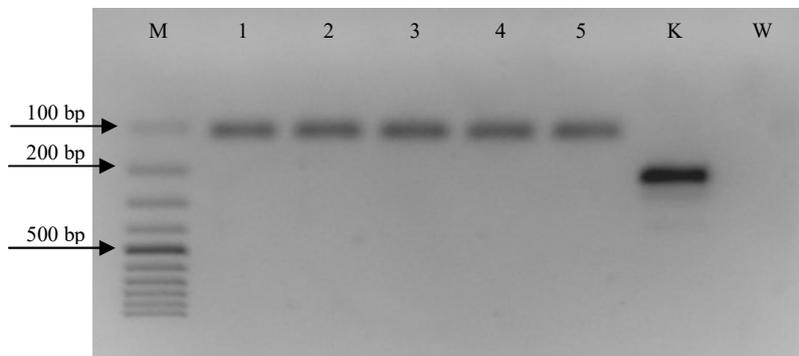
Zur Überprüfung der vermeintlichen Herunterregulierung der *RhMLO* Gene in den transgenen Linien, wurde zu drei Zeitpunkten von in der Phytokammer kultivierten Pflanzen sehr junges Blattmaterial jeweils eines Klons pro Linie gesammelt, die RNA extrahiert und anschließend für die cDNA Synthese eingesetzt. In einem zweiten Ansatz wurden zu einem Zeitpunkt je drei Klone pro Linie beprobt. Die extrahierte RNA dieser Proben wurde vor der cDNA-Synthese zu gleichen Teilen gepoolt.

In Abbildung 22 ist ein repräsentatives Bild der Gelelektrophorese von intakten RNA-Proben zur Qualitätskontrolle dargestellt und in Abbildung 23 ein repräsentatives Bild der Gelelektrophorese der GAPDH-PCR mit synthetisierter cDNA der Proben, zur Kontrolle auf Intaktheit der cDNA und die Abwesenheit von genomischer DNA. Diese Kontrollen wurden mit allen Proben, die den nachfolgenden Analysen zugrundeliegen, durchgeführt.



**Abbildung 22: Repräsentative Agarosegelelektrophorese von RNA-Proben der RhMLO-RNAi Linien zur Qualitätskontrolle.**

Beispielhafte Darstellung von fünf Proben von RhMLO1-RNAi Linien (1-5); die Pfeile markieren die Banden der 18S und 28S rRNA.



**Abbildung 23: Repräsentative Agarosegelelektrophorese der GAPDH-PCR mit synthetisierter cDNA von Proben der RhMLO-RNAi Linien.**

Beispielhafte Darstellung der GAPDH-PCR von fünf Proben von RhMLO1-RNAi Linien (1-5); K: genomische DNA; W: Wasser-Kontrolle; M: GeneRuler 100bp DNA ladder (Thermo Scientific).

In Abbildung 22 sind bei den Proben 1 bis 5 deutlich die Banden der 28S rRNA und der 18S rRNA im Verhältnis 2:1 zu erkennen. Dies deutet auf intakte RNA hin. Des Weiteren sind keine Verunreinigungen im hochmolekularen Bereich mit genomischer DNA zu erkennen. Ein repräsentatives Ergebnis der Kontrolle auf Intaktheit und eventuelle Kontaminationen mit gDNA der cDNA mittels GAPDH-PCR ist in Abbildung 23 aufgeführt. Hier ist in allen Proben der RhMLO-RNAi Linien (1 bis 5) die typische 100 bp Bande zu erkennen. In keiner der Proben kann die 200 bp Bande der genomischen DNA detektiert werden.

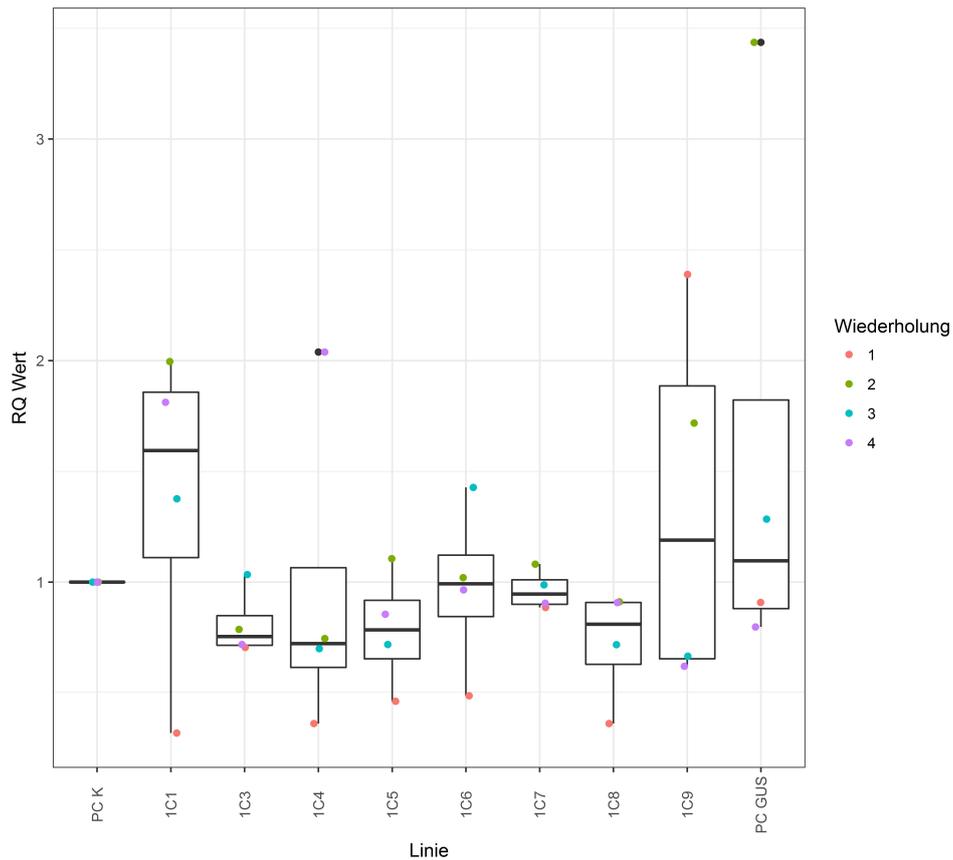
Für die Expressionsanalysen der RhMLO-RNAi Linien wurde ausschließlich RNA verwendet, die nachgewiesenermaßen intakt, von hoher Reinheit und ohne Kontaminationen mit gDNA vorlag. Für jedes der nachfolgenden q-RT-PCR Experimente wurde cDNA neu synthetisiert und diese direkt eingesetzt. In der nachfolgenden Tabelle 30 sind die für die q-RT-PCR verwendeten Linien aufgeführt.

**Tabelle 30: Übersicht über die verwendeten RhMLO-RNAi Linien für die q-RT-PCR Analysen.**

RhMLO-RNAi Konstrukt	Linie
RhMLO1-RNAi	1C1, 1C3, 1C4, 1C5, 1C6, 1C7, 1C8, 1C9
RhMLO2-RNAi	2C1, 2C3, 2C4, 2C5, 2C9, 2C12, 2E1, 2E2
RhMLO3/4-RNAi	3/4C1, 3/4C2, 3/4C5, 3/4C6, 3/4C7, 3/4C9, 3/4E1, 3/4E2

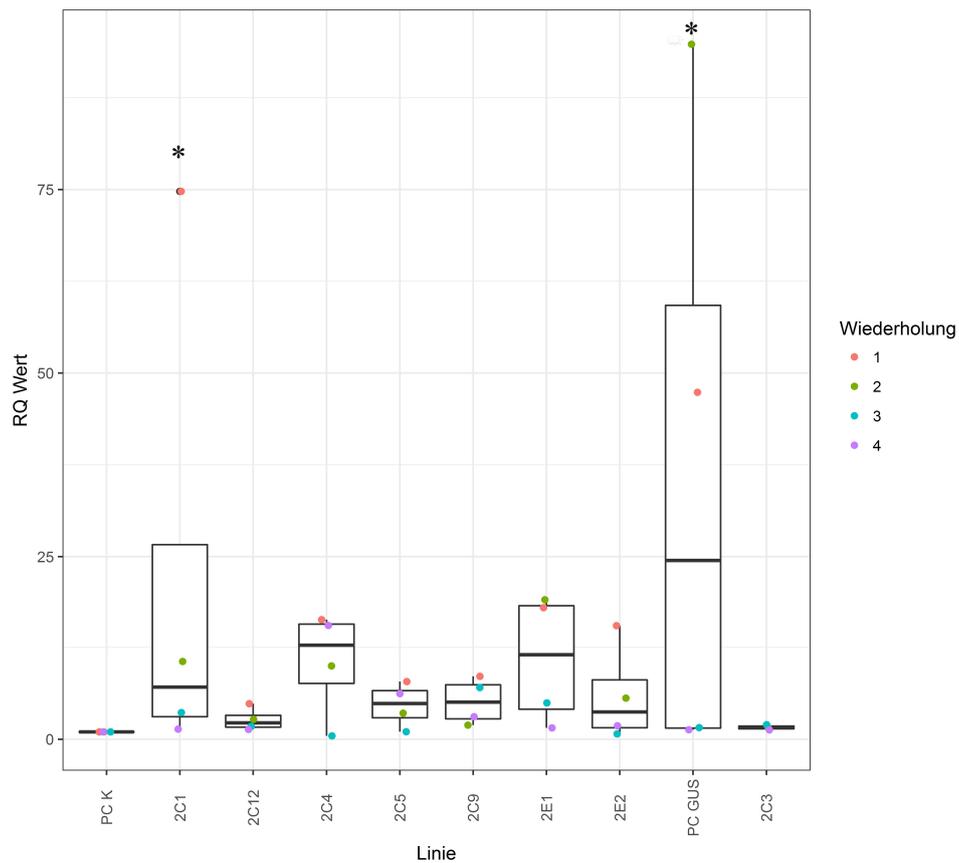
Insgesamt wurden je acht Linien pro RhMLO-RNAi Konstrukt auf die Expression der vermeintlich herunterregulierten *RhMLO* Gene hin untersucht (Tabelle 30). Als Kontrollen wurden eine GUS-RNAi Linie (PCGUS) sowie eine nicht-transgene 'Pariser Charme' Linie (PCK), die den Transformationsprozess durchlaufen hat, verwendet. Pro Reaktion der q-RT-PCR wurden alle Linien eines RhMLO-RNAi Konstrukts auf die jeweilige *RhMLO*-Expression getestet und die relative Expression gegen zwei Referenz-Gene (UBC, SAND) normalisiert. Beide Kontrollen wurden identisch wie die Test-Pflanzen behandelt.

Bei keiner der jeweils acht untersuchten RhMLO-RNAi Linien pro Konstrukt oder der transgenen Kontrolle PCGUS konnte eine signifikante Reduktion in der Expression des *RhMLO* Gens im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Bei RhMLO2-RNAi konnte lediglich für die Linie 2C1 (p-Wert: 0,0492) und die transgene Kontrolle PCGUS (p-Wert: 0,0250) eine schwach signifikant höhere Expression von *RhMLO2* im Vergleich zur Kontrolle (PCK) festgestellt werden. Die Wiederholungen der Versuche haben bei drei der vier getesteten Gene einen signifikanten Effekt auf die Expression (*RhMLO1* p-Wert: 0,03798, *RhMLO2* p-Wert: 0,001306, *RhMLO3* p-Wert: 0,0002706). Dies zeigt die hohe Variabilität der *RhMLO*-Expression zwischen den einzelnen Wiederholungen auf. Die vollständigen Ergebnisse der statistischen Analysen sowie die R Codes können dem Anhang (A.6.2) entnommen werden. In den nachfolgenden Abbildungen sind die RQ-Werte der RhMLO-RNAi Linien im Vergleich zur auf 1 gesetzten Kontrolle (PCK) für die vier untersuchten Gene (*RhMLO1*, *RhMLO2*, *RhMLO3* und *RhMLO4*) aufgeführt.



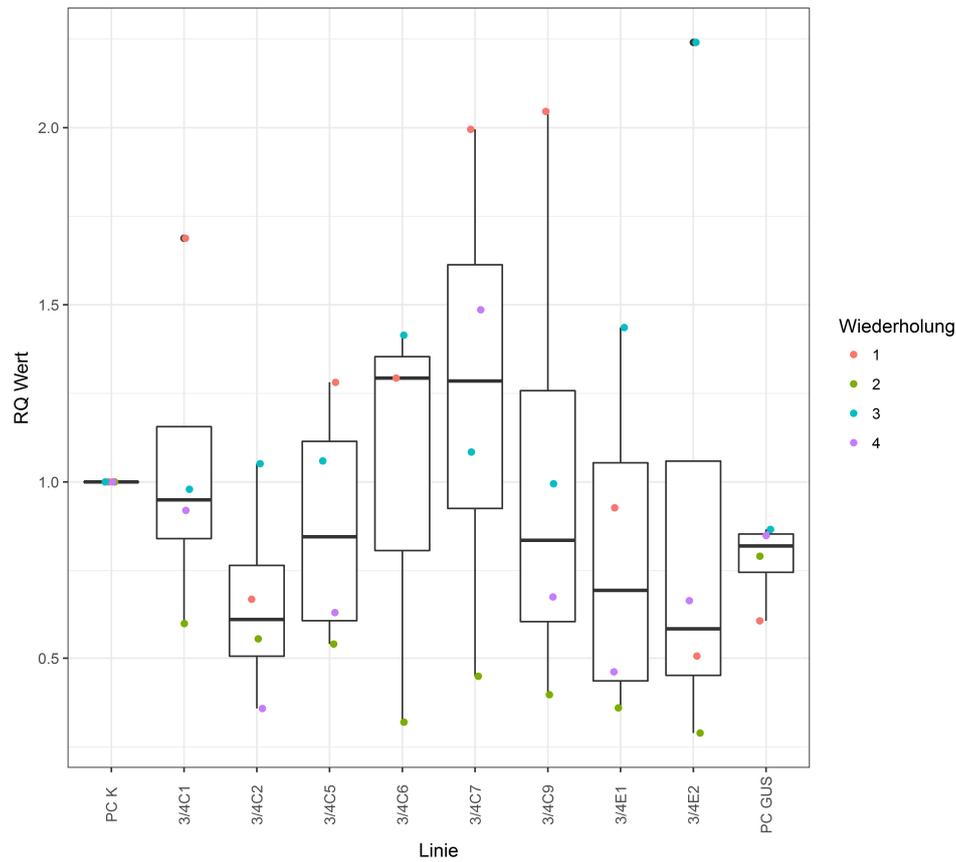
**Abbildung 24: Boxplot der RQ-Werte der *RhMLO1*-Expression der *RhMLO1*-RNAi Linien relativ zur Kontrolle.**

Die RQ-Werte der einzelnen Wiederholungen basieren auf drei gemittelten, technischen Wiederholungen pro Versuch. Die Kontrolle PCK wurde auf 1 gesetzt und die Werte der *RhMLO1*-RNAi Linien (1C1 bis 1C9) sowie die transgene Kontrolle (PCGUS) wurde im Verhältnis zu diesen aufgetragen. Der waagerechte Balken markiert den Median und innerhalb der Boxen sind die oberen und unteren Quartile der Daten abgebildet, die Whisker markieren Daten außerhalb dieses Bereiches, ohne Ausreißer. Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1.



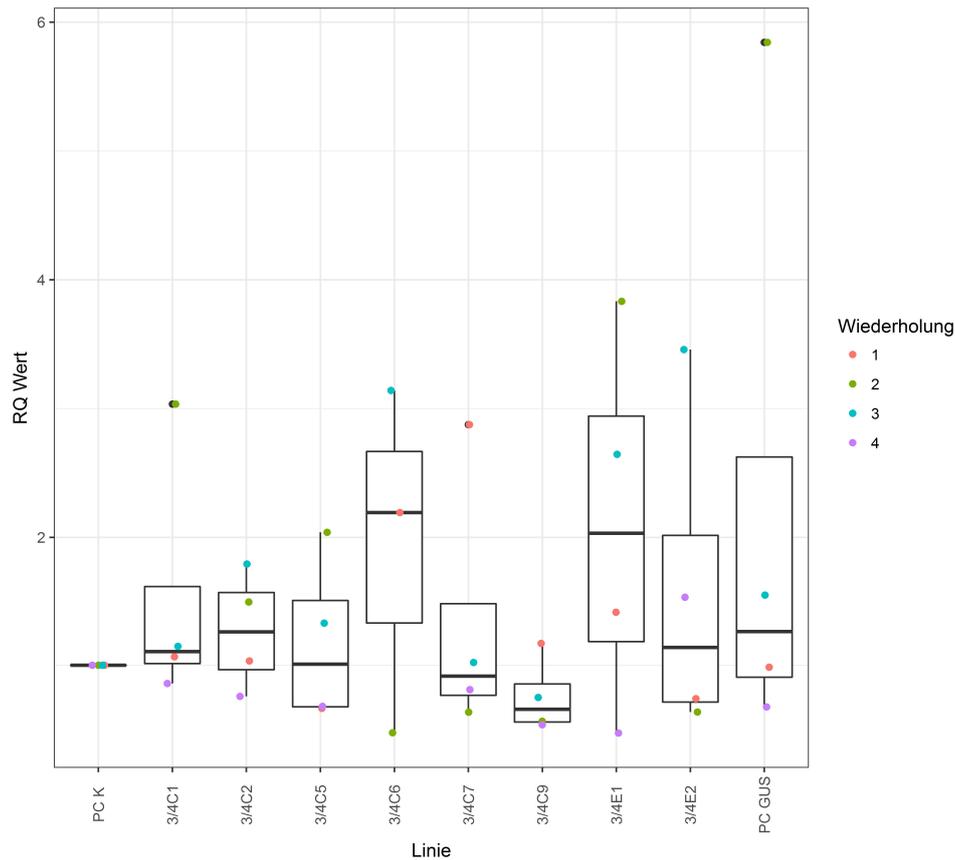
**Abbildung 25: Boxplot der RQ-Werte der *RhMLO2*-Expression der *RhMLO2*-RNAi Linien relativ zur Kontrolle.**

Die RQ-Werte der einzelnen Wiederholungen basieren auf drei gemittelten, technischen Wiederholungen pro Versuch. Die Kontrolle (PCK) wurde auf 1 gesetzt und die Werte der *RhMLO2*-RNAi Linien (2C1 bis 2E2) sowie die transgene Kontrolle (PCGUS) wurde im Verhältnis zu diesen aufgetragen. Der waagerechte Balken markiert den Median und innerhalb der Boxen sind die oberen und unteren Quartile der Daten abgebildet, die Whisker markieren Daten außerhalb dieses Bereiches, ohne Ausreißer. Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1.



**Abbildung 26: Boxplot der RQ-Werte der *RhMLO3*-Expression der *RhMLO3/4*-RNAi Linien relativ zur Kontrolle.**

Die RQ-Werte der einzelnen Wiederholungen basieren auf drei gemittelten, technischen Wiederholungen pro Versuch. Die Kontrolle PCK wurde auf 1 gesetzt und die Werte der *RhMLO3/4*-RNAi Linien (3/4C1 bis 3/4E2) sowie die transgene Kontrolle (PCGUS) wurde im Verhältnis zu diesen aufgetragen. Der waagerechte Balken markiert den Median und innerhalb der Boxen sind die oberen und unteren Quartile der Daten abgebildet, die Whisker markieren Daten außerhalb dieses Bereiches, ohne Ausreißer. Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1.



**Abbildung 27: Boxplot der RQ-Werte der *RhMLO4*-Expression der *RhMLO3/4*-RNAi Linien relativ zur Kontrolle.**

Die RQ-Werte der einzelnen Wiederholungen basieren auf drei gemittelten, technischen Wiederholungen pro Versuch. Die Kontrolle PCK wurde auf 1 gesetzt und die Werte der *RhMLO3/4*-RNAi Linien (3/4C1 bis 3/4E2) sowie die transgene Kontrolle (PCGUS) wurde im Verhältnis zu diesen aufgetragen. Der waagerechte Balken markiert den Median und innerhalb der Boxen sind die oberen und unteren Quartile der Daten abgebildet, die Whisker markieren Daten außerhalb dieses Bereiches, ohne Ausreißer. Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1.

Aus den Abbildungen wird die große Streuung der Daten deutlich. Wenn auch einzelne Wiederholungen eine niedrigere Expression aufweisen als die Kontrolle PCK (siehe zum Beispiel Abbildung 24 1C1 und Wiederholung 1), so ist in anderen Wiederholungen dieser Trend nicht mehr sichtbar (Abbildung 24 1C1 und Wiederholung 2). Die Streuung der Daten bei den Linien ist zum Teil stark ausgeprägt (siehe z.B. PCGUS in Abbildung 25 und 3/4C9 in Abbildung 26). In Abbildung 25 weisen die Boxplots von z.B. 2C3 und 2C12 eine vermeintlich geringere Streuung auf. Dies wird jedoch durch die mindestens 10-fach höhere Skalierung der y-Achse im Vergleich zu den anderen drei Abbildungen unterschätzt. Die Werte von PCK weisen in allen Abbildungen keine Streuung auf, da sie für den relativen Expressionsvergleich auf 1 gesetzt wurden. Somit konnte für keine der Linien ein Effekt des RNAi Konstrukts auf die Expression der *RhMLO*-Gene nachgewiesen werden. Da in den transienten Untersuchungen ein Effekt der Konstrukte auf die anderen, nicht-Ziel *RhMLO*-Gene ausgeschlossen werden

konnte, war hier kein Effekt anzunehmen, weshalb keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt wurden.

### 3.1.2.4 Quantitative Inokulationsexperimente der RhMLO-RNAi Linien

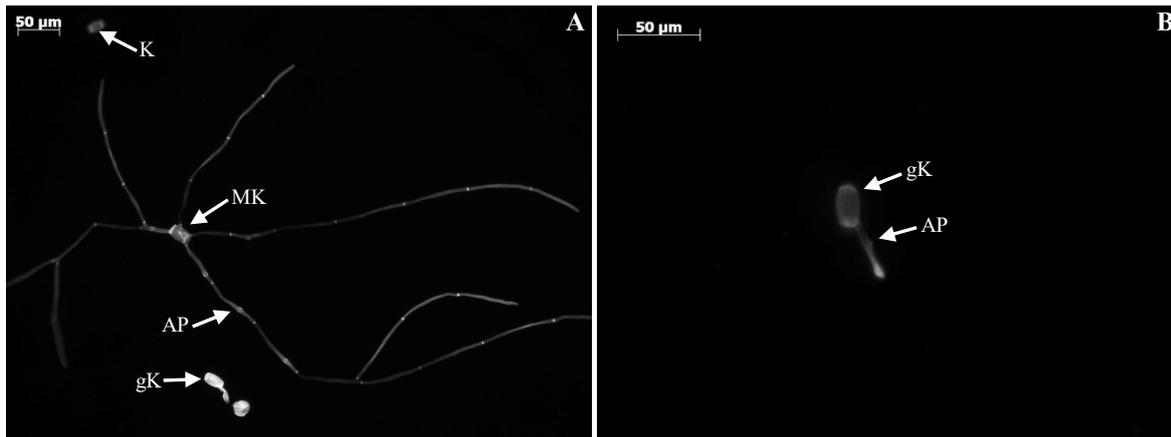
Trotz den Ergebnissen der Expressionsanalysen der transgenen Linien wurde eine Auswahl für eine phänotypische Charakterisierung mittels quantitativer Inokulationsexperimente mit dem Echten Mehltau herangezogen. In Tabelle 31 sind die getesteten Linien pro RhMLO-RNAi Konstrukt aufgeführt. Insgesamt wurden die Inokulationsexperimente dreimal wiederholt, wobei von jeweils einer Linie pro Konstrukt nur zwei Wiederholungen durchgeführt wurden.

**Tabelle 31: Übersicht über die verwendeten RhMLO-RNAi Linien der Inokulationsexperimente, die Wiederholungen und die Anzahl der untersuchten Proben.**

RhMLO-RNAi Konstrukt	Linie	Anzahl der Wiederholungen	Anzahl ausgewerteter Blattproben insgesamt
RhMLO1-RNAi	1C1	3	27
	1C3	3	27
	1C4	3	27
	1C7	2	18
	1C8	3	27
RhMLO2-RNAi	2C3	3	27
	2C4	3	27
	2C5	3	24
	2C12	3	27
	2E1	2	18
RhMLO3/4-RNAi	3/4C2	3	27
	3/4C5	3	27
	3/4C6	3	27
	3/4C9	3	27
	3/4E2	2	18

Neben den RhMLO-RNAi Linien wurden als Kontrollen bei jedem Versuch eine GUS-RNAi Linie (mit drei Fiederblättern von drei unterschiedlichen Klonen) und zwei nicht-transgene Linien von 'Pariser Charme' verwendet (18 Blattproben pro Versuch).

Pro Versuch und Linie standen neun Proben von neun unterschiedlichen Blättern für die Analysen zur Verfügung (siehe auch Tabelle 31). Als Maß zur Bewertung einer erfolgreichen Infektion des Probenmaterials durch den Echten Mehltau wurden die gekeimten Konidien ausgezählt, welche ein deutliches und verzweigtes Myzelwachstum aufwiesen. In der nachfolgenden Abbildung 28 ist dargestellt, in welchem Stadium eine Konidie als myzelbildend, im Vergleich zu solchen die kein Myzelwachstum aufwiesen, gewertet wurde.



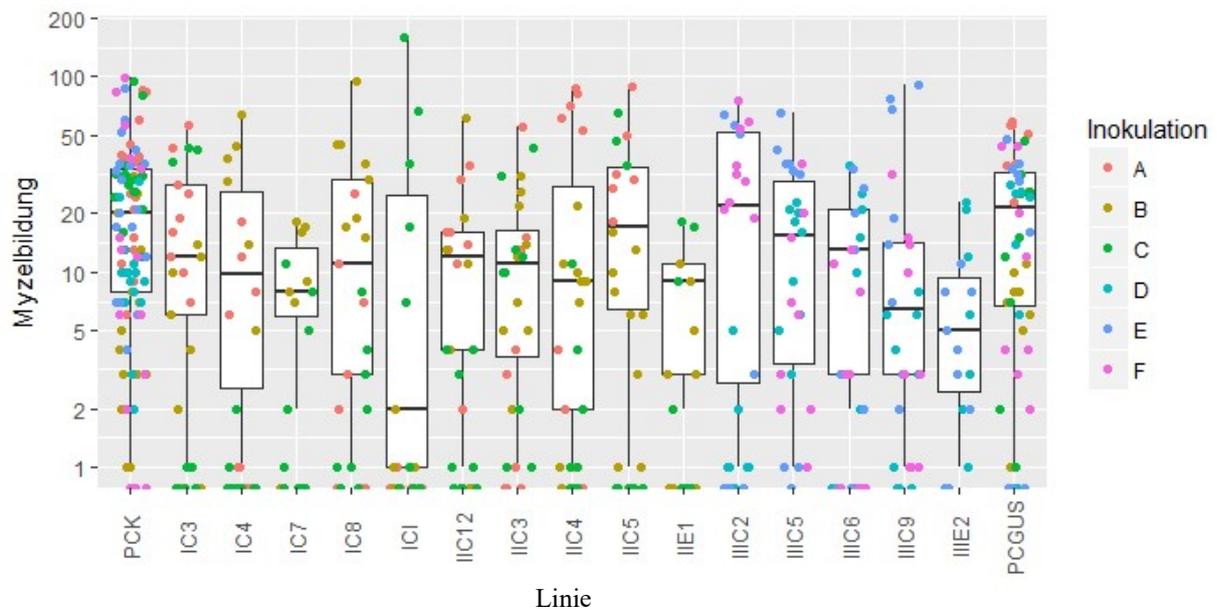
**Abbildung 28: Myzelbildende und gekeimte Konidien des Echten Mehltaus an Rosen.**

Aufnahmen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (Scope A1, Zeiss) bei (A) 200-facher und (B) 400-facher Vergrößerung und einer Wellenlänge von 488 nm von mit AlexaFlour 488 (Applied Biosystems) gefärbten Proben. A) und B) Proben von mit *P. pannosa* inokulierten Blättern einer nicht-transgenen 'Pariser Charme' Pflanze, 2 dpi. K: nicht-gekeimte Konidie; MK: myzelbildende Konidie; gK: gekeimte Konidie ohne Myzelbildung; AP: Appressorium; der Maßstab-Balken entspricht bei A und B einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 28 A ist eine gekeimte Konidie des Echten Mehltaus mit deutlichem Myzelwachstum abgebildet (MK). Hier können neben den Septen der Hyphen auch Appressorien (AP) des Pilzes klar erkannt werden. Eine solche myzelbildende Konidie mit verzweigten Myzelwachstum (mehr als zwei Hyphen mit deutlichem Streckungswachstum gegenüber Keimschläuchen) wurde in den Analysen der Inokulationsexperimente als myzelbildend gewertet und gezählt. Neben dieser Konidie sind sowohl eine ungekeimte Konidie (K) und eine gekeimte Konidie (gK) mit Keimschlauch, aber ohne weiteres Myzelwachstum zu erkennen. Beide wurden in den Analysen nicht als myzelbildend gewertet und daher nicht gezählt. In Abbildung 28 B ist eine gekeimte Konidie abgebildet, bei der im Keimschlauch ein Appressorium (AP) erkannt werden können.

Aus Gründen der Handhabbarkeit wurden die Experimente mit den Linien von RhMLO1-RNAi und RhMLO2-RNAi zusammen durchgeführt und die von RhMLO3/4-RNAi zu einem anderen Zeitpunkt. Dies ergab sich aus der Menge des zu behandelnden Materials, da das Aufnehmen der Sporen des Echten Mehltaus, die Sprühapplikation und das Trocknen der Lösung auf den Blättern möglichst schnell erfolgen muss, um eine genügend hohe Vitalität der Sporen für eine erfolgreiche Infektion zu gewährleisten. Auf Grund der unterschiedlichen Zeitpunkte der Versuchsdurchführung wurden bei den nachfolgenden statistischen Analysen die Versuche mit den Linien von RhMLO1-RNAi und RhMLO2-RNAi zusammen ausgewertet, die Versuche der Linien von RhMLO3/4-RNAi jedoch getrennt von diesen.

Die R Codes der statistischen Analysen sind im Anhang aufgeführt (Anhang A.7.2). Eine Übersicht über die Daten aller Inokulationsexperimente pro getestete Linie ist mittels Boxplots in Abbildung 29 dargestellt.



**Abbildung 29: Boxplot der Daten der Mehltau-Inokulationsexperimente mit den RhMLO-RNAi Linien.**

Aufgetragen ist die Anzahl der ermittelten Konidien mit Myzelbildung pro Probe ( $n=27$ ;  $n=18$  [1C7, 2E1, 3/4E2];  $n=108$  [PCK];  $n=54$  [PCGUS]) der analysierten Linien der jeweils verschiedenen Inokulationsexperimente (A, B, C bei Linien von RhMLO1-RNAi und RhMLO2-RNAi und D, E, F bei Linien von RhMLO3/4-RNAi). Die Bezeichnung IC entspricht 1C, IIC entspricht 2C und IIIC entspricht der Bezeichnung 3/4C der Linien aus Tabelle 31; PCGUS: GUS-RNAi Linie; PCK: nicht-transgene Kontroll-Linien.

Aus Abbildung 29 wird deutlich, dass die gesammelten Daten der Inokulationsexperimente einer großen Streuung unterliegen. Diese ist bei den RhMLO-RNAi Linien als auch bei den Kontrollen (PCK und PCGUS) stark ausgeprägt. Auffällig ist, dass bei den Linien 1C7, 2E1 und im geringeren Maße auch bei 3/4E2 die Streuung geringer ausfällt. Für diese drei Linien lagen nur Werte von jeweils zwei Inokulationen vor, für alle anderen von drei. Da die GUS-RNAi und die nicht-transgene Kontrolle in allen Versuchen gleichermaßen verwendet wurden, weisen die Boxplots dieser Proben 54 beziehungsweise 108 Datenpunkte auf. Es fällt auf, dass die Verteilung der Datenpunkte stark von den Inokulationsexperimenten abhängt. So kann bei Linie 1C1 beispielsweise festgestellt werden, dass alle Datenpunkte des oberen Quartils ausschließlich aus der Inokulation C stammen, bei Linie 1C4 hingegen kommt kein Datenpunkt der Inokulation C im oberen oder unteren Quartil vor, sondern ausschließlich im Bereich des unteren Whiskers. Eine Aussage über einen möglichen Effekt der Linien lässt sich aus dieser Grafik nicht ziehen.

#### 3.1.2.4.1 Auswertung der Inokulationsexperimente der Linien von RhMLO1-RNAi und RhMLO2-RNAi

Wie bereits erwähnt wurden die Experimente aufgrund der Handhabbarkeit der Linien von RhMLO1- und RhMLO2-RNAi (Inokulationen A, B, C) getrennt von denen von RhMLO3/4-RNAi (D, E, F) durchgeführt. Daher wird in diesem Unterkapitel zunächst nur auf die Linien

der ersten beiden Konstrukte eingegangen. Das Ergebnis des Tests auf die Gesamt-Effekte der Versuche ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 32: Test der Inokulationen der Linien von RhMLO1- und RhMLO2-RNAi auf Gesamt-Effekte mittels ANOVA.**

	Df	Deviance	Resid.Df	Resid.Dev	F	Pr(>F)
NULL			329	7853,9		
Inokulation	2	428,09	327	7425,8	14,9343	6,620e-07 ***
Linie	11	864,86	316	6560,9	5,4857	5,679e-08 ***
Inokulation: Linie	20	2472,97	296	4087,9	8,6272	<2,2e-16 ***

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Die Testergebnisse aus Tabelle 32 zeigen stark signifikante Unterschiede zwischen den Inokulationen auf (p-Wert von 6,620e-07). Des Weiteren konnte eine substantielle Heterogenität in den Unterschieden zwischen den Linien über die Inokulationen hinweg nachgewiesen werden, da die Anwesenheit oder das Ausmaß der Unterschiede zwischen den Linien signifikant zwischen den Wiederholungen der Inokulationen variiert (p-Wert: <2,2e-16).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Linien, gepoolt über die Wiederholungen der Inokulationsexperimente A, B und C, im Vergleich zur Kontrolle (PCK) aufgeführt.

**Tabelle 33: Ergebnisse des Vergleichs der RhMLO1- und RhMLO2-RNAi Linien gegen die Kontrolle über alle Inokulationsexperimente auf die Myzel-Bildung.**

contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
IC3 - PCK	-0,6402811	0,2573371	NA	-2,488	0,1034
IC4 - PCK	-1,9377039	0,7662683	NA	-2,529	0,0935 .
IC7 - PCK	NA	NA	NA	NA	NA
IC8 - PCK	-1,0639981	0,3610578	NA	-2,947	0,0295 *
ICI - PCK	-2,7564333	1,1015569	NA	-2,502	0,0999 .
IIC12 - PCK	-1,2773152	0,4027914	NA	-3,171	0,0146 *
IIC3 - PCK	-0,6216327	0,2383210	NA	-2,608	0,0763 .
IIC4 - PCK	-0,9793446	0,3532725	NA	-2,772	0,0490 *
IIC5 - PCK	-0,3124249	0,2357907	NA	-1,325	0,7167
IIE1 - PCK	NA	NA	NA	NA	NA
PCGUS - PCK	-0,2850334	0,2311007	NA	-1,233	0,7702

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Bei der Betrachtung der Daten pro Linie über alle Inokulationsexperimente hinweg, konnte bei IC8 (p-Wert: 0,0295), IC12 (p-Wert: 0,0146) und IC4 (p-Wert: 0,0490) eine signifikante Reduktion an myzelbildenden Konidien im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden, wobei der Wert von IC4 nur schwach signifikant ist (Tabelle 33). Bei allen anderen Linien, wie auch der transgenen Kontrolle (PCGUS), konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle

beobachtet werden. Die Werte der Linien 1C7 und 2E1 sind hier fehlend, da diese beiden Linien nur mit zwei Wiederholungen (B und C) vorlagen.

In einer zweiten Analyse wurden die Linien einzeln für jedes Inokulationsexperiment auf Unterschiede zur Kontrolle getestet. Die Ergebnisse dieser statistischen Analyse sind in den nachfolgenden Tabellen für jedes der Inokulationsexperimente A, B und C aufgeführt.

**Tabelle 34: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO1- und RhMLO2-RNAi zur Kontrolle der Inokulation A auf die Myzel-Bildung.**

contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
IC3 - PCK	-0,34174929	0,2998785	NA	-1,140	0,8198
IC4 - PCK	-1,88838630	0,5789200	NA	-3,262	0,0108 *
IC7 - PCK	NA	NA	NA	NA	NA
IC8 - PCK	-1,69167601	0,5286870	NA	-3,200	0,0133 *
ICI - PCK	-5,02388052	2,6813809	NA	-1,874	0,3645
IIC12-PCK	-0,79704678	0,3580358	NA	-2,226	0,1883
IIC3 - PCK	-1,20616819	0,4255261	NA	-2,835	0,0410 *
IIC4 - PCK	0,17461651	0,2513276	NA	0,695	0,9682
IIC5 - PCK	0,19782574	0,2856559	NA	0,693	0,9686
IIE1 - PCK	NA	NA	NA	NA	NA
PCGUS -PCK	0,20722810	0,2487875	NA	0,833	0,9378

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

**Tabelle 35: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO1- und RhMLO2-RNAi zur Kontrolle der Inokulation B auf die Myzel-Bildung.**

contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
IC3 - PCK	-0,67252789	0,6059269	NA	-1,110	0,8343
IC4 - PCK	0,70350997	0,3853919	NA	1,825	0,3936
IC7 - PCK	-0,24686008	0,5155072	NA	-0,479	0,9925
IC8 - PCK	1,28209058	0,3406927	NA	3,763	0,0017 **
ICI - PCK	-3,17805383	1,9125280	NA	-1,662	0,4982
IIC12 - PCK	0,12699969	0,4540249	NA	0,280	0,9992
IIC3 - PCK	0,25593337	0,4361566	NA	0,587	0,9834
IIC4 - PCK	-0,33024169	0,5313803	NA	-0,621	0,9792
IIC5 - PCK	-0,40546511	0,5464366	NA	-0,742	0,9593
IIE1 - PCK	-1,13036099	0,7327931	NA	-1,543	0,5772
PCGUS - PCK	-0,45347433	0,5564231	NA	-0,815	0,9425

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

**Tabelle 36: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO1- und RhMLO2-RNAi zur Kontrolle der Inokulation C auf die Myzel-Bildung.**

contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
IC3 - PCK	-0,90656618	0,3727291	NA	-2,432	0,1184
IC4 - PCK	-4,62823546	2,1910793	NA	-2,112	0,2375
IC7 - PCK	-2,43101088	0,7444291	NA	-3,266	0,0106 *
IC8 - PCK	-2,78240877	0,8818633	NA	-3,155	0,0153 *
ICI - PCK	-0,06736553	0,2707057	NA	-0,249	0,9995
IIC12 - PCK	-3,16189839	1,0610560	NA	-2,980	0,0267 *
IIC3 - PCK	-0,91466339	0,3739878	NA	-2,446	0,1146
IIC4 - PCK	-2,78240877	0,8818631	NA	-3,155	0,0153 *
IIC5 - PCK	-0,72963547	0,3466745	NA	-2,105	0,2410
IIE1 - PCK	-1,89820635	0,5787208	NA	-3,280	0,0101 *
PCGUS - PCK	-0,60885394	0,3304026	NA	-1,843	0,3830

Signifikanzkodierung:0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Von den Linien des RhMLO1-RNAi Konstrukts konnte bei Inokulation A für 1C4 (p-Wert: 0,0108) und 1C8 (p-Wert: 0,0133) eine signifikante Reduktion an myzelbildenden Konidien zur Kontrolle nachgewiesen werden (Tabelle 34). Bei Inokulation B hingegen wies die Linie 1C8 eine signifikant höhere Anzahl an myzelbildenden Konidien zur Kontrolle auf (p-Wert: 0,0017, estimate: 1,28209058). Bei der dritten Wiederholung (Inokulation C) kann für diese Linie wiederum eine signifikant geringere Anzahl an Konidien mit Myzel-Bildung beobachtet werden (1C8: p-Wert: 0,0153, estimate: -2,78240877), wie auch für die Linie 1C7 (p-Wert: 0,0106) (Tabelle 35 und Tabelle 36). Alle anderen Linien von RhMLO1-RNAi weisen, wie die transgene Kontrolle (PCGUS), keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. Somit konnte nur für 1C8 über alle Inokulationen hinweg ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle in der Anzahl an Kolonien mit Myzel-Bildung festgestellt werden, der sich jedoch in der Ausprägung stark unterscheidet, da in zwei Wiederholungen eine geringere Anfälligkeit und in einer eine höhere als bei der Kontrolle festgestellt werden konnte.

Bei Inokulation A konnten von den Linien des Konstrukts RhMLO2-RNAi nur 2C3 (p-Wert: 0,0410) als schwach signifikant unterschiedlich zur Kontrolle getestet werden (Tabelle 34). Bei den Testergebnissen von Inokulation B hingegen konnte keine der Linien von RhMLO2-RNAi als signifikant unterschiedlich in der Anzahl myzelbildender Konidien zur Kontrolle getestet werden (Tabelle 35). Die Testergebnisse der Inokulation C hingegen weisen sowohl 2C12 (p-Wert: 0,0267) als auch 2C4 (p-Wert: 0,0153) und 2E1 (p-Wert: 0,0101) mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle PCK aus (Tabelle 36). Damit konnte für jede der signifikant getesteten Linien von RhMLO2-RNAi in jeweils nur einer Wiederholung der Inok-

ulationsexperimente eine signifikant geringere Anzahl an Konidien mit Myzel-Bildung im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der statistischen Analysen lassen eine schlüssige Beurteilung der Inokulationsergebnisse der RhMLO1-RNAi und RhMLO2-RNAi Linien nur schwer zu. Es kann zwar für einige Linien (zum Beispiel 1C8) ein schwacher Effekt nachgewiesen werden, die Varianz zwischen den Versuchswiederholungen macht eine definitive Aussage über eine erhöhte Resistenz der Linien jedoch fraglich.

### 3.1.2.4.2 Auswertung der Inokulationsexperimente der Linien von RhMLO3/4-RNAi

In diesem Unterkapitel wird auf die Ergebnisse der Inokulationen D, E und F der Linien von RhMLO3/4-RNAi eingegangen. Die Ergebnisse der statistischen Analysen auf die Gesamteffekte der Versuche können Tabelle 37 entnommen werden.

**Tabelle 37: Test der Inokulationen der Linien von RhMLO3/4-RNAi auf Gesamteffekte mittels ANOVA.**

	Df	Deviance	Resid.Df	Resid.Dev	F	Pr(>F)
NULL			205	4355,2		
Inokulation	2	387,47	203	3967,7	11,9542	1,306e-05 ***
Linie	6	316,55	197	3651,2	3,2554	0,0045686 **
Inokulation: Linie	11	586,78	186	3064,4	3,2915	0,0003804 ***

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Die Inokulationen weisen mit einem p-Wert von 1,306e-05 stark signifikante Unterschiede untereinander auf (Tabelle 37). Auch die Unterschiede zwischen den Linien über die Inokulationen hinweg weisen mit einem p-Wert von 0,0003804 eine substantielle Heterogenität auf. Über die Inokulationen D, E und F hinweg wurden die Daten der Linien von RhMLO3/4-RNAi zur Kontrolle verglichen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 38 aufgeführt.

**Tabelle 38: Ergebnisse des Vergleichs der RhMLO3/4-RNAi Linien gegen die Kontrolle über alle Inokulationsexperimente auf die Myzel-Bildung.**

contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
IIIC2 - PCK	-0,5229321	0,3822471	NA	-1,368	0,5456
IIIC5 - PCK	-0,1771354	0,2446401	NA	-0,724	0,9025
IIIC6 - PCK	-0,8145121	0,3167858	NA	-2,571	0,0513 .
IIIC9 - PCK	-0,6523890	0,3332087	NA	-1,958	0,2145
IIIE2 - PCK	NA	NA	NA	NA	NA
PCGUS - PCK	-0,1177363	0,2347803	NA	-0,501	0,9651

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1; III entspricht der Bezeichnung 3/4 der Linien

Die gepoolten Daten über die drei Inokulationsexperimente ergaben für keine der Linien von RhMLO3/4-RNAi einen signifikanten Unterschied in der Anzahl myzelbildender Konidien zur Kontrolle (Tabelle 38). Einzig die Linie 3/4C6 liegt mit einem p-Wert von 0,0513 nur knapp oberhalb des Signifikanzlevels von 0,05. Für die Linie 3/4E2 sind in Tabelle 38 keine Daten angegeben, da für diese nur Daten für zwei Inokulationen vorliegen.

In den nachfolgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Analysen der Linien einzeln, im Vergleich zur Kontrolle für jedes der drei Inokulationsexperimente D, E und F aufgeführt.

**Tabelle 39: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO3/4-RNAi zur Kontrolle der Inokulation D auf die Myzel-Bildung.**

contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
IIIC2 - PCK	-1,81177834	1,0490519	NA	-1,727	0,3262
IIIC5 - PCK	0,21142349	0,4706813	NA	0,449	0,9745
IIIC6 - PCK	0,09776417	0,4875070	NA	0,201	0,9976
IIIC9 - PCK	-1,25216255	0,8163374	NA	-1,534	0,4395
IIIE2 - PCK	-0,35026055	0,5678730	NA	-0,617	0,9373
PCGUS - PCK	0,22781730	0,4683621	NA	0,486	0,9680

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1; III entspricht der Bezeichnung 3/4 der Linien

**Tabelle 40: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO3/4-RNAi zur Kontrolle der Inokulation E auf die Myzel-Bildung.**

contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
IIIC2 - PCK	-0,39973443	0,3516467	NA	-1,137	0,6939
IIIC5 - PCK	-0,05513207	0,3109025	NA	-0,177	0,9983
IIIC6 - PCK	-0,96940056	0,4413039	NA	-2,197	0,1296
IIIC9 - PCK	0,12245495	0,2932308	NA	0,418	0,9794
IIIE2 - PCK	-1,85094834	0,6529378	NA	-2,835	0,0243*
PCGUS - PCK	-0,29152085	0,3378717	NA	-0,863	0,8446

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1; III entspricht der Bezeichnung 3/4 der Linien

**Tabelle 41: Ergebnisse des Vergleichs der Linien von RhMLO3/4-RNAi zur Kontrolle der Inokulation F auf die Myzel-Bildung.**

contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
IIIC2 - PCK	0,64271633	0,3014142	NA	2,132	0,1494
IIIC5 - PCK	-0,68769758	0,4695081	NA	-1,465	0,4831
IIIC6 - PCK	-1,57189999	0,6861248	NA	-2,291	0,1042
IIIC9 - PCK	-0,82745952	0,4968516	NA	-1,665	0,3607
IIIE2 - PCK	NA	NA	NA	NA	NA
PCGUS - PCK	-0,28950523	0,4032069	NA	-0,718	0,9047

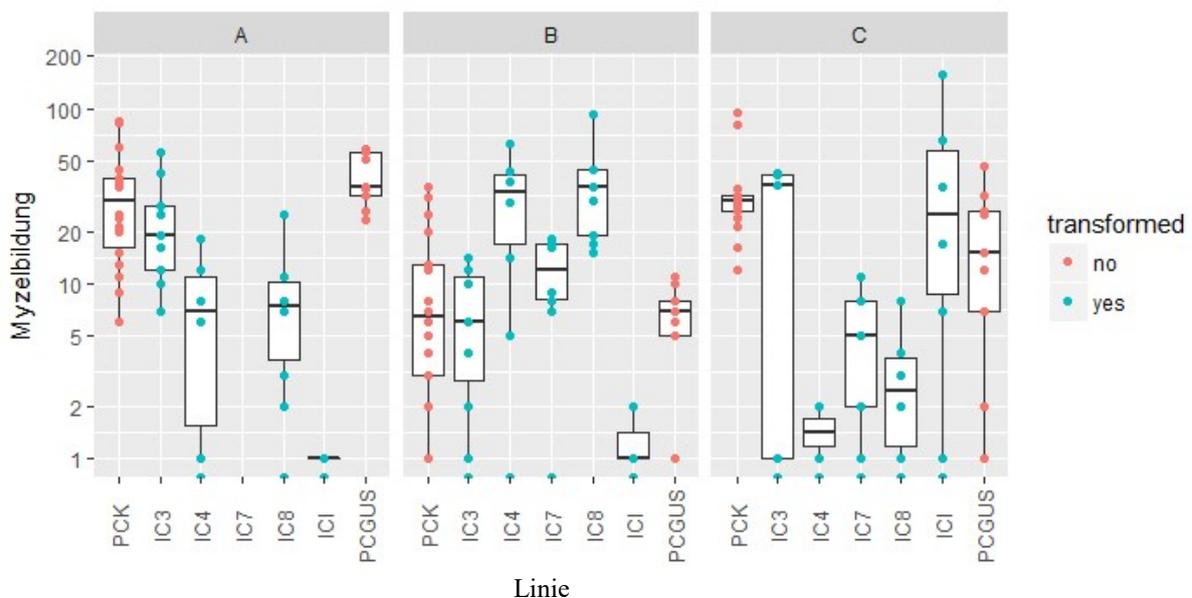
Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1; III entspricht der Bezeichnung 3/4 der Linien

Die Auswertung der Daten aus Inokulation D ergaben für keine der Linien einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Tabelle 39). Bei Inokulation E hingegen, konnte für 3/4E2 (p-Wert: 0,0243) ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Tabelle 40) und bei In-

okulation F wiederum für keine der Linien (Tabelle 41). Auch wenn hier für einige Linien (3/4C6 und 3/4E2) eine Tendenz zu einer leicht reduzierten Anfälligkeit gegenüber der Kontrolle beobachtet werden kann, ist doch kein statistisch signifikanter Unterschied der RhMLO3/4 RNAi Linien im Vergleich zu Kontrolle festzustellen.

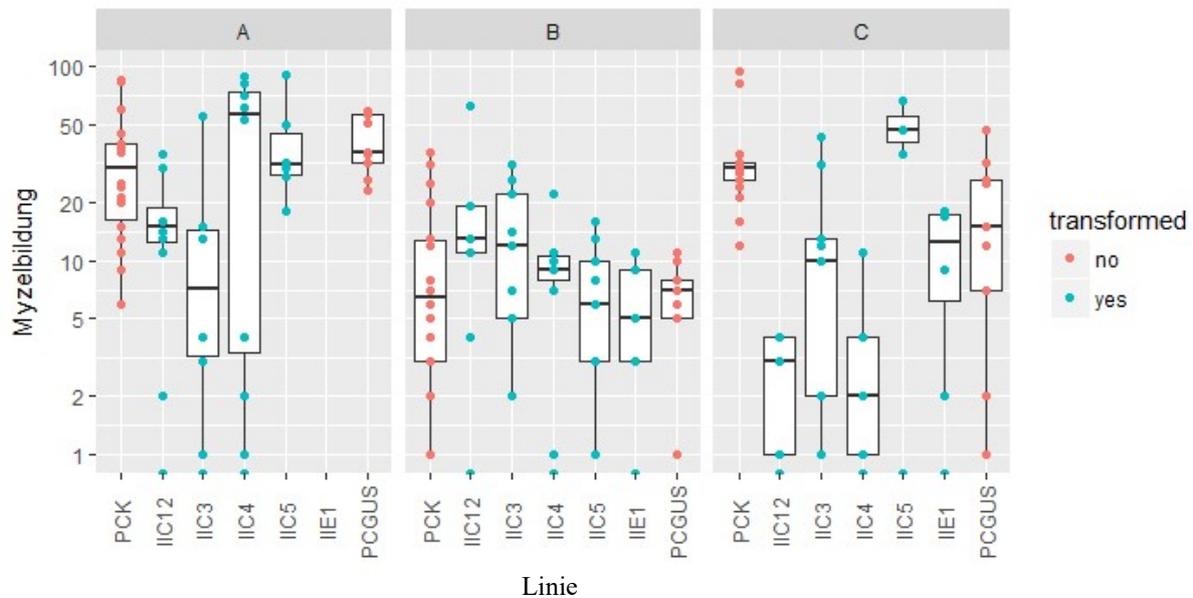
### 3.1.2.4.3 Auswertung aller RhMLO-RNAi Linien als Gruppen

Anhand der vorangegangenen Analysen der Inokulationsexperimente mit den Linien von RhMLO1-, RhMLO2- und RhMLO3/4-RNAi konnten keine klaren Aussagen bezüglich einer erhöhten Resistenz durch die Herunterregulierung der *RhMLO*-Gene getroffen werden. Auch wenn eine Tendenz oder ein schwacher Effekt bei einigen Linien beobachtet werden konnte. Anhand der nachfolgenden Analysen sollte daher überprüft werden, ob bei der Betrachtung aller Daten der Linien eines RhMLO-RNAi Konstrukts zusammen ein Effekt gegenüber der Kontrolle nachzuweisen ist. Hierfür wurden die Linien eines RhMLO-RNAi Konstrukts zusammen unter dem Oberbegriff „transformed“ gefasst und die Kontrollen (PCK und PCGUS) unter den Oberbegriff „nontransformed“ (auch wenn dieser für die transgene PCGUS Kontrolle nicht ganz korrekt ist). In den nachfolgenden Abbildungen sind die Boxplots der Linien von RhMLO1- (Abbildung 30), RhMLO2- (Abbildung 31) und RhMLO3/4-RNAi (Abbildung 32) zusammen mit den Kontrollen jeweils über die drei Inokulationsexperimente hinweg dargestellt.



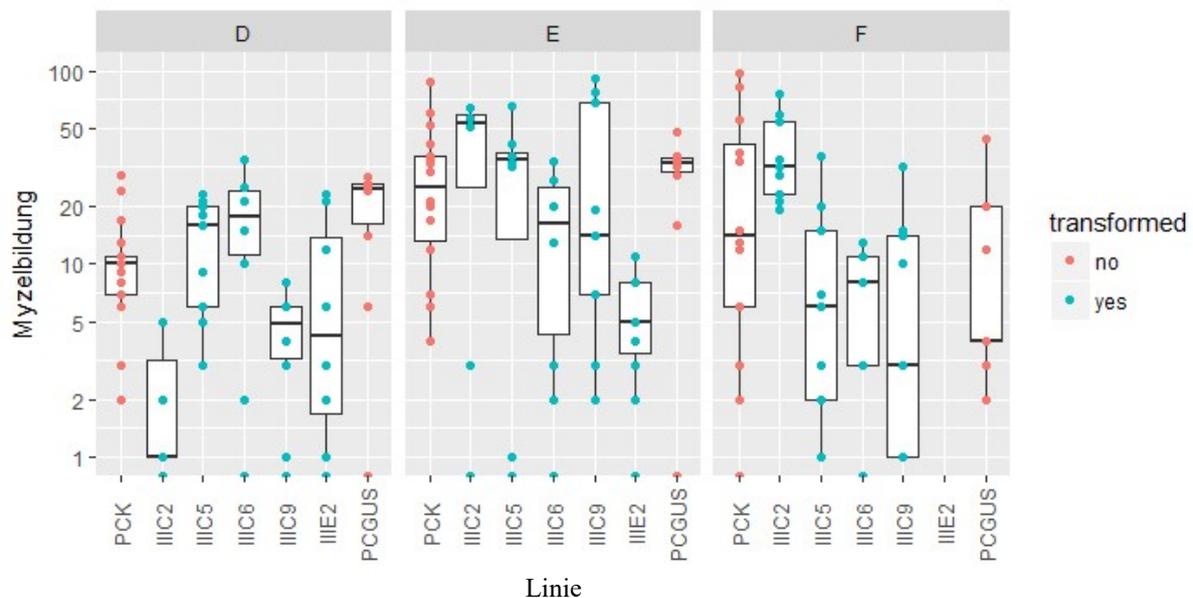
**Abbildung 30: Boxplots der Ergebnisse der Inokulationen mit den RhMLO1-RNAi Linien im Vergleich zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung.**

Aufgetragen sind die Werte der Myzelbildung der Linien von RhMLO1-RNAi und der Kontrollen PCK (nicht-transgene 'Pariser Charme' Kontrolle) und PCGUS (transgene GUS-RNAi Kontrolle) in den Gruppen „transformed“ (RhMLO1-RNAi Linien) und „non-transformed“ (Kontrollen) über die drei Inokulationsexperimente A, B und C.



**Abbildung 31: Boxplots der Ergebnisse der Inokulationen mit den RhMLO2-RNAi Linien im Vergleich zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung.**

Aufgetragen sind die Werte der Myzelbildung der Linien von RhMLO2-RNAi und der Kontrollen PCK (nicht-transgene 'Pariser Charme' Kontrolle) und PCGUS (transgene GUS-RNAi Kontrolle) in den Gruppen „transformed“ (RhMLO2-RNAi Linien) und „non-transformed“ (Kontrollen) über die drei Inokulationsexperimente A, B und C.



**Abbildung 32: Boxplots der Ergebnisse der Inokulationen mit den RhMLO3/4-RNAi Linien im Vergleich zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung.**

Aufgetragen sind die Werte der Myzelbildung der Linien von RhMLO3/4-RNAi und der Kontrollen PCK (nicht-transgene 'Pariser Charme' Kontrolle) und PCGUS (transgene GUS-RNAi Kontrolle) in den Gruppen „transformed“ (RhMLO3/4-RNAi Linien) und „non-transformed“ (Kontrollen) über die drei Inokulationsexperimente D, E und F.

Aus den Abbildungen der Boxplots der RhMLO-RNAi Linien und der Kontrollen werden nochmals die im vorherigen Kapitel beschriebene Varianz der Daten als auch die Unterschiede zwischen den Linien über die Inokulationen hinweg deutlich. In Abbildung 30 lässt sich eine Tendenz zu niedrigen Werten der Myzelbildung der RhMLO1-RNAi Linien insbesondere bei

Inokulation A und C erkennen. Diese Tendenz lässt sich bei den Daten der RhMLO2-RNAi Linien in Abbildung 31 nicht in dem Ausmaß erkennen. Hier weisen die Linien jedoch bei Inokulation C auch tendenziell geringere Raten der Myzelbildung auf. Bei den Linien von RhMLO3/4-RNAi in Abbildung 32 ist das Gesamtbild noch schwieriger einzuordnen. Hier scheinen einige Linien in bestimmten Wiederholungen Effekte zu haben, aber über alle Linien der Gruppe hinweg ist dies jedoch nicht so deutlich wie bei den Gruppen von RhMLO1- und RhMLO2-RNAi. Die statistischen Analysen wurden für die RhMLO-RNAi Gruppen einzeln durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet, der R Code kann dem Anhang (A.7.2) entnommen werden.

**Tabelle 42: Ergebnisse der Vergleichs aller RhMLO1-RNAi Linien als Gruppe zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung.**

	Df	Deviance	Resid.Df	Resid.Dev	F	Pr(>F)
NULL			206	4996,4		
Inokulation	2	128,05	204	4868,3	4,78	0,009476 **
transformed	1	492,64	203	4375,7	36,76	7,245e-09 ***
transformed: Linie	5	129,36	198	4246,3	1,93	0,091184 .
Inokulation: transformed	2	492,25	196	3754,1	18,36	5,231e-08 ***
Inokulation: transformed: Linie	9	1393,59	187	2360,5	11,55	2,399e-14 ***

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

**Tabelle 43: Ergebnisse der Vergleichs aller RhMLO2-RNAi Linien als Gruppe zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung.**

	Df	Deviance	Resid.Df	Resid.Dev	F	Pr(>F)
NULL			203	4476,6		
Inokulation	2	834,27	201	3642,3	30,09	4,952e-12 ***
transformed	1	317,39	200	3324,9	22,89	3,504e-06 ***
transformed: Linie	5	202,03	195	3122,9	2,91	0,0147612 *
Inokulation: transformed	2	189,10	193	2933,8	6,82	0,0013894 **
Inokulation: transformed: Linie	9	458,71	184	2475,1	3,68	0,0002967

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

**Tabelle 44: Ergebnisse der Vergleichs aller RhMLO3/4-RNAi Linien als Gruppe zu den Kontrollen auf die Myzel-Bildung.**

	Df	Deviance	Resid.Df	Resid.Dev	F	Pr(>F)
NULL			205	4355,2		
Inokulation transformed	2 1	387,47 75,58	203 202	3967,7 3892,2	11,95 4,66	1,306e-05 *** 0,0320905 *
transformed: Linie	5	240,98	197	3651,2	2,97	0,0131566 *
Inokulation: transformed	2	2,01	195	3649,2	0,061	0,9399902
Inokulation: transformed: Linie	9	584,77	186	3064,4	4,01	0,0001055 ***

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Die Analysen ergaben für jede RhMLO-RNAi Gruppe einen signifikanten Unterschied in der Anzahl myzelbildender Konidien zu den Kontrollen („transformed“). Diese Signifikanzlevels unterscheiden sich allerdings zwischen den Gruppen. So können bei der RhMLO1-RNAi und der RhMLO2-RNAi Gruppe hoch signifikante Unterschiede festgestellt werden, wobei der von RhMLO1-RNAi mit einem p-Wert von 7,245e-09 (Tabelle 42) stärker ausgeprägt ist als der von der RhMLO2-RNAi Gruppe (p-Wert: 3,504e-06, Tabelle 43). Bei der Gruppe von RhMLO3/4-RNAi kann nur ein schwach signifikanter p-Wert von 0,0320905 verzeichnet werden (Tabelle 44). Jedoch ist auch festzustellen, dass das Auftreten und das Ausmaß des Unterschieds bei den Gruppen von RhMLO1- und RhMLO2-RNAi sich signifikant über die Inokulationsexperimente unterscheidet (Inokulation:transformed p-Wert RhMLO1-RNAi:5,231e-08; p-Wert RhMLO2-RNAi: 0,0013894). Bei der Gruppe von RhMLO3/4-RNAi ist das Auftreten und das Ausmaß des Unterschieds jedoch nicht signifikant von dem Inokulationsexperiment abhängig (p-Wert: 0,9399902).

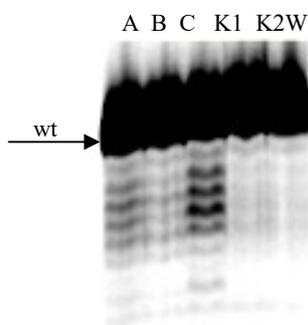
## 3.2 TALEN-vermittelte Mutation der *RhMLO* Gene

### 3.2.1 Transiente Transformation der TALEN Konstrukte

Die TALEN Konstrukte für die *RhMLOs* wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Lahaye (Universität Tübingen, Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Allgemeine Genetik) zur Verfügung gestellt. Die Aktivität der Konstrukte wurde jeweils in dem in der Arbeitsgruppe etabliertem, Hefe-basiertem Assay nachgewiesen (verändert nach Townsend et al. 2009). Zunächst wurden zwei Konstrukte bereitgestellt, die anhand der Sequenzen von *RhMLO3* und *RhMLO4* entwickelt wurden und somit auch beide Gene simultan binden sollen. Da mittels stabiler Transformationen von somatischen Embryonen der

tetraploiden Rosensorte 'Pariser Charme' nur sehr niedriger Transformationseffizienzen aus den ersten Experimenten erzielt wurden (siehe Kapitel 3.2.2), wurden weitere TALEN Konstrukte von der Arbeitsgruppe Lahaye bereitgestellt. Diese waren in den pBinPlus Vektor kloniert, der in früheren Versuchen in der Arbeitsgruppe Debener (Abteilung Molekulare Pflanzenzüchtung, Leibniz Universität Hannover) erfolgreich für die Transformation von Rosen eingesetzt worden war (Terefe-Ayana et al. 2011). Somit sollten mögliche Inkompatibilitäten mit dem Vektor-Backbone umgangen werden. Mittels transienten Ansatzes sollte daher überprüft werden, ob Unterschiede in der Effizienz der verschiedenen Generationen an TALEN Konstrukten vorlagen und ob ein transienter Ansatz sich generell zum Nachweis funktioneller TALEN Konstrukte eignet.

Zunächst wurde das Konstrukt TMlo3/4-2 transient mittels Agro-Infiltration in Petalen der Rosensorte 'Pariser Charme' infiltriert. Zuvor wurde die Suspension 1:1 mit der Suspension des dsRed-Reporter gen Konstrukts gemischt. Nach der Inkubation von sechs Tagen wurden unter LED-Licht die dsRed-positiven Teile der infiltrierten Petalen beprobt. Die isolierte DNA wurde in PCR-Reaktionen zur Amplifikation der TALEN-Bindestelle eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde mit 40 Zyklen gefahren, um seltene Mutationen auf dem Polyacrylamid-Gel sichtbar zu machen (Abbildung 33).



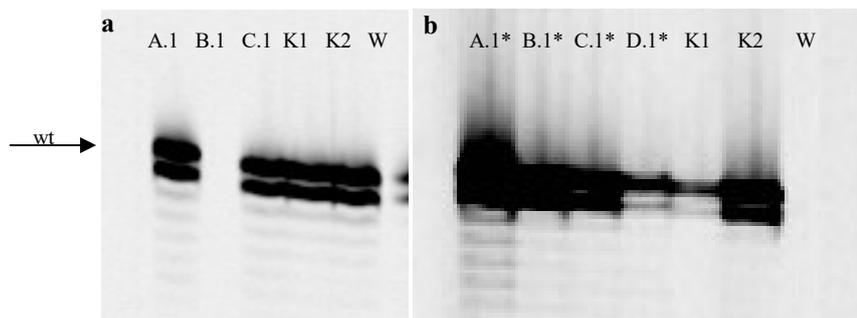
**Abbildung 33: PAA-Gelelektrophorese der amplifizierten Bindestellen der transienten Transformation mit dem Konstrukt TMlo3/4-2.**

PAA-Gelelektrophorese (8 % Polyacrylamid-Gel) der Proben der infiltrierten 'Pariser Charme' Petalen mit dem originären Konstrukt TMlo3/4-2 der Versuchswiederholungen A, B und C; K1: Probe von Petalen, welche ausschließlich mit dem dsRed Konstrukt infiltriert wurde; K2: nicht-transgene 'Pariser Charme' Probe; W: Wasser-Kontrolle; der Pfeil markiert die stark ausgeprägte Wildtyp-Bande (wt).

Aus Abbildung 33 wird deutlich, dass in den Proben der TMlo3/4-2 Infiltration A, B und C zusätzliche Banden zu der Wildtyp-Bande (wt) auftreten. Diese befinden sich ausschließlich unterhalb der wt Bande, was für Amplifikate kürzerer Sequenzen spricht. Hauptsächlich können Unterschiede in der Bandengröße von wenigen Basen (2 bis 5) beobachtet werden. In den Kontrollen (K1, K2, W) konnten abweichende Banden zur wt Bande nicht oder nur sehr schwach festgestellt werden. Dies kann zum Einen auf ein Überlaufen der Proben in andere

Taschen oder auf Hintergrund Amplifikate, die in allen Proben vorliegen und typisch für starke Proben auf PAA-Gelen sind, hindeuten. Der transiente Ansatz kann somit die Funktionalität des TALEN Konstrukts nachweisen und ist sensitiv genug, um Mutationen mittels PCR und PAA-Gelelektrophorese zu detektieren.

In einem zweiten Ansatz wurde das Konstrukt TMlo3/4-1 (TALEN erster Generation) und das Konstrukt TMlo3/4-1\* (TALEN zweiter Generation) in einem transienten Assay eingesetzt. Bei dem Konstrukt TMlo3/4-1\* handelt es sich um das in den pBinPlus Hintergrund klonierte Pendant zu TMlo3/4-1. Dieses Konstrukt lag als einziges in beiden Vektor-Hintergründen vor, weshalb es für diesen Test ausgewählt wurde. Des Weiteren konnten mit dem originären Konstrukt keine stabil-transgenen Linien regeneriert werden. In Abbildung 34 ist das Ergebnis der Infiltrationen beider Konstrukte durch Visualisierung mittels PAA-Gelelektrophorese aufgeführt.



**Abbildung 34: PAA-Gelelektrophorese der amplifizierten Bindestellender transienten Transformation mit den Konstrukten TMlo3/4-1 und TMlo3/4-1\*.**

a) PAA-Gelelektrophorese der Proben der infiltrierten 'Pariser Charme' Petalen mit dem originären Konstrukt TMlo3/4-1 (A.1, B.1, C.1); b) PAA-Gelelektrophorese der infiltrierten Proben mit dem Konstrukt TMlo3/4-1\* im pBinPlus Hintergrund (A.1\* bis D.1\*); A bis D: Proben der Versuchswiederholungen A, B, C und D; K1: Probe von Petalen, welche ausschließlich mit dem dsRed Konstrukt infiltriert wurde; K2: nicht-transgene 'Pariser Charme' Probe; W: Wasser-Kontrolle; der Pfeil markiert die Wildtyp-Bande (wt).

Bei den Infiltrationen beider Konstrukte kann in keiner der analysierten Proben eindeutig ein abweichendes Bandenmuster zur Wildtyp-Bande festgestellt werden (Abbildung 34). Die Probe der Infiltration B ist mit dem Konstrukt TMlo3/4-1 (a) ausgefallen und eine Parallelprobe lag nicht vor. In der Probe von Infiltration A und C konnten jedoch keine abweichenden Bandenmuster zur wt Bande detektiert werden. Bei der Probe A mit dem Konstrukt TMlo3/4-1\* (b) konnten schwache Banden unterhalb der wt Bande detektiert werden. Diese Probe ist jedoch im Vergleich zu den restlichen Proben stark ausgeprägt. Bei höherer Intensität weisen alle Proben der PAA-Gelelektrophorese diese Art von Banden unterhalb der wt Bande auf, was typisch für Analysen von PCR-Produkten auf PAA-Gelen ist (Hintergrund Amplifikate). Daher sind diese Banden als Hintergrund der starken Probe und nicht als tatsächliche Frag-

mente, welche durch Mutationen entstanden sind, einzuordnen. Es konnte daher für keines der beiden Konstrukte ein Nachweis der Funktion erbracht werden.

### 3.2.2 Stabile Transformation der TALEN Konstrukte

#### 3.2.2.1 Transformationseffizienz und Überprüfung des transgenen Charakters

Die von der Arbeitsgruppe Lahaye (Universität Tübingen) bereitgestellten und getesteten TALEN Konstrukte (erster und zweiter Generation) gegen die vier *RhMLO* Gene wurden für insgesamt fünf stabile Transformationsexperimente von somatischen Embryonen der tetraploiden Rosensorte 'Pariser Charme' mit 2.050 Explantaten (embryogene Cluster) eingesetzt. Eine Übersicht über die Transformationen mit Angaben zur Lage der TALEN-Bindestellen in der Gensequenz, der für die Transformation eingesetzten Explantate und die daraus resultierende Transformationseffizienz, ist in Tabelle 45 gegeben.

**Tabelle 45: Übersicht über die Transformationsexperimente mit den TALEN-Konstrukten.**

TALEN Konstrukt	<i>RhMLO</i>	TALEN Zielregion	Anzahl eingesetzter Explantate	Resultierte vermehrungsfähige Linien	Transformationseffizienz [%]
TMlo3/4-1	<i>RhMLO3</i> <i>RhMLO4</i>	Exon 1	525	0	0
TMlo3/4-2	<i>RhMLO3</i> <i>RhMLO4</i>	Exon 3	425	5	1,18
TMlo3/4-1*	<i>RhMLO3</i> <i>RhMLO4</i>	Exon 1	200	0	0
TMlo1-1*	<i>RhMLO1</i>	Exon7-8	200	1**	0,5
TMlo2-1*	<i>RhMLO2</i>	Exon 7	375	1**	0,27
TMlo2-2*	<i>RhMLO2</i>	Exon 8	325	0	0
			∑ 2050	∑ 7	∅ 0,34

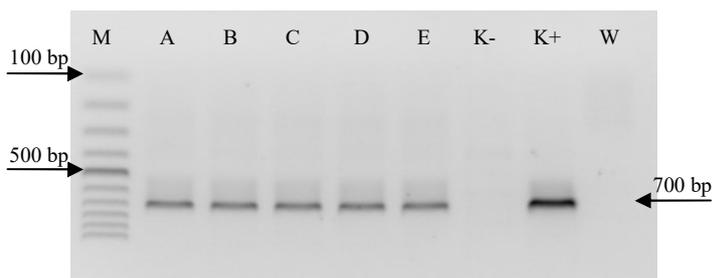
\* TALEN-Konstrukte im pBinPlus Hintergrund

\*\* Sprosse zum Abschluss der Versuche noch nicht vermehrungsfähig

Aus Tabelle 45 geht hervor, dass die Transformationseffizienzen für die TALEN Konstrukte von 0 % bis maximal 1,18 % für TMlo3/4-2 reichen. Insgesamt konnte nur eine Effizienz von 0,34 % erzielt werden. Auch mit den in den pBinPlus Hintergrund klonierten Konstrukten konnten keine höheren Effizienzen erzielt werden. Einzig bei Transformationen mit dem Konstrukt TMlo3/4-2 konnten fünf putativ unabhängige Linien regeneriert werden, die für nachfolgende Analysen zur Verfügung standen. Die Linien, die aus den Transformationen mit den Konstrukten TMlo1-1\* und TMlo2-1\* regenerierten, waren zum Abschluss der Laborarbeiten noch nicht vermehrungsfähig und standen somit nicht für weiterführende Charakteri-

sierungen zur Verfügung. In nachfolgenden Analysen der TALEN Konstrukte fiel auf, dass das Konstrukt TMlo1-1\* im Bereich einer Exon-Intron Grenze auf der genomischen Sequenz von *RhMLO1* liegt. Dies hat zur Folge, dass beide TALEN-Arme durch Intron Nr. 7 getrennt sind, was 294 bp in der Sequenz ausmacht. Durch diesen großen Abstand in den Erkennungssequenzen der beiden TALEN-Arme kann es zu keiner Dimerisierung der FokI-Nukleasen kommen und folglich zu keinem Doppelstrangbruch in der DNA. Das Konstrukt ist demnach für die Erzeugung von Mutationen wirkungslos.

Von den fünf mit dem Konstrukt TMlo3/4-2 erzeugten Linien (T3/4A, T3/4B, T3/4C, T3/4D und T3/4E) wurde Blattmaterial von *in vitro* Sprossen für die Isolation von DNA entnommen. Mit der isolierten DNA wurden NPTII-PCRs zur Überprüfung der Integration der T-DNA und PCRs zum Test auf eine Kontamination mit persistierenden Agrobakterien durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in den nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 35 und Abbildung 36) dargestellt.



**Abbildung 35: Agarosegelelektrophorese der NPTII-PCR der TALEN Linien.**

M: 100 bp Marker (Thermo Fisher Scientific), A-E: TALEN Linien T3/4A bis T3/4E, K-: negativ Kontrolle (wt 'Pariser Charme'), K+: positiv Kontrolle (Plasmid-DNA), W: Wasser-Kontrolle.



**Abbildung 36: Agarosegelelektrophorese der PCR zur Überprüfung auf persistierende Agrobakterien in den TALEN Linien.**

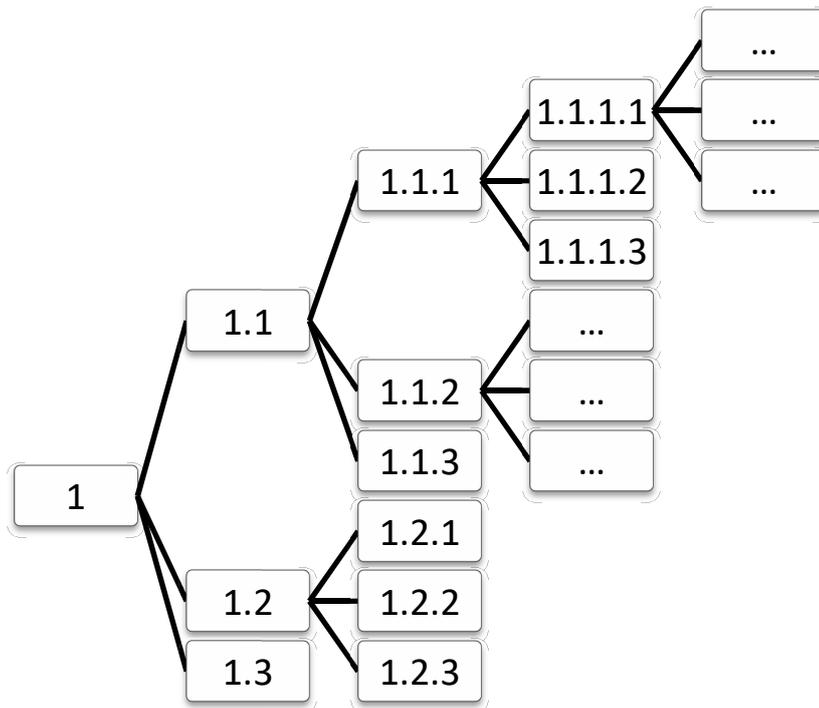
M: 100 bp Marker (Thermo Fisher Scientific), A-E: TALEN Linien T3/4A bis T3/4E, K-: negativ Kontrolle (wt 'Pariser Charme'), K+: positiv Kontrolle (*A. tumefaciens* DNA), W: Wasser-Kontrolle.

In allen regenerierten TALEN Linien konnte mittels PCR das *NPTII*-Gen nachgewiesen werden. Alle Proben in Abbildung 35 wiesen, wie die Positivkontrolle, die typische 700 bp große Bande auf. Beim Test auf persistierende Agrobakterien konnte keine DNA von *A. tumefaciens* nachgewiesen werden, da keine der Proben die 600 bp Bande der Positivkontrolle aufwies (Abbildung 36).

Alle fünf Linien benötigten eine lange Phase auf Regenerationsmedium, bis Sprosse für die Proliferation entnommen werden konnte (mindestens acht Monate). Die regenerierten Sprosse zeigten alle die phänotypischen Merkmale wie auch die RNAi Linien von Transformation A (vergleiche Kapitel 3.1.2.1) auf: Buschiges und gedrungenes Wachstum mit verminderten Streckungswachstum, stark gezackte Blätter und schlechte Fähigkeit zur Bewurzelung. Pflanzen, die nach mehreren Monaten auf Bewurzelungsmedium ein schwaches Wurzelwachstum aufwiesen, wurden in die Phytokammer überführt. Hier blieb der Phänotyp der Pflanzen erhalten und das Wachstum war auch nach Monaten der Kultur nur mäßig. Keine der akklimatisierten Pflanzen konnte in der Phytokammer dauerhaft erfolgreich kultiviert werden. Daher konnte bei den Analysen der Linien nur auf *in vitro* Material zurückgegriffen werden.

### 3.2.3 Kaskadenvermehrung

Erste Analysen der TALEN Linien zeigten, dass eine Mutation der *RhMLO* Gene nicht vollständig in den Proben vorlag, sondern nur zum Teil auftrat. Unter der Annahme, dass die stabil übertragenen TALEN-Konstrukte in den Zellen weiterhin aktiv sind, solange eine Wildtyp-Bindestelle vorliegt, wurde der Versuch einer kaskadenartigen Vermehrung von *in vitro* Sprossen durchgeführt. Hierzu wurde ein Ausgangsspross in jeder Vermehrungsstufe in drei Sprosse geteilt (sofern möglich) und jeweils Material für die DNA-Isolation entnommen. Die aus der Vermehrung entstandenen Sprosse wurden wiederum in der nächsten Vermehrungsstufe in jeweils drei Sprosse geteilt, Material entnommen und so fort. Eine Übersicht über das Schema der Kaskaden-Vermehrung ist der folgenden Abbildung 37 zu entnehmen.



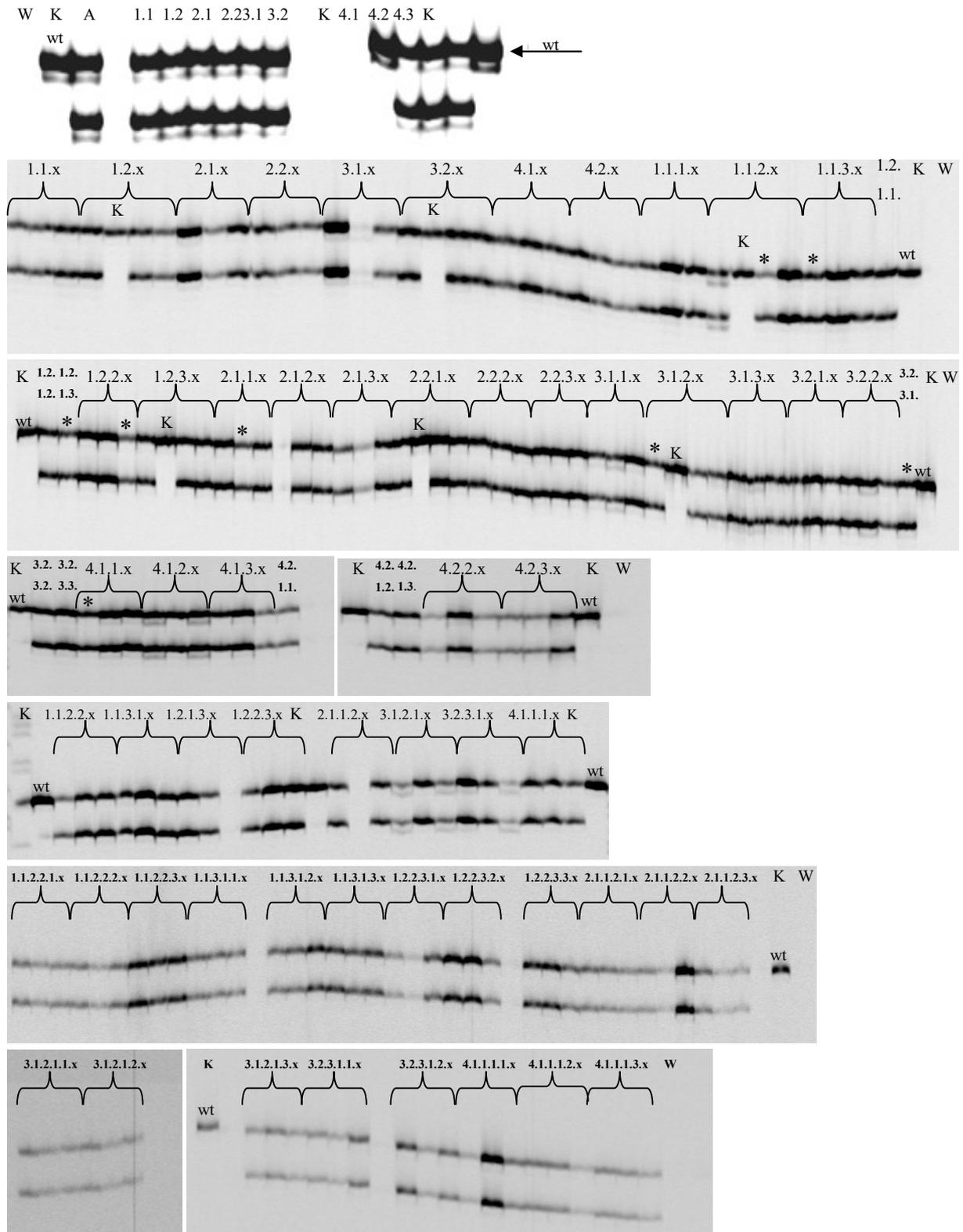
**Abbildung 37: Schematische Darstellung der Kaskaden-Vermehrung.**

Der Ausgangsspross (hier die Nr.1) wurde in der nächsten Vermehrungsstufe in drei Sprosse geteilt, welche die Bezeichnung 1.1, 1.2 und 1.3 erhielten (vergl. Abbildung 37). Vom Spross Nr.1 wurde bei dieser Vermehrung Material für die DNA-Isolation abgenommen. Der Ausgangsspross an sich ist nach dieser Vermehrungsstufe also nicht mehr existent, er liegt nur noch als DNA-Probe vor. Nach zwei Runden der vegetativen Vermehrung liegen nach diesem Schema neun Sprosse vor und nach drei Runden 27.

Von den erhaltenen TALEN Linien wurden die Linien T3/4A, T3/4C und T3/4D für die Kaskaden-Vermehrung herangezogen. Wie schon im vorangegangenen Kapitel beschrieben, wiesen die TALEN Linien eine phänotypische Veränderung auf, die sich auch auf die Vermehrungsrate der Sprosse ausgewirkt hat. Daher musste die sonst übliche Vermehrung in einem Vier-Wochen-Rhythmus an das langsamere Wachstum angepasst werden, so dass nur alle sechs bis acht Wochen eine Vermehrung stattfinden konnte. Auch kam es aufgrund der reduzierten Wüchsigkeit der Linien vereinzelt zu einem Absterben der vermehrten Sprosse, weshalb nicht jeder Arm der Kaskade bis zum Ende der Analysen untersucht werden konnte. Der Phänotyp der Pflanzen änderte sich auch über die mehrfache vegetative Vermehrung hinweg nicht. Weiterhin ist anzumerken, dass von jedem Spross nur eine Probe zur DNA-Isolation vorlag. Die DNA-Isolation aus geringen Mengen von *in vitro* Material ist allerdings kritisch und nicht immer erfolgreich. Daher kam es im Folgenden vereinzelt zum Ausfall von Proben.

### **3.2.3.1 Kaskade der Linie T3/4A**

Der Ausgangspross von T3/4A wurde in der ersten Vermehrungsstufe aufgrund des vorhandenen Materials in vier Sprosse geteilt, in der nächsten in zwei und in jeder nachfolgenden, vegetativen Vermehrungsrunde in drei Sprosse. Somit lagen nach vier Vermehrungsstufen 72 Sprosse vor. Um diese Zahl zu reduzieren, wurden acht Sprosse aufgrund der Ergebnisse der PAA-Gelelektrophorese (siehe unten) für eine weiterführende Kaskaden-Vermehrung ausgewählt. Die Kaskade von T3/4A wurde bis zur Stufe fünf (x.x.x.x.x) durchgeführt. Somit standen 188 DNA-Proben aus der Kaskaden-Vermehrung der Linie T3/4A für Analysen der TALEN-Bindestelle zur Verfügung. Diese wurden mittels PCR amplifiziert und die Produkte der Größe nach auf PAA-Gelen aufgetrennt. Das Ergebnis der Gelelektrophorese ist in der folgenden Abbildung aufgeführt.



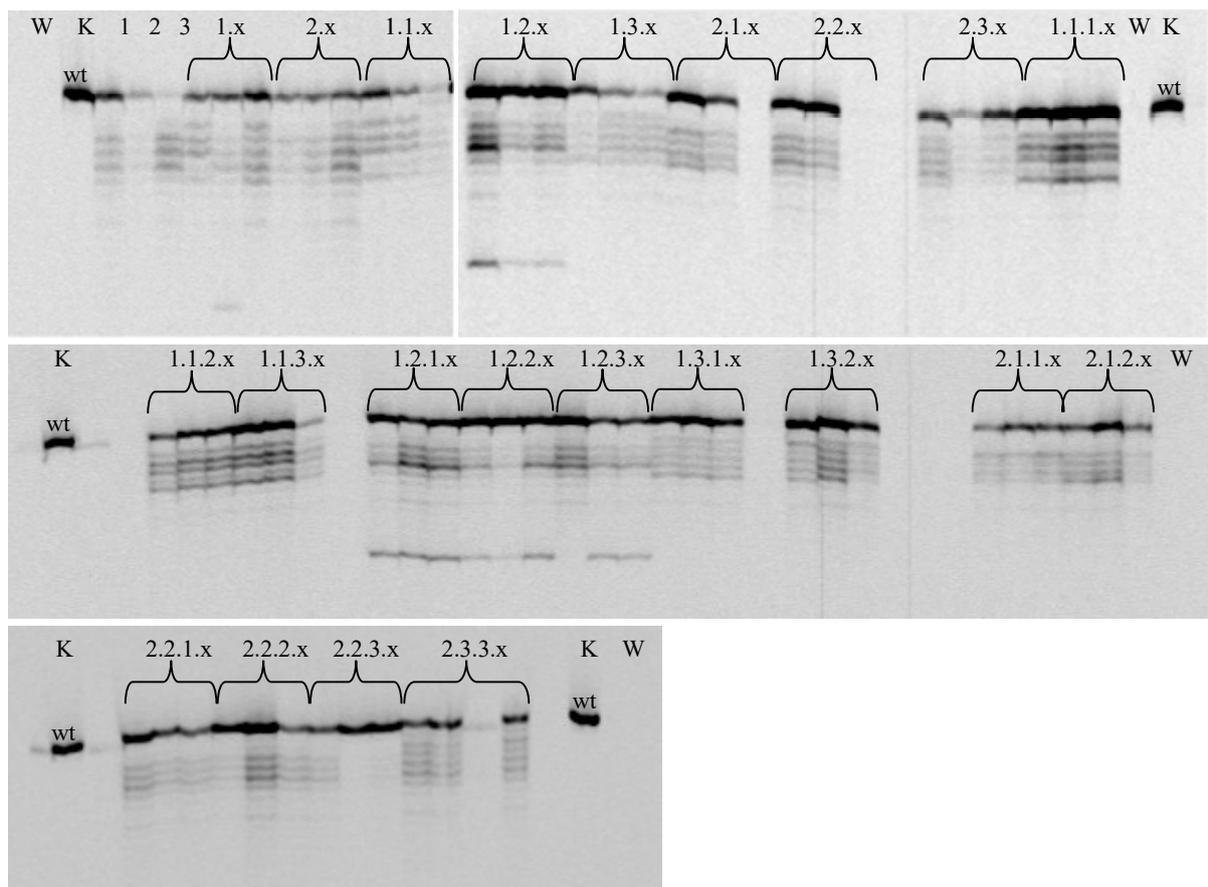
**Abbildung 38: PAA-Gelelektrophoreseder PCR zur Amplifikation der TALEN-Bindestellen der Kaskade von T3/4A.**

Die PCR-Fragmente der amplifizierten TALEN-Bindestelle wurden auf einem 8%igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Nummern über den Banden geben die jeweilige Bezeichnung der Probe in der Kaskade an, das x ist jeweils durch die Nummern 1, 2 und 3 (in ebendieser Reihenfolge) zu ersetzen, K: 'Pariser Charme' Kontrolle, W: Wasserkontrolle, wt: Wildtyp-Bande, \*: ausgewählte Proben aus dem dritten Vermehrungsschritt für die nächsten Vermehrungsrunden.

Aus Abbildung 38 wird deutlich, dass eine Veränderung des Bandenmusters, über die Stufen der vegetativen Vermehrung, nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Alle Proben wiesen eine 4 bp Deletion (Bande unterhalb der wt Bande) auf, ohne dass eine eindeutige Veränderung in den Bandenintensitäten zwischen der wt Bande und der mutierten Bande festgestellt werden konnte.

### 3.2.3.2 Kaskade der Linie T3/4C

Ausgang für die Kaskade der Linie T3/4C waren die drei ersten regenerierten Sprosse der Linie (Sprosse Nr. 1, 2 und 3). In Folge der Kultivierung starb jedoch der Spross Nr. 3 ab, so dass keine weiteren Proben von diesem Teil der Kaskade genommen werden konnte. Die Kaskade wurde bis zur Vermehrungsstufe drei (x.x.x.x.) mit jeweils drei neuen Sprossen pro Runde analysiert, so dass insgesamt 68 Proben für die Analyse mittels PAA-Gelelektrophorese zur Verfügung standen. In der Abbildung 39 sind die Ergebnisse der Amplifikation der TALEN-Bindestelle und der Größenauftrennung der Produkte auf PPA-Gelen dargestellt.



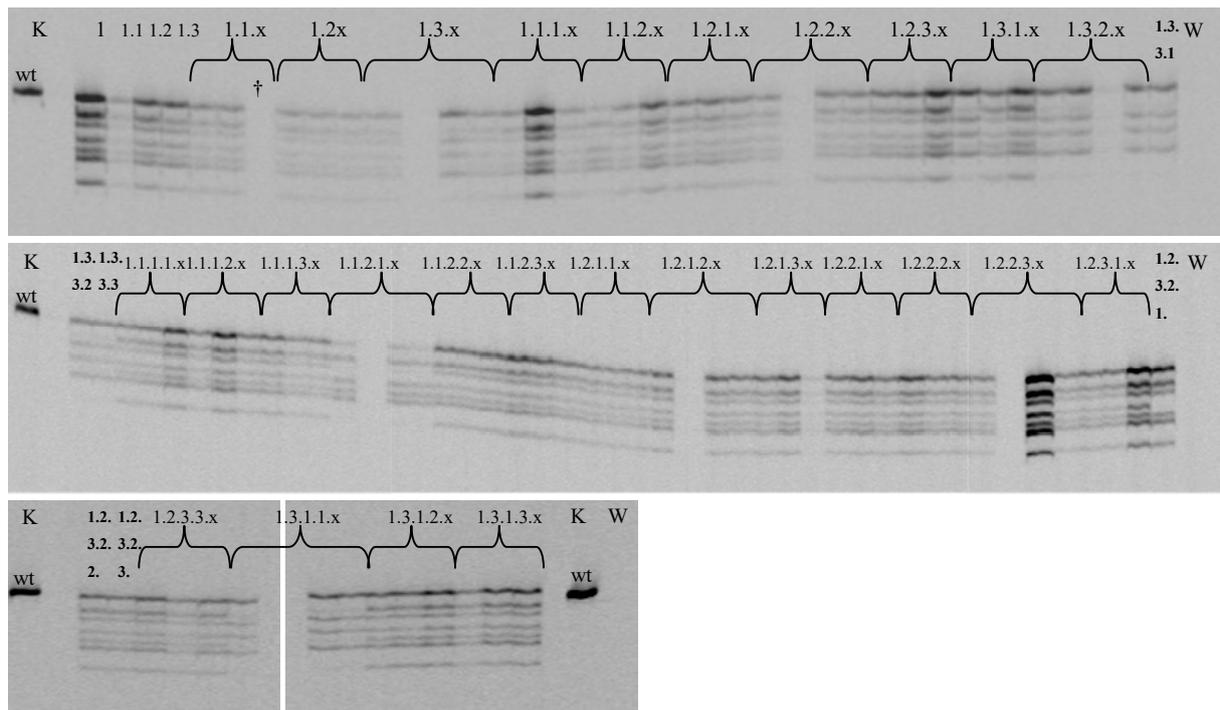
**Abbildung 39: PAA-Gelelektrophoresed der PCR zur Amplifikation der TALEN-Bindestellen der Kaskade von T3/4C.**

Die PCR-Fragmente der amplifizierten TALEN-Bindestelle wurden auf einem 8%igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Nummern über den Banden geben die jeweilige Bezeichnung der Probe in der Kaskade an, das x ist jeweils durch die Nummern 1, 2 und drei (in ebendieser Reihenfolge) zu ersetzen, K: 'Pariser Charme' Kontrolle, W: Wasserkontrolle, wt: Wildtyp-Bande.

Aus Abbildung 39 wird deutlich, dass die Linie T3/4C ein komplexeres Bandenmuster als T3/4A aufwies. Anhand der PAA-Gelelektrophorese konnten auch hier nur Deletionen in der Wildtyp-Sequenz detektiert werden, da alle zusätzlichen Banden kleiner als die wt Bande waren. Insgesamt konnten fünf bis sechs zusätzliche Banden zur wt Bande unterschieden werden. Auch hier konnte in allen Proben der Kaskaden-Vermehrung noch die typische wt Bande nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass der Spross mit der Nummer 3 eine wesentlich schwächere wt Bande aufwies. Dieser ist jedoch im Laufe der Kultur abgestorben. Weiterhin geht aus der Abbildung hervor, dass der Spross 1.2 und dessen nachfolgende Kaskaden 1.2.1 und 1.2.1.1 ff. ein leicht verändertes Bandenmuster durch das Aufkommen einer weiteren, kleineren Bande aufwies. Diese nimmt mit fortschreitender Kaskade an Intensität zu, wobei für die wt Bande keine veränderte Intensität auffällig war. Allgemein schwankten die Intensitäten der deletierten Banden durch die Proben hinweg und eine schwächer werdende wt Bande konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

### **3.2.3.3 Kaskade der Linie T3/4D**

Von der Linie T3/4D wurde der erste regenerierte Spross (Nr. 1) als Ausgang der Kaskade verwendet, welcher in allen Proliferationsrunden in drei neue Sprosse unterteilt wurde. Die Kaskade wurde bis zum Vermehrungsschritt vier (x.x.x.x) geführt, wobei zum Teil die letzten Arme der Kaskade (1.3.2.1.1. ff, 1.3.2.2.1.ff, 1.3.2.3.1.ff, 1.3.3.1.1.ff, 1.3.3.2.1.ff und 1.3.3.3.1.ff) aufgrund der schlechten Wüchsigkeit zum Ende der Analysen nicht mehr beprobt wurden. Insgesamt wurde von 91 Proben die amplifizierte Zielregion auf PAA-Gelen der Größe nach aufgetrennt (Abbildung 40).



**Abbildung 40: PAA-Gelelektrophoresed der PCR zur Amplifikation der TALEN-Bindestellen der Kaskade von T3/4D.**

Die PCR-Fragmente der amplifizierten TALEN-Bindestelle wurden auf einem 8%igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Nummern über den Banden geben die jeweilige Bezeichnung der Probe in der Kaskade an, das x ist jeweils durch die Nummern 1, 2 und drei (in ebendieser Reihenfolge) zu ersetzen, K: 'Pariser Charme' Kontrolle, W: Wasserkontrolle, wt: Wildtyp-Bande, †: abgestorbener Spross.

Die typische Wildtyp-Bande der TALEN-Bindestelle (wt) konnte auch bei dieser Kaskade in jeder Probe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 40). Zusätzlich wiesen die Proben noch sechs kleinere Banden auf, was auf Deletionen in der Bindestelle der T3/4D Linie hinweist. Auffällig ist, dass in einigen Proben die kleinste der deletierten Banden (Bande Nr. 6) nicht oder nur sehr schwach nachgewiesen werden konnte (vergl. z.B. Proben Nr. 1.3.2.1., 1.3.3.3. und 1.1.2.1.1.). Des Weiteren wiesen die Proben mit der Bezeichnung 1.1.2.1.1., 1.1.2.1.2. und 1.1.2.1.3. im Vergleich zu den übrigen Proben der Kaskade ein schwächere wt Bande auf. Diese Tendenz lies sich auch in, der diesen Proben vorangegangenen, Probe mit der Nr. 1.1.2.1 erkennen. Eine ähnliche Tendenz konnte bei den restlichen Proben der Kaskade nicht eindeutig nachgewiesen werden.

### 3.2.4 Amplikon-Sequenzierung der TALEN Linien

Um die gesetzten Mutationen der beschriebenen TALEN Linien genauer zu untersuchen und mögliche Punktmutationen aufzudecken, die mittels PAA-Gelelektrophorese nicht detektiert werden können, sowie auf off-target Mutationen zu prüfen, wurden Proben der im vorherigen Kapitel beschriebenen Kaskaden für eine Amplikon-Sequenzierung herangezogen. Es wurde jeweils eine Probe vom Anfang der Kaskade und eine Probe mit einem veränderten Muster

oder potentiell schwächeren Wildtyp-Bande vom Ende der Kaskade gewählt. Zusätzlich wurde als Kontrolle DNA einer 'Pariser Charme' Kontroll-Pflanze verwendet.

Von jeder Probe wurde mittels *proof-reading* PCR die TALEN-Bindestelle von *RhMLO3* und *RhMLO4* mittels einem, beide Gene simultan bindenden, Primerpaar amplifiziert. Um mögliche off-target Effekte des TALEN Konstrukts zu untersuchen, wurden auch die komplementären Zielregionen der nah-verwandten Gene *RhMLO1* und *RhMLO2* von jeder Probe amplifiziert. Die Proben wurden äquimolar gepoolt, wobei die Amplifikate der TALEN-Zielregion mit der doppelten Menge der potentiellen off-target Regionen eingesetzt wurden. Die Sequenzierung der DNA-Proben auf dem MiSeq wurden von der Firma Igc (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Der nachfolgenden Tabelle 46 sind die verwendeten Proben der Kaskaden und die Anzahl der erhaltenen Reads pro Probe und *RhMLO* Gen aufgeführt.

**Tabelle 46: Eingesetzte Proben der TALEN Linien für die Amplikon-Sequenzierung und erhaltene Anzahl der Reads pro Probe.**

Probe	Amplifiziertes <i>RhMLO</i>	Anzahl Reads
'Pariser Charme' Kontrolle	<i>RhMLO1</i>	14947
	<i>RhMLO2</i>	15187
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	30422
T3/4A 1.1.	<i>RhMLO1</i>	12670
	<i>RhMLO2</i>	11090
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	15289
T3/4A 1.1.2.2.1.1.	<i>RhMLO1</i>	22426
	<i>RhMLO2</i>	21037
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	26716
T3/4C 1.	<i>RhMLO1</i>	18451
	<i>RhMLO2</i>	13937
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	9966
T3/4C 1.2.1.2.	<i>RhMLO1</i>	18353
	<i>RhMLO2</i>	13685
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	12739
T3/4D 1.	<i>RhMLO1</i>	15103
	<i>RhMLO2</i>	9563
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	27383
T3/4D 1.1.2.1.3.	<i>RhMLO1</i>	15245
	<i>RhMLO2</i>	13346
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	23850

Aus Tabelle 46 geht hervor, dass nicht bei jedem Pool von *RhMLO3/RhMLO4* die doppelte Menge an Reads im Vergleich zu *RhMLO1* und *RhMLO2* erreicht wurde. Zum Teil war hier die Ausbeute sogar geringer als bei den Kontroll-Pools (vergleiche T3/4C 1.) und allgemein kann eine zwischen den Proben schwankende Ausbeute an Reads verzeichnet werden.

Um die gesetzten Mutationen in den TALEN Linien zu detektieren, wurden die einzelnen Pools auf Varianten im Vergleich zu Referenz-Sequenzen untersucht. Hierbei wurde die Grenze zur Detektion der Varianten auf 1,0 % festgelegt. Dieser Wert wurde anhand der Kontroll-Sequenzen (Probe der 'Pariser Charme' Wildtyp-Kontrolle) festgelegt und bezeichnet eine Schwelle unterhalb derer tatsächliche Varianten nicht mehr von Fehlern durch die Sequenzierung oder der vorangegangene PCR unterschieden werden können.

### 3.2.4.1 Auswertung der Amplikons der Proben von Linie T3/4A

Im Pool der RhMLO3/4 Sequenzen der Linie T3/4A 1.1 wurden insgesamt drei unterschiedliche Deletionen von jeweils vier Basenpaaren im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz detektiert. In Tabelle 47 ist eine Übersicht über die detektierten Deletionen samt Position in der Referenzsequenz und Basenpaar-Abfolge des deletierten Bereiches gegeben.

**Tabelle 47: Übersicht über die detektierten Mutationen der Probe T3/4A 1.1**

Position	Typ	Länge [bp]	Referenz	Frequenz [%]
81 - 84	Deletion	4	ACAA	2,12
82 - 85	Deletion	4	CAAG	36,46
83 - 86	Deletion	4	AAGA	13,1

Aus Tabelle 47 ist zusätzlich zur Lage und der Sequenz auch die Frequenz der Deletionen zu entnehmen. Die Frequenz bezeichnet die Häufigkeit des Vorkommens dieser Deletion in den Reads des untersuchten Pools. Auffällig ist, dass die Deletion an Position 82 mit der Referenzsequenz CAAG mit einer Frequenz von 36,46 % um ein vielfaches häufiger vorkommt, als die übrigen beiden Deletionen. Insgesamt weisen 51,68 % der Reads dieses Pools eine Mutation in Form einer 4bp Deletion auf.

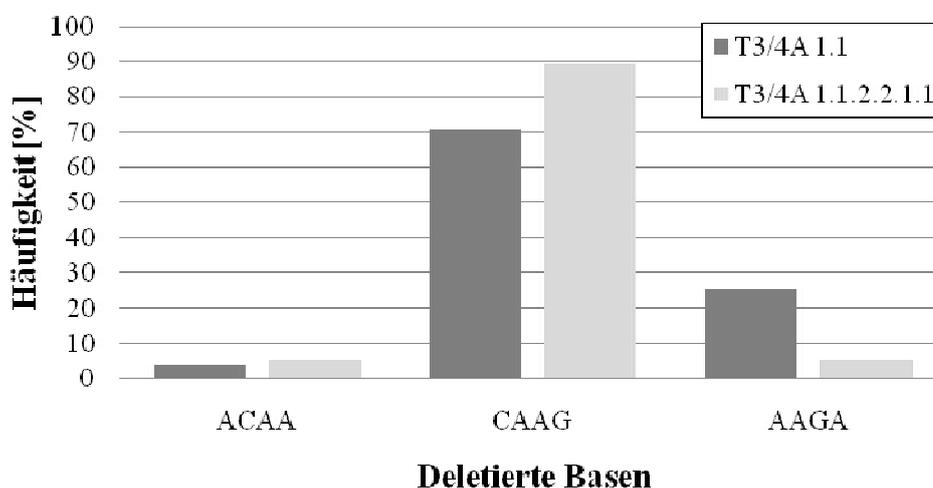
Für den Pool der Probe T3/4A 1.1.2.2.1.1, also der Probe zum Ende der Kaskade der Linie T3/4A, wurden die gleichen Deletionen an denselben Positionen wie bei der Probe T3/4A 1.1 detektiert (vergleiche Tabelle 47). Eine Übersicht über die Mutationen und deren Frequenzen ist in der nachfolgenden Tabelle gegeben.

**Tabelle 48: Übersicht über die detektierten Mutationen der Probe T3/4A 1.1.2.2.1.1**

Position	Typ	Länge [bp]	Referenz	Frequenz [%]
81 - 84	Deletion	4	ACAA	2,53
82 - 85	Deletion	4	CAAG	41,23
83 - 86	Deletion	4	AAGA	2,4

Aus Tabelle 48 geht hervor, dass sich das Muster der detektierten Mutationen über die Kaskade hinweg nicht verändert hat, wohl aber die die Häufigkeit, mit denen sie im Pool der Reads vorkommen. So konnte bei der Deletion an Position 81 (ACAA) zwar nur eine marginale Veränderung in der Frequenz von unter 1 % festgestellt werden, die Deletion an Position 83 (AAGA) hingegen wurde bei T3/4A 1.1 mit einer Frequenz von 13,1 % detektiert, bei T3/4A 1.1.2.2.1.1 jedoch nur noch mit einer Frequenz von 2,4 %. Dies entspricht einer Reduktion des Vorkommens dieser Mutation um mehr als das 5-fache. Im Gegensatz dazu konnte in der Probe zu Beginn der Kaskade die Deletion an Position 82 (CAAG) mit einer Frequenz von 36,46 % detektiert werden und zum Ende (Probe T3/4A 1.1.2.2.1.1) mit einer Frequenz von 41,23 %, also insgesamt mit knapp 5 % mehr (vergleiche Tabelle 47 und Tabelle 48). Insgesamt wiesen 46,16% der Reads der Probe von T3/4A 1.1.2.2.1.1 eine 4 bp Deletion auf. Das sind 5,25 % weniger als bei der Probe T3/4A 1.1. Somit wies die Probe zu Beginn der Kaskade eine, wenn auch nur im geringen Ausmaß, höhere Mutationsrate auf, als die Probe zum Ende der Kaskade.

Betrachtet man die Anteile der drei vorkommenden Deletionen in Bezug auf die Gesamtzahl der mutierten Reads, ergibt sich für beide Proben von T3/4A eine in der folgenden Abbildung dargestellte Verteilung der Mutationen.



**Abbildung 41: Grafische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der detektierten Mutationen von T3/4A.** Die Häufigkeitsberechnung der Mutationen basiert auf der Gesamtzahl der mutierten Reads im Pool und den detektierten Reads der jeweiligen deletierten Basen von T3/4A 1.1 und T3/4A 1.1.2.2.1.1.

Aus Abbildung 41 wird deutlich, dass es bei den Deletionen CAAG und AAGA über die Kaskade hinweg zu einer Verschiebung in der Verteilung gekommen ist. Die Deletion der Basen CAAG nimmt prozentual zu, wo hingegen die der Basen AAGA deutlich abnimmt. Die ACAA-Deletion hingegen verändert sich in ihrem Anteil kaum. Bei gleicher Verteilung der

Allelsequenzen von *RhMLO3* und *RhMLO4* im untersuchten Pool, müsste jedes Allel mit 12,5 % der Reads vertreten sein. Somit wird deutlich, dass die Deletion CAAG an Position 82 nicht nur in einem Allel vorkommen kann, sondern in mindestens drei bis vier Allelen vorliegen muss. Alle drei Deletionen führen zu einer Veränderung im Leseraster des Gens und somit zu einem Knock-out.

### 3.2.4.2 Auswertung der Amplikons der Proben von Linie T3/4C

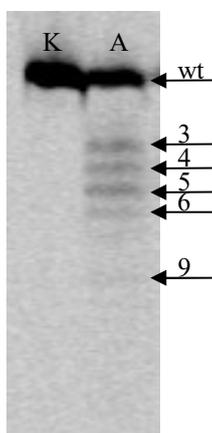
Die Detektion an Varianten im Pool der Probe T3/4C 1. im Bereich der TALEN-Bindestelle von *RhMLO3* und *RhMLO4* ergab mit insgesamt 12 unterschiedlichen Deletionen mit einer Frequenz von über 1 % ein deutlich diverseres Muster als bei den beiden Proben von T3/4A. Hiervon wiesen mehrere die gleichen Längen auf, so dass insgesamt acht Deletionen der gleichen Länge festgestellt werden konnten. Hierunter konnten auch die drei 4 bp Deletionen aus Linien T3/4A nachgewiesen werden. Die Mutationen gleicher Länge sind in der nachfolgenden Tabelle 49 zusammengefasst sowie ihre Frequenzen im Pool angegeben. Die ausführliche Auflistung aller 12 Deletionen kann dem Anhang A.8 entnommen werden

**Tabelle 49: Frequenzen der Deletionen gleicher Länge der Probe T3/4C 1.**

Typ	Länge	Frequenz insgesamt
Deletion	3 bp	11,9 %
Deletion	5 bp	10,7 %
Deletion	4 bp	8,74 %
Deletion	6 bp	4,0 %
Deletion	9 bp	1,85 %
Deletion	7 bp	1,71 %
Deletion	2 bp	1,66 %
Deletion	11 bp	1,07 %

Die Deletionen der Probe variieren von 3 bis 11 bp, wobei die Deletionen von 3, 4 und 5 Basenpaaren am häufigsten vorkommen (Tabelle 49). Die 3 bp Deletionen treten in dieser Probe mit zusammengerechnet 11,9 % am häufigsten auf, gefolgt von der 5 bp Deletion (Position 81, ACAAG), welche als einzelne Deletion am häufigsten vorlag. Zu erwähnen ist hierbei, dass die 3 bp Deletionen sowie die 9 bp Deletion nicht zu einer Veränderung des Leserasters der Sequenz führen, sondern nur zum Verlust einer, beziehungsweise dreier, Aminosäuren. Ein im Verhältnis großer Anteil der detektierten Mutationen (13,75 %) führt daher nicht zu einem Knock-out des Gens. Insgesamt konnte in 41,6 % der Reads eine Mutation in Form von Deletionen detektiert werden.

Vergleicht man die detektierten Deletionen mit dem Muster der Probe aus der PAA-Gelelektrophorese (Abbildung 42), so fällt auf, dass nur die 3 bp, 4 bp, 5 bp und 6 bp Deletion eindeutig im Bandenmuster nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 42). Aus Tabelle 49 wird deutlich, dass diese Deletionen mit Frequenzen von 4 % und höher vorkamen. Bei genauerer Betrachtung des Gel-Bildes kann noch die 9 bp Deletionen erahnt werden, diese kommt mit einer Frequenz von 1,85 % vor. Zusammenfassend lässt sich hieraus schlussfolgern, dass nur die Deletionen, welche mit über 4 % im untersuchten Pool vertreten waren, im PAA-Gel eindeutig detektiert werden konnten. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Zyklen für die PCR zur Amplifikation der TALEN-Binderegion mit 22 Zyklen niedrig gewählt worden waren, um Unterschiede in der Prävalenz von Banden festzustellen.



**Abbildung 42: Bandenmuster der PAA-Gelelektrophorese der Probe T3/4C 1.**

Ausschnitt aus der PAA-Gelelektrophorese der Proben von T3/4C. K = 'Pariser Charme' Kontrolle; A = Probe T3/4C 1; wt = Wildtyp-Bande; 3, 4, 5, 6, 9 = Anzahl der deletierten Basen in der wt-Sequenz.

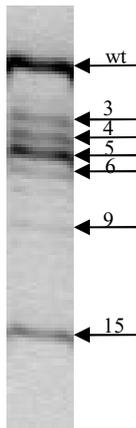
Die Probe T3/4C 1.2.1.2 wurde zum Ende der Kaskade für die Amplikon-Sequenzierung ausgewählt, da sie ein verändertes Bandenmuster zur Ausgangsprobe T3/4C 1 aufwies (vergleiche Abbildung 39). Insgesamt konnten im Pool der Reads für *RhMLO3* und *RhMLO4* 12 unterschiedliche Mutationen mit einer Frequenz von über 1 % detektiert werden. Diese wiesen Deletionen von 2 bp bis 10 bp auf. Fasst man die Deletionen gleicher Länge zusammen, so ergeben sich insgesamt acht Deletionen unterschiedlicher Länge von 2 bis 10 deletierten Basen. In Tabelle 50 sind die Deletionen gleicher Länge zusammengefasst mit ihrer Frequenz im Pool angegeben. Die Auflistung aller 12 Deletionen kann dem Anhang A.8 entnommen werden.

**Tabelle 50: Frequenzen der Deletionen gleicher Länge der Probe T3/4C 1.2.1.2.**

Typ	Länge	Frequenz
Deletion	5 bp	17,54 %
Deletion	3 bp	11,67 %
Deletion	4 bp	11,38 %
Deletion	6 bp	4,16 %
Deletion	9 bp	2,58 %
Deletion	7 bp	2,59 %
Deletion	2 bp	1,28 %
Deletion	10 bp	1,24 %

Auch in dieser Probe lag die 5 bp Deletion als Einzelmutation am häufigsten vor, gefolgt von 3 bp Deletionen (zusammengefasst 11,64 %) und 4 bp Deletionen (11,38 %). Dies entspricht nicht ganz dem Muster der Probe T3/4C 1, da in dieser die 3 bp Deletionen mit 11,9 % am häufigsten auftraten (vergl. Tabelle 49). Beim Abgleich der detektierten Deletionen und der jeweiligen Frequenzen der Proben T3/4C 1 und T3/4C 1.2.1.2 fällt auf, dass zum Teil andere Deletionen detektiert wurden. So wurde die 11 bp Deletion zum Ende der Kaskade nicht mehr detektiert, dafür aber eine Deletion von 10 bp, welche wiederum zum Anfang der Kaskade nicht detektiert wurde. Beide Deletionen wurden jedoch bei einem geringeren Schwellenwert von 0,5 % für die Detektion der Varianten in beiden Proben nachgewiesen (Daten nicht aufgeführt), also unterhalb der 1 % Hürde. Des Weiteren weisen die Frequenzen Veränderungen sowohl nach oben als auch nach unten auf. Insgesamt wurden in 52,44 % der Reads dieses Pools Mutationen in Form von Deletionen detektiert, von denen 34,03 % zu einer Änderung des Leserasters und somit zum Knock-out des jeweiligen Gens führten.

Beim Vergleich der Muster an Deletionen aus Tabelle 50 mit denen der Banden der Probe T3/4C 1.2.1.2 aus der PAA-Gelelektrophorese (siehe Abbildung 43), ist auffällig, dass die 5 bp Deletionen, welche mit 17,54 % am häufigsten vorlag, auch die stärkste Bande im Gel aufwies. Neben dieser deutlichen Bande, konnten noch die der 3 bp, 4 bp und 6 bp Deletion klar nachgewiesen werden, welche mit 11,67 %, 11,38 % und 4,16 % in den Reads detektiert wurden. Auch hier scheint eine Grenze von 4 % für eine deutliche Detektion der Banden im Gel vorzuliegen.

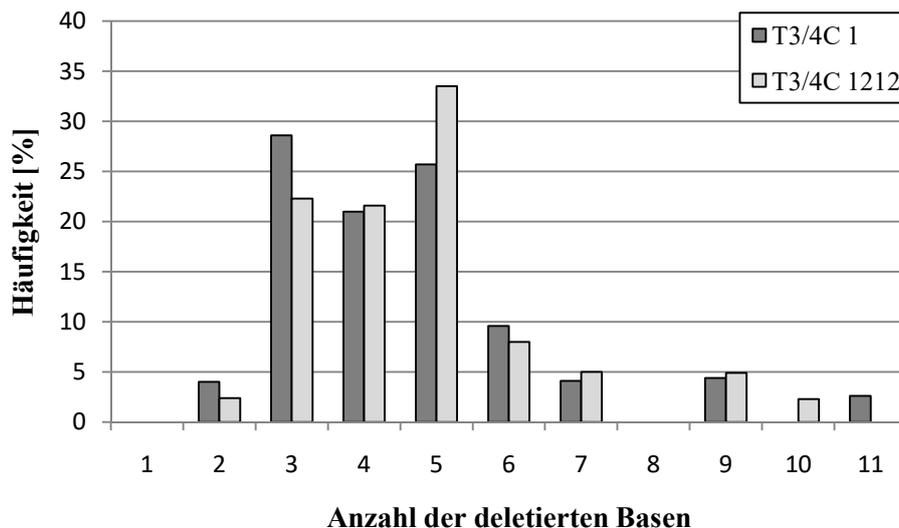


**Abbildung 43: Bandenmuster der PAA-Gelelektrophorese der Probe T3/4C 1.2.1.2.**

Ausschnitt der PAA-Gelelektrophorese mit der Probe T3/4C 1.2.1.2. wt = Wildtyp-Bande; 3, 4, 5, 6, 9, 15 = Anzahl der deletierten Basen in der wt-Sequenz.

Bei der Betrachtung von Abbildung 43 fällt auf, dass eine zusätzliche Bande mit einer 15 bp Deletion im PAA-Gel detektiert wurde, die jedoch nicht bei der Detektion der Varianten der Amplikon-Sequenzierung erfasst worden ist. Durch das Herabsetzen des Schwellenwertes zur Detektion der Varianten von 1,0 % auf 0,5 %, konnte diese 15 bp Deletion jedoch mit einer Frequenz von 0,66 % in den Reads detektiert werden. Im PAA-Gel scheint die Bande jedoch in einer Stärke, die der der 3 bp und 4 bp Deletion gleichkommt. Diese beiden Mutationen weisen in den Reads der Amplikon-Sequenzierung jedoch Frequenzen von 11,67 % und 11,38 % auf.

Beim Vergleich der detektierten Deletionen der Probe T3/4C 1 zu Beginn und Probe T3/4C 1.2.1.2 zum Ende der Kaskade fällt eine gewisse Dynamik auf, die in der folgenden Abbildung 44 veranschaulicht wird. Hierfür wurde der Anteil der detektierten Mutationen gleicher Länge in Bezug zu allen mutierten Reads des jeweiligen Pools gesetzt, um den Anteil der jeweiligen Mutation an den Mutationen im Gesamten zu betrachten.



**Abbildung 44: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Deletionen der Proben T3/4C 1 und T3/4C 1.2.1.2.**

Aufgetragen sind die Häufigkeiten der Deletionen gleicher Länge der Proben T3/4C 1 und T3/4C 1.2.1.2 im Bezug zur Gesamtzahl der mutierten Reads der jeweiligen Probe.

Abbildung 44 macht deutlich, dass die größten Unterschiede in den detektierten Varianten bei den 3 bp und 5 bp Deletionen vorkommen. Hier liegt eine Verschiebung von Anfang der Kaskade zum Ende der Kaskade hin zu den 5 bp Deletionen vor. Die übrigen Mutationen weisen zwischen den beiden Proben nur marginale Unterschiede in der Frequenz auf. Wie bereits erwähnt, konnte die 10 bp Deletion nur in der Probe T3/4C 1 und die 11 bp Deletionen nur in der Probe T3/4C 1.2.1.2 oberhalb des 1,0 % Schwellenwertes detektiert werden. Insgesamt wurde bei der Probe T3/4C 1 bei 41,6 % der Reads eine Mutation in Form von Deletionen detektiert, bei der Probe T3/4C 1.2.1.2 waren es 52,4 %. Dies entspricht einem Anstieg der Mutationsfrequenz um 10,8 % vom Anfang bis zum Ende der Kaskade.

### 3.2.4.3 Auswertung der Amplikons der Proben von Linie T3/4D

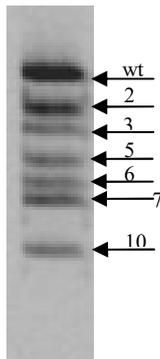
Anhand der Ergebnisse der PAA-Gelelektrophore der Kaskade von T3/4D wurden die Proben Nr.1. und Nr. 1.1.2.1.3 für die Amplikon-Sequenzierung ausgewählt (vergleiche hierzu Abbildung 40). Bei der Detektion der Varianten in den Reads der Probe T3/4D 1 konnten wie in den Proben von T3/4A und T3/4C ausschließlich Deletionen detektiert werden. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Deletionen die mit einer Frequenz von über 1,0 % in den Reads detektiert wurden, ist der nachfolgenden Tabelle 51 zu entnehmen.

**Tabelle 51: Übersicht über die detektierten Mutationen der Probe T3/4D 1.**

Position	Typ	Länge [bp]	Referenz	Frequenz
77-86	Deletion	10	TTCTACAAGA	1,22
79-85	Deletion	7	CTACAAG	26,22
81-85	Deletion	5	ACAAG	18,94
81-86	Deletion	6	ACAAGA	11,52
83-85	Deletion	3	AAG	2,12
84-85	Deletion	2	AG	1,98

Mit insgesamt sechs unterschiedlichen Deletionen wies die Probe T3/4D 1 ein diverseres Muster als T3/4A (drei Deletionen) auf, jedoch ein einfacheres als T3/4C (12 unterschiedliche Deletionen). Die Mutationen variierten von 2 deletierten Basen bis hinzu 10 deletierten Basen (Tabelle 51). Auffällig ist, dass in dieser Probe Mutationen mit Frequenzen vorkamen, die deutlich über denen der bisher beschriebenen Proben lagen. So traten die 7 bp Deletion an Position 79 mit 26,22 % auf und die 5 bp Deletion an Position 81 mit 18,94 %. Insgesamt wurde bei 62,0 % der Reads dieses Pools eine Mutation in Form einer Deletion detektiert. Zu einem Frameshift, und somit zu einem Knock-out des Gens, führten 48,36 % der Deletionen. Insgesamt entfielen 13,64 % auf 3 bp und 6 bp Deletionen, welche lediglich zu dem Verlust von einer, beziehungsweise zweier, Aminosäuren führten.

Beim Vergleich der detektierten Deletionen und deren Frequenzen mit dem Bild der PAA-Gelelektrophorese der Probe T3/4D 1 (Abbildung 45), ist auffällig, dass im Bild die 2 bp Deletion neben der Wildtyp-Bande mit am stärksten zu sein scheint. Diese kommt in den Reads der Probe allerdings nur mit einer Frequenz von 1,98 % vor (vergleiche Abbildung 45 und Tabelle 51). Die 7 bp Deletion weist die zweitstärkste Intensität der Banden auf. Diese Mutation kommt in den Reads prozentual am häufigsten vor. Das Verhältnis von der Intensität der Bande zu den Frequenzen der komplementären Deletion in den Reads scheint nicht ganz identisch zu sein, indes können alle detektierten Deletionen der Amplikon-Sequenzierung im Bandenmuster der Probe T3/4D 1 nachgewiesen werden.



**Abbildung 45: Bandenmuster der PAA-Gelelektrophorese der Probe T3/4D 1.**

Ausschnitt der PAA-Gelelektrophorese der Kaskade der Linie T3/4D mit der Probe Nr. 1, wt = Wildtyp-Bande; 2, 3, 5, 6, 7, 10 = Anzahl der deletierten Basen in der wt-Sequenz.

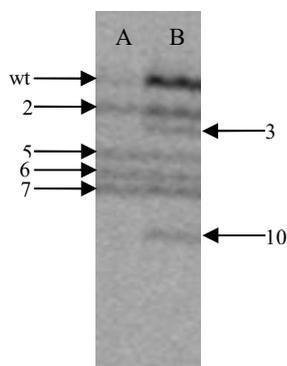
Die Probe 1.1.2.1.3 der Linie T3/4D zeichnete sich auf den PAA-Gelen der Linie durch eine besonders schwache Wildtyp-Bande aus (vergleiche Abbildung 40). Die Detektion der Varianten oberhalb des Schwellenwertes von 1,0 % ergab, dass insgesamt 89,4 % der Reads der Probe eine Deletion in der TALEN-Bindestelle aufwiesen. Insertionen oder SNPs konnten auch in dieser Probe nicht detektiert werden. In Tabelle 52 sind die detektierten Deletionen, die jeweilige Position in der Referenz-Sequenz und die Frequenz der Mutation im Pool angegeben.

**Tabelle 52: Übersicht über die detektierten Mutationen der Probe T3/4D 1.1.2.1.3.**

Position	Typ	Länge [bp]	Referenz	Frequenz
79-85	Deletion	7	CTACAAG	38,12
81-85	Deletion	5	ACAAG	30,10
81-86	Deletion	6	ACAAGA	18,64
84-85	Deletion	2	AG	2,51

In dieser Probe von T3/4D konnten nur noch vier unterschiedliche Deletionen oberhalb des Schwellenwertes von 1,0 % detektiert werden. In der Probe T3/4D 1 zu Beginn der Kaskade waren es hingegen noch sechs. Die 10 bp Deletion als auch die 3 bp Deletion aus Probe Nr. 1 kamen nur mit Frequenzen von 1,22 % und 2,12 % vor (vergl. Tabelle 51) und konnten hier nicht mehr oberhalb der 1,0 % Hürde detektiert werden. Zu Beginn der Kaskade stellte die 7 bp Deletion an Position 79 die am stärksten vertretende Mutation dar (26,22 %, Tabelle 51), dies war auch in dieser Probe der Fall, allerdings mit einer Frequenz von 38,12 %. Auch die 5 bp Deletion und die 6 bp Deletion wiesen mit 30,10 % und 18,64 % hohe Frequenzen innerhalb der Reads auf. Bis auf die 6 bp Deletion führten alle detektierten Mutationen dieser Probe zu einer Änderung des Leserasters und somit zu einem Knock-out des entsprechenden Gens.

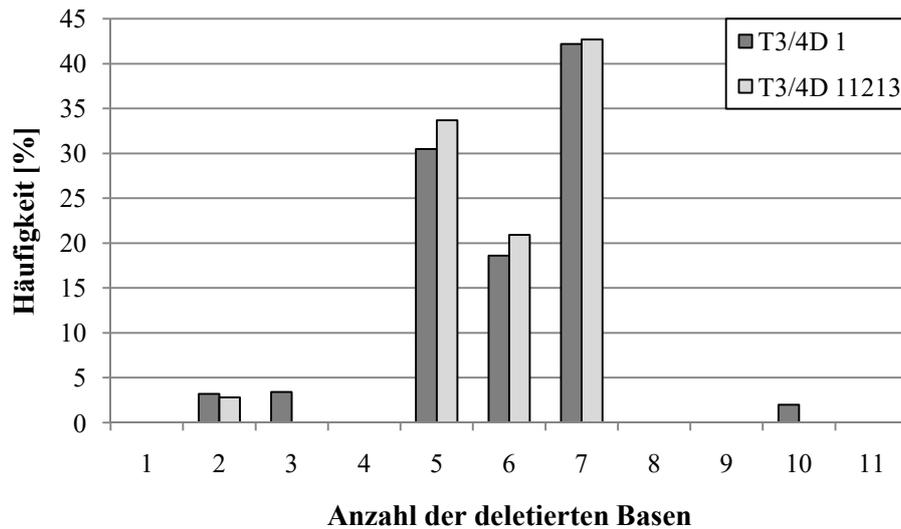
Vergleicht man die detektierten Mutationen mit dem Bandenmuster der Probe T3/4D 1.1.2.1.3 aus der PAA-Gelelektrophorese, fällt auf, dass die Bande der Wildtyp-Sequenz, welche in den Reads der Amplikon-Sequenzierung mit knapp 10 % vertreten war, deutlich schwächer im Gel-Bild zu erkennen ist (siehe Abbildung 46, A). Alle vier in der Amplikon-Sequenzierung detektierten Deletionen konnten im Gel-Bild eindeutig identifiziert werden. Eine Zuordnung der Frequenzen anhand der Intensität der Banden war hingegen nicht möglich. In Abbildung 46 ist zusätzlich zur Probe T3/4D 1.1.2.1.3 (A) noch die Probe T3/4D 1.1.2.2.1 (B) abgebildet. Diese Probe verdeutlicht die im Vergleich schwach ausgeprägte wt Bande in der untersuchten Probe. Des Weiteren waren in der B Probe auch die 3 bp und die 10 bp Deletion, welche auch in der Probe T3/4D 1 detektiert wurden, noch vorhanden.



**Abbildung 46: Bandenmuster der PAA-Gelelektrophorese der Probe T3/4D 1.1.2.1.3.**

Ausschnitt der PAA-Gelelektrophorese der Kaskade der Linie T3/4D mit der Probe 1.1.2.1.3 (A) und der Probe 1.1.2.2.1 (B), wt = Wildtyp-Bande; 2, 3, 5, 6, 7, 10 = Anzahl der deletierten Basen in der wt-Sequenz.

Über die Kaskade hinweg kam es zum Verlust von Deletionen von der Probe T3/4D 1 zur Probe T3/4D 1.1.2.1.3 und die Mutationsrate ist von 62,0 % auf 89,4 % gestiegen. Die nachfolgenden Abbildung 47 gibt eine Übersicht über die Dynamik der detektierten Mutationen.



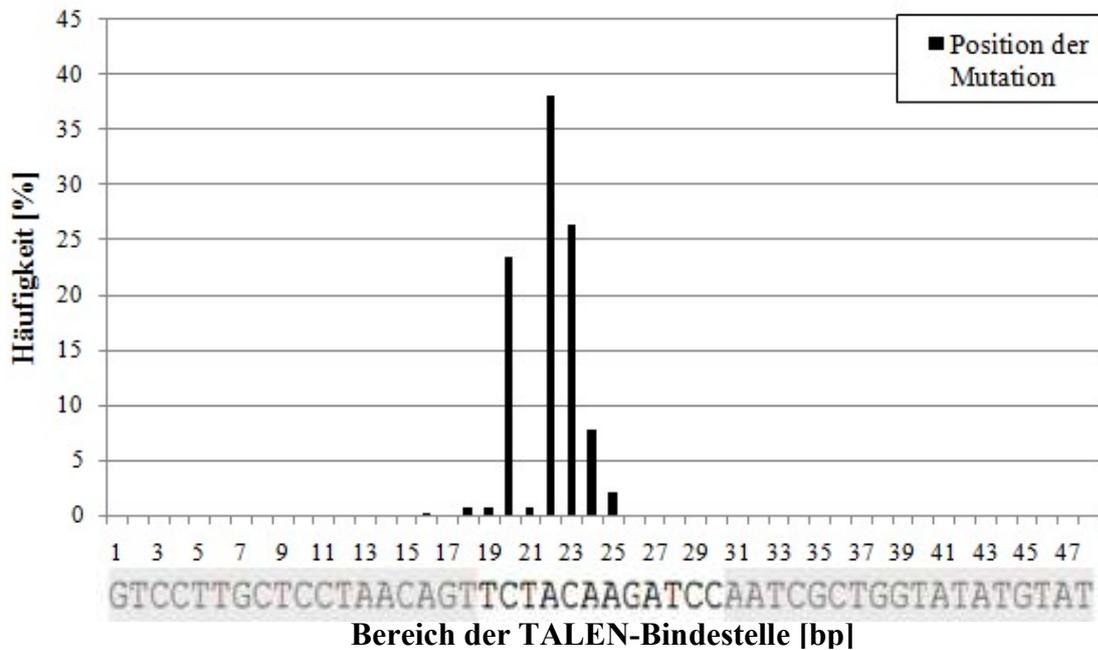
**Abbildung 47: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Deletionen der Proben T3/4D 1 und T3/4D 1.1.2.1.3.**

Aufgetragen sind die Häufigkeiten der Mutationen im Bezug zur Gesamtzahl der mutierten Reads der jeweiligen Probe.

Aus Abbildung 47 geht hervor, dass sich zwar die Gesamtmutationsrate über die Kaskade hinweg um 27,4 % erhöht hat, der Anteil der beobachteten Deletionen im Bezug zur Gesamtzahl der mutierten Reads im Vergleich beider Proben sich aber nur marginal verändert hat. Das Verhältnis zwischen den drei Hauptmutationen (der 5 bp, 6 bp und 7 bp Deletion) ist in beiden Proben nahezu identisch. Auch der Anteil der nur im geringen Maße vertretenen 2 bp Deletion blieb nahezu unverändert. Somit stellt der Verlust der 3 bp und 10 bp Deletion von der Probe 1 hinzu der Probe 1.1.2.1.3 zusammen mit der starken Reduktion der Wildtyp-Sequenz den größten Unterschied zwischen den beiden Proben dar.

#### 3.2.4.4 Position der gesetzten Mutation aller analysierten TALEN Proben

Die Position in der Referenzsequenz, an der die Mutationen durch das stabil übertragende TALEN Konstrukt TMlo3/4-2 gesetzt wurden, variierte innerhalb und auch zwischen den oben beschriebenen Proben der drei Linien. Um eine Übersicht über die Präferenz der Positionen zu erlangen, wurden über alle Proben hinweg die Reads, deren Mutation an der selben Position in der Sequenz auftrat, zusammengefasst und der Anteil dieser an der Gesamtzahl aller mutierten Reads der sequenzierten Proben erfasst. Die daraus resultierenden Frequenzen sind in der folgenden Abbildung 48 abgebildet.



**Abbildung 48: Positionen der gesetzten Mutationen der TALEN Linien.**

Aufgetragen ist der prozentuale Anteil aller Reads mit der Mutation an derselben Position in der Referenzsequenz im Bezug zur Gesamtzahl aller Reads der sequenzierten Proben, welche eine Mutation aufwiesen. Grau hinterlegte Sequenz markiert den Bereich der TALEN Erkennungssequenz.

Aus Abbildung 48 wird deutlich, dass die meisten Mutationen an Position 22 der TALEN-Bindestelle auftraten, gefolgt von Position 23. Diese beiden Positionen sind in 64,6 % der Reads die Startposition für die detektierten Deletionen. Mit 23,4 % ist die Position 20 die am dritthäufigsten vorkommende Position für Mutationen in allen sequenzierten Pools der TALEN Proben (Abbildung 48). Allgemein fällt auf, dass die Startpositionen für die gesetzten Deletionen sich eher zum linken Arm der TALEN-Erkennungsstelle orientieren und sich hauptsächlich innerhalb der Spacer-Region zwischen den beiden TALEN-Erkennungsstellen befinden. Ausschließlich in der 5'-Erkennungsstelle konnten Deletionen detektiert werden, die in die TALEN-Bindestelle hineinragten und somit die Erkennungssequenz veränderten. Diese Positionen waren mit insgesamt 0,85 % nur selten in den Reads vertreten.

In der nachfolgenden Abbildung sind die detektierten Deletionsvarianten oberhalb des 1,0 % Schwellenwertes der drei analysierten TALEN Linien im Vergleich zur Referenzsequenz (wt) aufgeführt.

A	*	20	*	40	
T3/4A-1	:	GTCCTTGCTCCTAACAGT	TCT----	GATCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 44
T3/4A-2	:	GTCCTTGCTCCTAACAGT	TCTA----	ATCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 44
T3/4A-3	:	GTCCTTGCTCCTAACAGT	TCTAC----	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 44
wt	:	GTCCTTGCTCCTAACAGT	TCTACAAGAT	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 48

B	*	20	*	40	
T3/4C-1	:	GTCCTTGCTCCTAAC	-----	ATCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 37
T3/4C-2	:	GTCCTTGCTCCTAACAG	-----	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 38
T3/4C-3	:	GTCCTTGCTCCTAACAGT	-----	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 39
T3/4C-4	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTC	-----	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 41
T3/4C-5	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTC	---AGAT	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 45
T3/4C-6	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTC	----GAT	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 44
T3/4C-7	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTC	-----	ATCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 43
T3/4C-8	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTC	-----	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 42
T3/4C-9	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTC	TA----	ATCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 44
T3/4C-10	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTC	TA-----	CCAATCGCTGGTATATGTAT	: 42
T3/4C-11	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTC	TAC---	ATCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 45
T3/4C-12	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTC	TAC----	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 44
T3/4C-13	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTC	TACA--	ATCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 46
wt	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTC	TACAAGAT	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 48

C	*	20	*	40	
T3/4D-1	:	GTCCTTGCTCCTAACAG	-----	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 38
T3/4D-2	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTT	-----	ATCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 41
T3/4D-3	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTCT	-----	ATCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 43
T3/4D-4	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTCT	-----	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 42
T3/4D-5	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTCT	TAC---	ATCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 45
T3/4D-6	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTCT	TACA--	ATCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 46
wt	:	GTCCTTGCTCCTAACAGTTCT	TACAAGAT	TCCAATCGCTGGTATATGTAT	: 48

**Abbildung 49: Deletionsvarianten der TALEN Linien im Vergleich zur Referenzsequenz.**

Mittels Amplikon-Sequenzierung detektierte Deletionsvarianten der TALEN Linien A) T3/4A, B) T3/4C und C) T3/4D. Aufgeführt sind jeweils alle detektierten Varianten oberhalb des 1 % Schwellenwertes der beiden analysierten Proben einer Linie, sortiert nach der Lage der Deletion innerhalb der Sequenz und nummeriert von 1 bis maximal 13. Die grau hinterlegten Bereiche markieren die Lage der TALEN-Bindestellen, wt: Wildtyp-Sequenz als Referenz.

Aus Abbildung 49 wird deutlich, dass die Lage der deletierten Bereiche über alle drei Linien gleichmäßig im Spacer-Bereich zwischen den beiden TALEN-Bindestellen verteilt vorlag. Auffällig ist, dass längere Deletionen wie bei T3/4C-1 bis -3 und T3/4D-1 nur in die der 5'-Bindestelle hineinreichten. Daraus wird eine Verschiebung hin zum 5'-Bereich des Gens deutlich. Deletionen zur zur 3'-Bindestelle gingen, bis auf in einer Sequenz (T3/4C-10), nicht über die drei Basen (TCC) vor Beginn der Bindestelle hinaus.

Die Bindestelle des TALEN Konstrukte befindet sich bezogen auf die Proteinstruktur von RhMLO3 und RhMLO4 in der zweiten Transmembranregion am Übergang zur zweiten extrazellulären Schlaufe (vergleiche Kaufmann et al. 2012). Somit liegen Deletion ganzer Aminosäuren (3, 6 und 9 bp Deletionen) innerhalb der Transmembranregion der Gene.

### 3.2.4.5 Analyse der off-target Effekte der TALEN Linien

Zur Prüfung auf mögliche off-target Effekte des stabil übertragende TALENKonstrukts für die Gene *RhMLO3* und *RhMLO4*, wurden von jeder der oben beschriebenen Proben auch die nah verwandten Gene *RhMLO1* und *RhMLO2* im homologen Bereich der Bindestelle von TMlo3/4-2 amplifiziert und sequenziert. Diese Pools wurden ebenso wie die für *RhMLO3* und *RhMLO4* auf Varianten zur entsprechenden Wildtyp-Sequenz der nicht-transgenen Kontroll-Probe hin untersucht. In keinem der analysierten Pools für *RhMLO1* und *RhMLO2*, weder in den Proben zu Beginn noch zum Ende der Kaskade, konnten Mutationen (Punktmutationen oder InDels) oberhalb des 1,0 % Schwellenwertes detektiert werden. Insgesamt wurden 184.906 Reads auf mögliche off-target Effekte des TALEN Konstrukts untersucht sowie 115.943 Reads, welche Zielsequenzen des Konstrukts darstellen. Eine Übersicht über die Mutationsraten aller untersuchten Proben, inbegriffen der zur Überprüfung möglicher off-target Effekte, kann dem Anhang A.8 entnommen werden.

Die Sequenzidentitäten zwischen den Zielsequenzen von *RhMLO3* und *RhMLO4* liegen zu *RhMLO1* bei rund 60 % und bei *RhMLO2* bei 64,6 %. Untereinander weisen die TALEN-Bindestellen von *RhMLO3* und *RhMLO4* eine Identität von 97,9 % auf. In Abbildung 50 sind die Sequenzbereiche der TALEN-Bindestellen von *RhMLO3* und *RhMLO4* im Vergleich zu den homologen Sequenzen von *RhMLO1* und *RhMLO2* abgebildet.

	*	20	*	40	
RhMLO4 :	GTCCTTGCTCCTAACAGTTCTACAAGAACCAATCGCTGCTATATGTAT		GTCCTTGCTCCTAACAGTTCTACAAGATCCCATCGCTGCTATATGTAT		: 48
RhMLO3 :	GTCCTTGCTCCTAACAGTTCTACAAGATCCCATCGCTGCTATATGTAT		GTCCTTGCTCCTAACAGTTCTACAAGATCCCATCGCTGCTATATGTAT		: 48
RhMLO2 :	CTCGGTGCTGCTAACAGTAGGACAAGGGCCCATTTGGCAACATTTGCAT		CTCGGTGCTGCTAACAGTAGGACAAGGGCCCATTTGGCAACATTTGCAT		: 48
RhMLO1 :	ATCGGTGCTGCTAACAGTTGGGGCAAGGTCCGATATCGAACATTTGCAT		ATCGGTGCTGCTAACAGTTGGGGCAAGGTCCGATATCGAACATTTGCAT		: 48

**Abbildung 50: Sequenzen der TALEN-Bindestellen von *RhMLO3* und *RhMLO4* im Vergleich zu den homologen Sequenzbereichen von *RhMLO1* und *RhMLO2*.**

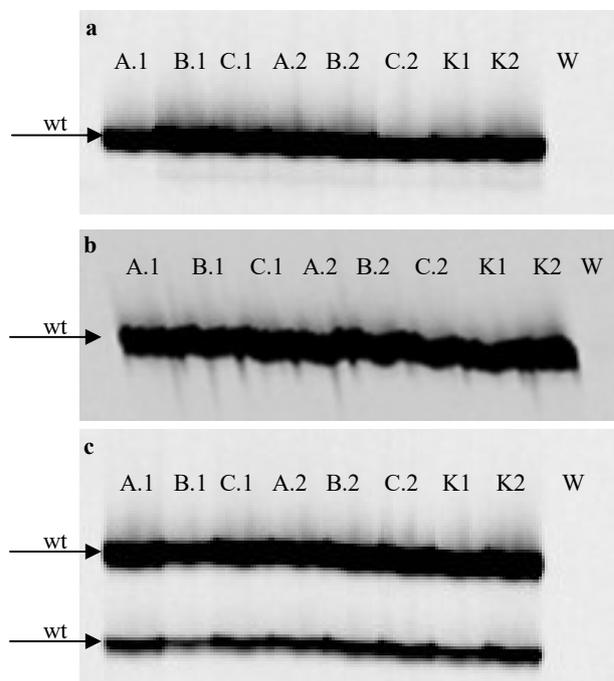
Schwarz hinterlegte Bereiche weisen Identitäten von 100 % auf, dunkelgraue hinterlegte mit weißer Schrift Identitäten von 80 %, hellgrau hinterlegte mit schwarzer Schrift von 60 % und weiß hinterlegte Bereiche weisen Identitäten von unter 60 % auf. Der rote Balken markiert die Bindestellen des TALEN Konstrukts.

Aus Abbildung 50 wird deutlich, dass insbesondere in der 5'-Bindestelle des TALENKonstrukts Übereinstimmungen zwischen den vier *RhMLO*-Genen vorkommen (schwarz hinterlegte Bereiche). Hier sind 12 der 18 Basen über alle vier Gene hinweg identisch. Bei der 3'-Bindestelle waren es hingegen nur 9 Basen. Die Unterschiede in den Sequenzen der *RhMLO* Gene waren somit ausreichend, um off-target Effekte zu unterbinden.

### 3.3 CRISPR/Cas-vermittelte Mutation der *RhMLO* Gene

#### 3.3.1 Transiente Transformation der CRISPR/Cas Konstrukte

Für die Arbeit standen zwei unterschiedliche Generationen von CRISPR/Cas-Konstrukten zur Verfügung. Bei der ersten Generation befand sich die Cas9n (CasD10A) unter Kontrolle des 35S Promotors und bei den Konstrukten der zweiten Generation unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus *A. thaliana*. Die Konstrukte der zweiten Generation wurden von der Firma DNA Cloning Service (Hamburg) bereitgestellt, da sie eine bis zu 5-fach gesteigerte Effizienz aufweisen sollten (persönliche Mitteilung DNA Cloning Service). Zur Überprüfung der Einsetzbarkeit der transienten Infiltration in Petalen zur Analyse der CRISPR/Cas Konstrukt-Effizienz, als auch zur Überprüfung möglicher Unterschiede in der Effizienz der CRISPR/Cas Konstrukte beider Generationen, wurde die transienten Agro-Infiltration wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben in Petalen von 'Pariser Charme' dreimal durchgeführt. Von den infiltrierten Proben wurde DNA isoliert und diese für PCR-Reaktionen zur Amplifikation der CRISPR/Cas Bindestellen eingesetzt. In der nachfolgenden Abbildung 51 ist das Ergebnis der PAA-Gelelektrophoresen aufgeführt.



**Abbildung 51: PAA-Gelelektrophorese der amplifizierten Bindestellen der transienten Transformation mit den CRISPR/Cas Konstrukten der ersten und zweiten Generation.**

a) PAA-Gelelektrophorese von CCMIo1; b) PAA-Gelelektrophorese von CCMIo2; c) PAA-Gelelektrophorese von CCMIo3/4; A, B, C: Proben der drei Infiltrationsversuche; .1: jeweiliges CRISPR/Cas Konstrukt der ersten Generation; .2: jeweiliges CRISPR/Cas Konstrukt der zweiten Generation; K1: Infiltrationskontrolle mit pRedU10; K2: nicht transgene 'Pariser Charme' Kontrolle; W: Wasser-Kontrolle; die Pfeile markieren die Wildtyp-Banden (wt).

Aus Abbildung 51 wird deutlich, dass es weder bei den Konstrukten der ersten noch der zweiten Generation von CCMlo1 (a), CCMlo2 (b) und CCMlo3/4 (c) zu von den Wildtyp-Banden abweichenden Bandenmustern kam. Damit konnte mittels PCR-Amplifikation und PAA-Gelelektrophorese keine Aktivität der CRISPR/Cas Konstrukte nachgewiesen werden, da diese durch mutierte wt Banden unterschiedlicher Länge im Gel sichtbar geworden wären. Die Amplifikation der Bindestellen wurde hier mit der maximalen Anzahl von 40 Zyklen durchgeführt, um auch seltene Mutationsereignisse sichtbar zu machen. Dies konnte aber auch mit der hohen Zyklenzahl nicht erreicht werden. Falls Unterschiede in der Effizienz der Konstrukte der ersten und zweiten Generation vorlagen, konnte dies mittels transienten Ansatzes nicht nachgewiesen werden.

### 3.3.2 Stabile Transformation der CRISPR/Cas Konstrukte

#### 3.3.2.1 Transformationseffizienz und Überprüfung des transgenen Charakters

Mit den drei CRISPR/Cas Konstrukten der ersten Generation (Cas9n unter Kontrolle des 35S Promotors) wurden insgesamt 550 Cluster somatischer Embryonen von 'Pariser Charme' in einem Transformationsexperiment transformiert. Die Konstrukte der zweiten Generation wurden nicht verwendet, da sie erst wesentlich später zur Verfügung standen und daher nur mittels des wesentlich schnelleren, transienten Ansatzes überprüft werden konnten. Eine Übersicht über die eingesetzten Explantate pro Konstrukt und die daraus resultierenden Linien samt Transformationseffizienz gibt Tabelle 53.

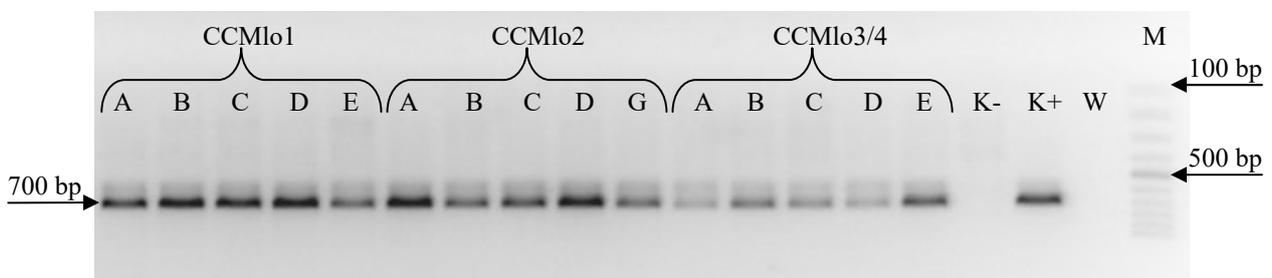
**Tabelle 53: Übersicht über das Transformationsexperiment mit den CRISPR/Cas Konstrukten.**

Konstrukt	Ziel <i>RhMLO</i>	Anzahl eingesetzter Explantate	Anzahl regenerierter Linien	Anzahl vermehrungsfähiger Linien	Transformations- effizienz (verm. Linien)
CCMlo1	RhMLO1	200	11	8	4,0 %
CCMlo2	RhMLO2	200	18	15	7,5 %
CCMlo3/4	RhMLO3 RhMLO4	150	31	14	9,33 %
		$\Sigma$ 550	$\Sigma$ 60	$\Sigma$ 37	$\Sigma$ 6,73 %

Die Transformationseffizienzen in Tabelle 53 wurden jeweils für die Anzahl der vermehrungsfähigen Linien berechnet, da nur diese für Analysen zur Verfügung standen. Mit dem Konstrukt CCMlo1 konnten acht vermehrungsfähigen Linien erzeugt werden, was einer Transformationseffizienz von 4,0 % entspricht. Mit dem Konstrukt CCMlo2 konnten 15

Linien (Effizienz von 7,5 %) und mit CCMIo3/4 14 Linien (Effizienz von 9,33 %) erzeugt werden. Somit konnte für die Transformation eine Gesamt-Effizienz von 6,73 % verzeichnet werden. Zum Ende der Versuche konnten noch nicht von allen regenerierten Linien Sprosse (Klone) für eine Vermehrung entnommen werden, da sie noch als Kallus vorlagen. Hierher rühren die unterschiedlichen Zahlen zwischen der Anzahl der regenerierten Linien und der Anzahl der vermehrungsfähigen Linien (Tabelle 53).

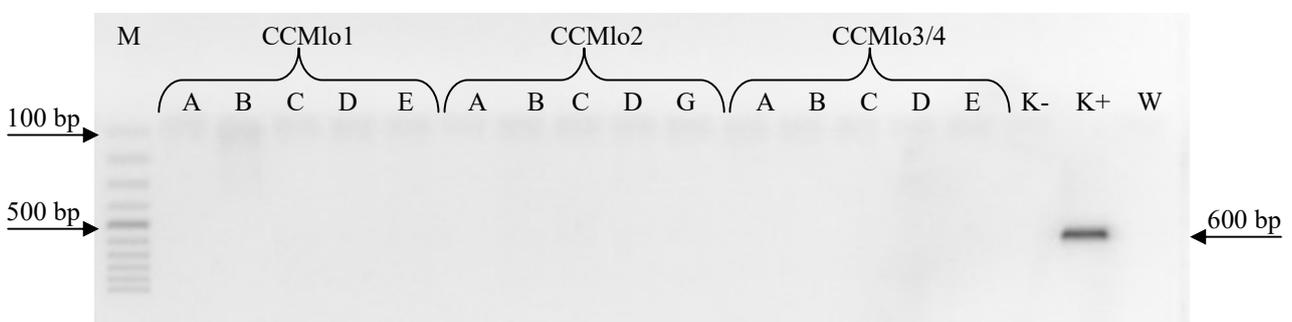
Zur Verifizierung der stabilen Integration der T-DNA wurde DNA von *in vitro* Sprossen isoliert und eine PCR zur Überprüfung der Anwesenheit des *NPTII* Gens durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analyse ist repräsentativ für jeweils fünf Linien pro Konstrukt in Abbildung 52 dargestellt.



**Abbildung 52: Repräsentatives Ergebnis nach Agarosegelelektrophorese der *NPTII*-PCR von regenerierten CRISPR/Cas Linien.**

A, B, C, D, E bzw. G bezeichnen die Linien von CCMIo1 (CC1A bis CC1E), CCMIo2 (CC2A bis CC2G) und CCMIo3/4 (CC3/4A bis CC3/4E), K-: nicht-transgene 'Pariser Charme' Kontrolle, K+: Plasmid-DNA des CCMIo1 Konstrukts, W: Wasserkontrolle, M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific).

Aus Abbildung 52 geht hervor, dass alle hier untersuchten Linien, wie auch die Positivkontrolle, die charakteristische 700 bp große Bande des *NPTII* Gens aufweisen. Um auszuschließen, dass ein positives Ergebnis auf persistierende *A. tumefaciens*, welche die Plasmide samt *NPTII* Gen tragen, zurückzuführen ist, wurde mit der gleichen DNA eine PCR mit Primer für das Chromosom der Agrobakterien durchgeführt. Das Ergebnis dieser ist in Abbildung 53 aufgeführt.

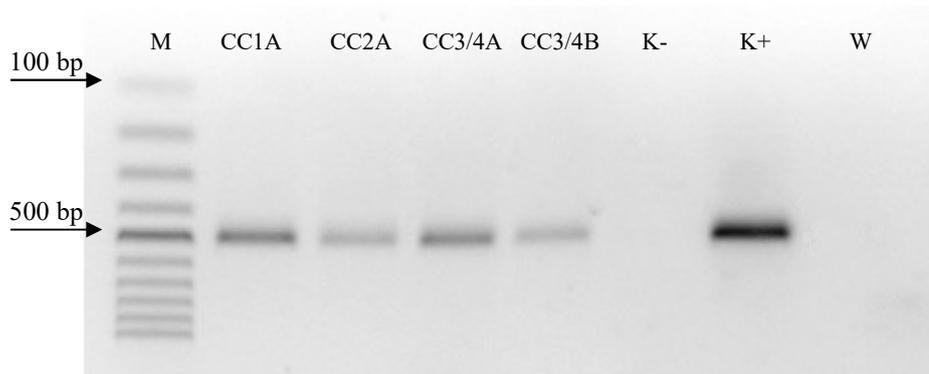


**Abbildung 53: Repräsentatives Ergebnis nach Agarosegelelektrophorese einer PCR zum Test auf persistierende Agrobakterien der CRISPR/Cas Linien.**

A, B, C, D, E bzw. G bezeichnen die Linien von CCMIo1 (CC1A bis CC1E), CCMIo2 (CC2A bis CC2G) und CCMIo3/4 (CC3/4A bis CC3/4E), K-: nicht-transgene 'Pariser Charme' Kontrolle, K+: DNA von *A. tumefaciens* Stamm GV2260, W: Wasserkontrolle, M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific).

In keiner der untersuchten Linien konnte DNA von *A. tumefaciens* nachgewiesen werden. Einzig die Probe der Positivkontrolle wies die typische 600 bp große Bande auf (siehe Abbildung 53).

Um die Expression der CasD10A-Nuklease (Cas9n) nachzuweisen, wurde repräsentativ von vier Linien eine RT-PCR mit Primern für die Nuklease-Sequenz durchgeführt. Das Ergebnis dieses Tests ist nachfolgend aufgeführt.



**Abbildung 54: Agarosegelelektrophorese der RT-PCR zum Test auf CasD10A Expression.**

Representatives Ergebnis der Linien CC1A (Konstrukt CCMlo1), CC2A (Konstrukt CCMlo2), CC3/4A und CC3/4B (beide Konstrukt CCMlo3/4), K-: nicht-transgene 'Pariser Charme' Kontrolle, K+: Plasmid-DNA von CCMlo1, W: Wasser-Kontrolle, M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific).

In den vier untersuchten Linien konnte die Expression der CasD10A mittels RT-PCR nachgewiesen werden, da sie, wie die Positiv-Kontrolle, die typische Bande von 500 bp im Bild der Agarosegelelektrophorese aufwiesen (Abbildung 54). Zur Benennung der unterschiedlichen Linien wurde ein vereinfachtes System der Nomenklatur eingeführt, um die Unterscheidung und Dokumentation zu vereinfachen. Eine Übersicht über die Bezeichnung ist in Tabelle 54 gegeben.

**Tabelle 54: Schema zur Bezeichnung der CRISPR/Cas Linien.**

Konstrukt	Ziel <i>RhMLO</i>	Bezeichnung der Linien	
CCMlo1	<i>RhMLO1</i>	CC1	A, B, C, D etc.
CCMlo2	<i>RhMLO2</i>	CC2	A, B, C, D etc.
CCMlo3/4	<i>RhMLO3, RhMLO4</i>	CC3/4	A, B, C, D etc.

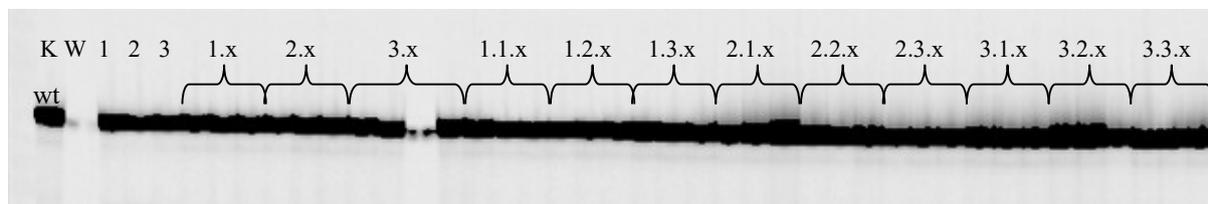
Alle Sprosse der vermehrungsfähigen Linien wiesen keine auffälligen phänotypischen Veränderungen zu den nicht-transgenen In-vitro-Sprossen auf. Auch zeichneten sie sich durch eine vergleichbare Bewurzelungsfähigkeit zu den Kontroll-Pflanzen aus. Alle hier aufgeführten Analysen wurden mit In-vitro-Material durchgeführt.

### 3.3.3 Kaskaden-Vermehrung der CRISPR/Cas Linien

Erste Analysen der CRISPR/Cas Bindestellen der erzeugten Linien auf PPA-Gelen zeigten, dass neben zusätzlichen Banden die Bande der Wildtyp-Sequenz noch stark ausgeprägt war. Deshalb wurde auch bei einer Auswahl der CRISPR/Cas Linien, wie bei den TALEN Linien, eine kaskadenartige Vermehrung mit In-vitro-Material durchgeführt. Hier sollte über die Vermehrungsschritte eine fortschreitende Aktivität der Konstrukte und mögliche Akkumulation von mutierten Sequenzen überprüft werden. In Abbildung 37 in Kapitel 3.2.3 ist eine graphische Darstellung der Kaskaden-Vermehrung abgebildet. Jeweils zwei Linien pro CRISPR/CasKonstrukt wurden für die kaskadenartigen Vermehrung von In-vitro-Sprossen ausgewählt: CC1A, CC1B, CC2B, CC2C, CC3/4A und CC3/4C. Jede der Kaskaden, mit Ausnahme der von CC2C, konnte bis zur dritten Vermehrungsstufe geführt werden. Hierfür wurden die Sprosse alle vier bis sechs Wochen auf neues Medium umgesetzt, Proben für die DNA-Isolation genommen und die Sprosse vermehrt. Da es in einigen Fällen zum Absterben der vermehrten Sprosse kam oder die Proben bei der DNA-Isolation ausfielen, konnten nicht immer alle Proben analysiert werden.

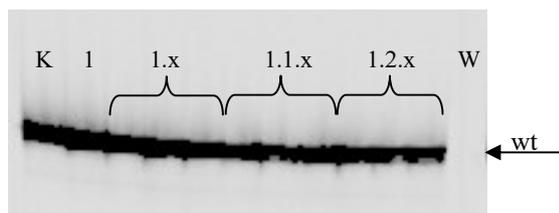
#### 3.3.3.1 Kaskaden der Linien von CC1A/1B

In Vortests mit den Linien von CC1A/1B konnten bei geringen Zyklenzahlen der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestelle keine veränderten Muster zur Wildtyp-Kontrolle mittels PAA-Gelelektrophorese festgestellt werden. Daher wurde für die PCR zur Amplifikation der Fragmente die Zyklenzahl auf 40 hochgesetzt, um auch seltene Veränderungen zur Wildtyp-Sequenz detektieren zu können. Für beide untersuchten Linien standen Proben von drei Vermehrungsrunden für die Analyse zur Verfügung. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der PAA-Gelelektrophorese der Kaskaden der Linie CC1A und CC1B aufgeführt.



**Abbildung 55: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen der Kaskade von CC1A.**

Die PCR-Fragmente der amplifizierten CRISPR/Cas-Bindestelle von CC1A/1B wurden auf einem 6%igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Nummern über den Banden geben die jeweilige Bezeichnung der Probe in der Kaskade an, das x ist jeweils durch die Nummern 1, 2 und 3 (in ebendieser Reihenfolge) zu ersetzen, K: 'Pariser Charme' Kontrolle, W: Wasserkontrolle, wt: Wildtyp-Bande.



**Abbildung 56: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen der Kaskade von CC1B.**

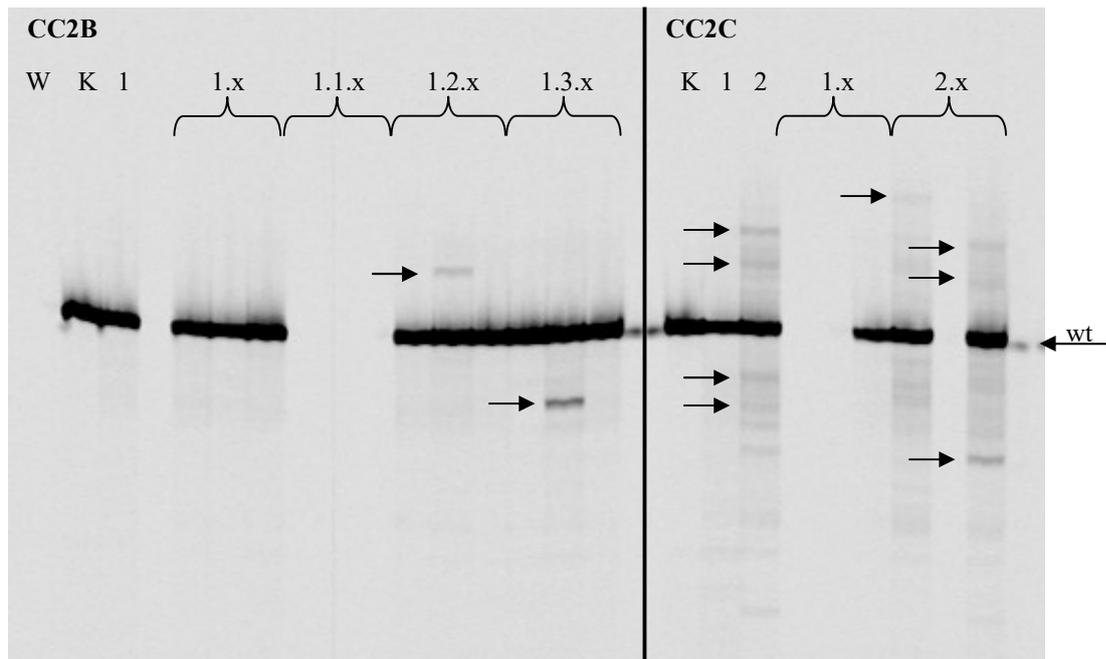
Die PCR-Fragmente der amplifizierten CRISPR/Cas-Bindestelle von CC1B wurden auf einem 6%igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Nummern über den Banden geben die jeweilige Bezeichnung der Probe in der Kaskade an, das x ist jeweils durch die Nummern 1, 2 und 3 (in ebendieser Reihenfolge) zu ersetzen, K: 'Pariser Charme' Kontrolle, W: Wasserkontrolle, wt: Wildtyp-Bande.

Aus den Abbildungen der beiden Kaskaden von CC1A und CC1B wird ersichtlich, dass in keiner der Proben, weder zu Beginn noch zum Ende der Kaskaden, andere Banden als die Wildtyp-Bande im PAA-Gelbild detektiert werden konnten. Trotz der hohen Zyklenzahl während der PCR zur Amplifikation der Fragmente konnten auch keine schwachen Banden, die auf eine Veränderung der Wildtyp-Sequenz hindeuten könnten, detektiert werden.

In einem weiteren Test wurden einzelne Proben der Linien CC1A, CC1B, CC1C, CC1D und CC1E auf Veränderungen der Wildtyp-Sequenz mittels Amplifikation der CRISPR/Cas-Binderegion und Auftrennung über eine PAA-Gelelektrophorese untersucht. Auch hier konnte in keiner der untersuchten Proben ein abweichendes Muster zur Wildtyp-Kontrolle festgestellt werden (Daten nicht aufgeführt).

### 3.3.3.2 Kaskaden der Linien von CC1B

Von der Transformation mit dem Konstrukt CC1B wurden die Linien CC2B und CC2C für den Versuch der Kaskaden-Vermehrung ausgewählt. Für CC2B konnten drei Vermehrungsschritte durchgeführt werden, für CC2C hingegen nur zwei. Die PAA-Gelelektrophorese der amplifizierten Bindestellen für CC1B der beiden Linien ist in Abbildung 57 abgebildet.



**Abbildung 57: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen der Kaskaden von CC2B und CC2C.**

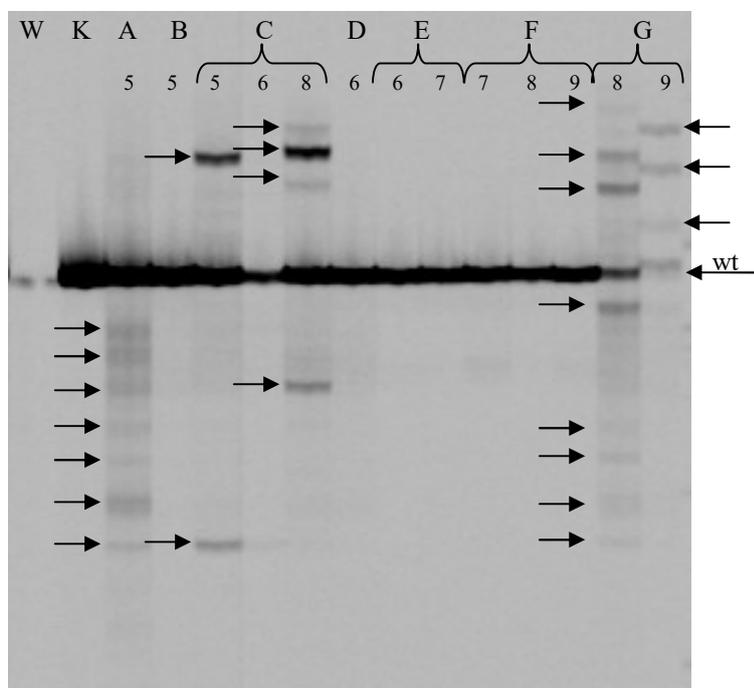
Die PCR-Fragmente der amplifizierten CRISPR/Cas-Bindestelle von CCMlo2 wurden auf einem 6%-igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Nummern über den Banden geben die jeweilige Bezeichnung der Probe in der Kaskade an, das x ist jeweils durch die Nummern 1, 2 und 3 (in ebendieser Reihenfolge) zu ersetzen, K: 'Pariser Charme' Kontrolle, W: Wasserkontrolle, wt: Wildtyp-Bande, die Pfeile markieren markante Banden von abweichender Größe zur Wildtyp-Bande.

Aus Abbildung 57 wird deutlich, dass bei allen Proben, auch zum Ende der Kaskaden noch starke Wildtyp-Banden detektiert werden konnten. In der Kaskade von CC2B konnten nur bei den Proben 1.2.2 und 1.3.2 zusätzliche Banden zur Wildtyp-Bande detektiert werden. Die zusätzliche Bande bei CC2B 1.2.2 ist deutlich schwächer als die der wt Bande und stellt ein um wenige Basenpaare größeres Fragment dar (Insertion). Die zusätzliche Bande der Probe CC2B 1.3.2 ist hingegen stärker ausgeprägt. Diese Bande stellt ein um wenige Basen kleineres Fragment dar als das der wt Bande (Deletion). Der Spross mit der Nummer 1.1 im Laufe der Vermehrung abgestorben. Daher sind die Proben 1.1.1, 1.1.2 und 1.1.3 der Kaskade fehlend.

Die Kaskade der Linie CC2C war mit nur zwei Vermehrungsschritten kürzer als die von CC2B. Auch hier sind Proben durch absterbende Sprosse und Probleme während der DNA-Isolation fehlend (1.1.1, 1.1.2, 2.2.2). Neben der auch hier stark vertretenden wt Bande, ist ein diverseres Bandenmuster in der Probe Nr. 2 auffällig. Hier können zwei größere Fragmente als auch mindestens zwei kleine zusätzliche Fragmente festgestellt werden. Weitere Banden lassen sich schwach erahnen. In den nachfolgenden Proben (2.1 und 2.3), ist dieses Muster leicht verändert zu detektieren. Hier können zum Teil Banden nicht mehr, zusätzlich oder mit veränderter Intensität zur Probe 2. detektiert werden. Allgemein fällt auf, dass bei Proben, die zusätzliche Banden aufweisen, der Hintergrund der PAA-Gelelektrophorese dunkler gefärbt

ist. Bei genauerer Betrachtung können in diesem Hintergrund zum Teil sehr schwach Banden ausgemacht werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der dunklere Hintergrund dieser Proben schwache, zusätzliche Bande diverser Größen außerhalb der klaren Detektionsgrenze beinhaltet.

Zusätzlich zu den Proben der Kaskade wurden noch weitere Proben von Linien, die das Konstrukt CCMlo2 tragen, mittels PAA-Gelelektrophorese analysiert. Hier wurden zum Teil auch Proben von Klonen einer Linie aufgetragen, die zu unterschiedlichen Zeiten, also nach einer unterschiedlichen langer Regenerationsphase, vom proliferierenden Kallus der Linie entnommen werden konnten. Das Ergebnis der PAA-Gelelektrophorese der amplifizierten Bindestellen dieser Proben ist in Abbildung 58 dargestellt.



**Abbildung 58: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen weiterer Linien von CCMlo2.**

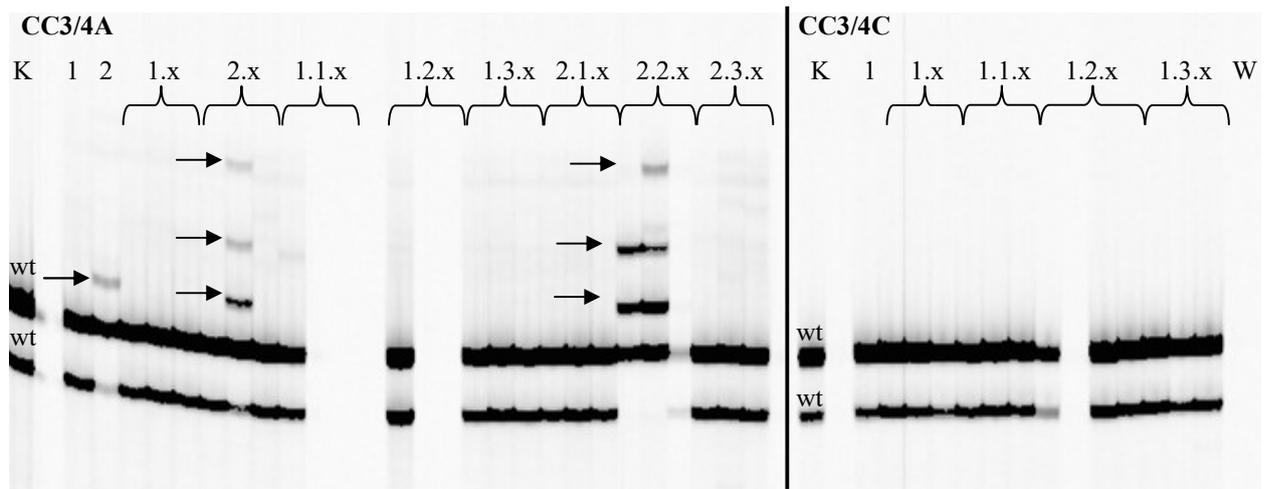
Die PCR-Fragmente der amplifizierten CRISPR/Cas-Bindestelle von CCMlo2 wurden auf einem 6%-igen PAA-Gel aufgetrennt. A: CC2A, B: CC2B, C: CC2C, D: CC2D, E: CC2E, F: CC2F, G: CC2G; die Nummer unter der Bezeichnung der Linien entsprechen der Anzahl an Monaten, die der beprobte Klon der Linie zur Regeneration benötigt hat; K: 'Pariser Charme' Kontrolle, W: Wasserkontrolle, wt: Wildtyp-Bande, die Pfeile markieren markante Banden von abweichender Größe zur Wildtyp-Bande.

Von den insgesamt sieben untersuchten Linien die das Konstrukt CCMlo2 tragen, konnte bei vier Linien (CC2B, CC2D, CC2E und CC2F) kein verändertes Bandenmuster zur Wildtyp-Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 58). Auch bei Klonen dieser Linien, die länger auf dem Regenerationsmedium bis zur Bildung von Sprossen benötigten (vergleiche Linie CC2F mit sieben, acht und neun Monaten bis zur Regeneration, kurz: 7x, 8x, 9x), konnte keine Veränderung des Bandenmusters detektiert werden.

Die anderen drei Linien (CC2A, CC2C und CC2G) wiesen jedoch ein diverses Muster an zusätzlichen Banden zur Wildtyp-Kontrolle auf. So konnten in der Probe CC2A bis zu sieben kleinere Fragmente, in der Probe CC2C nach fünf Monaten (kurz: 5x) ein größeres und ein kleineres, in der Probe CC2C 8x (nach acht Monaten auf Regenerationsmedium) drei größere und ein kleineres detektiert werden (siehe hierzu die Pfeile in Abbildung 58). Auffällig ist bei den Proben von CC2C, dass die detektierten Banden in der 5x und der 8x Probe von unterschiedlichen Größen waren und die Probe 6x keine zusätzlichen Banden zur wt Bande aufwies. Die Probe CC2G wies sowohl in der 8x als auch in der 9x Probe ein diverses Muster an multiplen Banden größerer und kleinerer Fragmente auf, wobei die Probe 9x allgemein schwächer im Gelbild abgebildet ist, was sich auch auf die Intensität der wt Bande auswirkt. Insbesondere die Probe CC2G 8x wies im Vergleich zu allen analysierten Proben ein komplexes Muster unterschiedlichster Banden an kleineren und größeren Fragmenten zu der wt Bande auf. Es konnten in dieser Probe bis zu acht abweichende Fragmente detektiert werden, wenn diese zum Teil auch nur sehr schwach im Bild der PAA-Gelelektrophorese erkennbar sind. Beide Proben von CC2G scheinen aber im Vergleich zu den anderen Proben eine schwächere Wildtyp-Bande aufzuweisen (vergl. Abbildung 58).

### **3.3.3.3 Kaskaden der Linien von CCMlo3/4**

Für die Kaskaden-Vermehrung der Linien die das Konstrukt CCMlo3/4 tragen, wurden die Linien CC3/4A und CC3/4C ausgewählt. Von beiden standen Proben von drei Vermehrungsrunden der Kaskade für die Analysen zur Verfügung. Auch hier kam es zu Ausfällen von Proben aufgrund von abgestorbenen Sprossen oder Ausfällen während der DNA-Isolation. Das Ergebnis der Amplifikation der CRISPR/Cas Bindestelle und der Auftrennung mittels PPA-Gelelektrophorese beider Linien ist Abbildung 59 zu entnehmen.

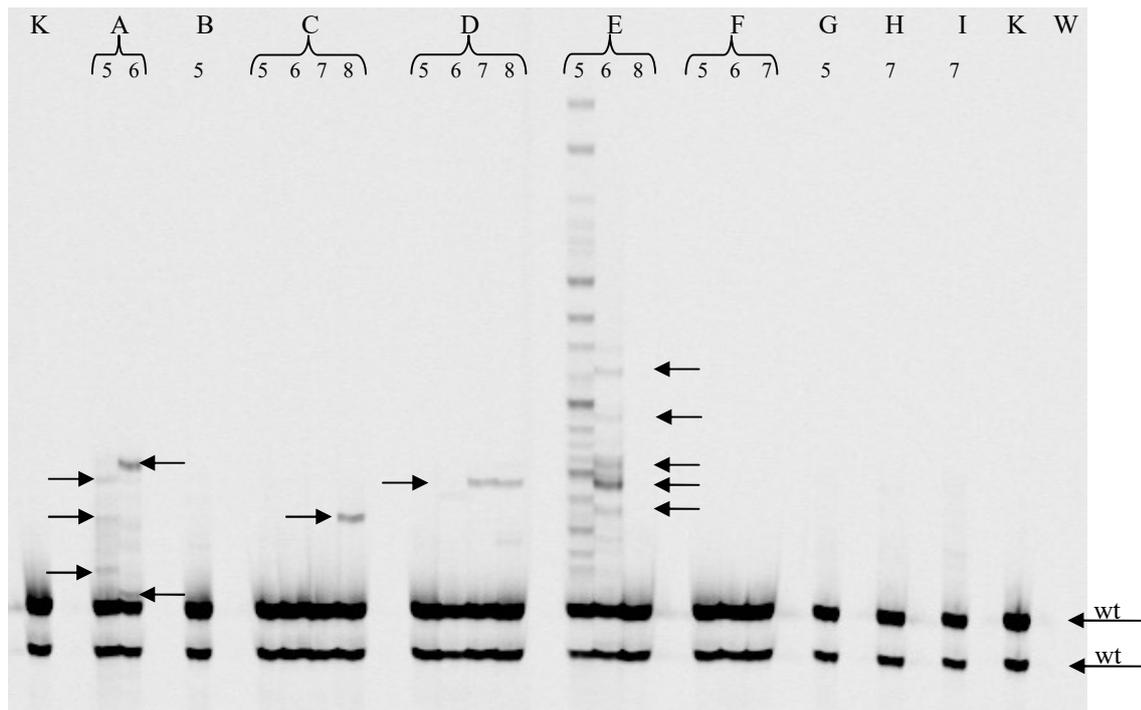


**Abbildung 59: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen der Kaskade von CC3/4A und CC3/4C.**

Die PCR-Fragmente der amplifizierten CRISPR/Cas-Bindestelle von CCMLo3/4 wurden auf einem 6%-igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Nummern über den Banden geben die jeweilige Bezeichnung der Probe in der Kaskade an, das x ist jeweils durch die Nummern 1, 2 und 3 (in ebendieser Reihenfolge) zu ersetzen, K: 'Pariser Charme' Kontrolle, W: Wasserkontrolle, wt: Wildtyp-Banden, die Pfeile markieren markante Banden von abweichender Größe zur Wildtyp-Bande.

Bei Abbildung 59 der Kaskade der Linien CC3/4A und CC3/4C ist auffällig, dass die Wildtyp-Bande hier als Doppelbande vorkam. Diese Doppelbande war sowohl in der nicht transgenen Kontroll-Probe als auch in den Proben der CRISPR/Cas Linien vorhanden. Betrachtet man allerdings die kleinere der beiden Wildtyp-Banden bei der Linie CC3/4A fällt auf, dass diese in der Probe Nr. 2 deutlich schwächer vorlag. In dieser Probe ist, zusätzlich zu den Wildtyp-Banden, eine schwach ausgeprägte zusätzliche Bande oberhalb der größeren der beiden wt Banden zu erkennen (siehe Pfeil in Abbildung 59). Im Verlauf der Kaskade wurden die Veränderungen der Proben noch deutlicher: In den Proben 2.2.1 und 2.2.2 konnte die kleinere wt Banden nicht mehr detektiert werden, dafür traten zwei (2.2.1) bis drei (2.2.2) deutliche Banden oberhalb der wt-Bande in Erscheinung. Die Probe 2.2.3 ist aufgrund schlechter Werte in der DNA-Isolation ausgefallen. Bei der Probe mit der Nr. 1 und den daraus resultierenden Proben der Kaskaden waren weder eine schwächer werdende wt Bande, noch eine oder mehrere zusätzliche Banden detektierbar. Auch die Proben der Kaskade von CC3/4C wiesen alle die beiden Wildtyp-Banden der Kontrolle auf, ohne dass jedoch zusätzliche Veränderungen im Bandenmuster detektiert werden konnten (Abbildung 59).

Zusätzlich zu den Kaskaden der Linien von CCMLo3/4 wurde noch von weiteren Proben die CRISPR/Cas-Binderegion amplifiziert und auf einem PAA-Gel aufgetrennt. Hierfür wurden Proben von Klonen von neun unterschiedlichen Linien analysiert, die zum Teil unterschiedlich lange zur Regeneration benötigten (Abbildung 60).



**Abbildung 60: PAA-Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der CRISPR/Cas-Bindestellen weiterer Linien von CCMlo3/4.**

Die PCR-Fragmente der amplifizierten CRISPR/Cas-Bindestelle von CCMlo3/4 wurden auf einem 6%-igen PAA-Gel aufgetrennt. A: CC3/4A, B: CC3/4B, C: CC3/4C, D: CC3/4D, E: CC3/4E, F: CC3/4F, G: CC3/4G, H: CC3/4H, I: CC3/4I; die Nummer unter der Bezeichnung der Linien entsprechen der Anzahl an Monaten, die der beprobte Klon der Linie zur Regeneration benötigt hat; K: 'Pariser Charme' Kontrolle, W: Wasserkontrolle, wt: Wildtyp-Bande, die Pfeile markieren Banden von abweichender Größe zur Wildtyp-Bande.

In Abbildung 60 ist das Ergebnis der Analyse der Proben von neun Linien, die das Konstrukt CCMlo3/4 trugen, abgebildet. Alle Proben wiesen die typische Doppel-Wildtyp-Bande auf. In fünf der neun Linien (CC3/4B, CC3/4F, CC3/4G, CC3/4H, CC3/4I) konnte keine Veränderung im Bandenmuster zur Kontrolle festgestellt werden. Die Linien CC3/4A und CC3/4E wiesen schon in den ersten regenerierten, beprobten Klonen (fünf Monate auf Regenerationsmedium, kurz: 5x) ein diverses Muster an zusätzlichen Banden zu den wt Banden auf. Interessanterweise unterschieden sich die Muster der 5x Proben zum Teil deutlich von dem der Proben, die sechs Monate, also einen Monat länger, zur Regeneration benötigt hatten (kurz: 6x). Die Probe CC3/4E 5x wies ein Bandenmuster mit einem, im Vergleich zu den anderen untersuchten Linien, großen Spektrum an größeren, zusätzlichen Banden auf (rund 17 zusätzliche Banden, hier wurde auf Pfeile in der Abbildung verzichtet). Die 6x Probe dieser Linie wies im Gegensatz dazu nur noch circa fünf unterschiedliche Banden auf. Nach acht Monaten konnte ein weiterer, regenerierter Klon der Linie CC3/4E entnommen und beprobt werden. Bei dieser Probe konnte durch die Analyse keine zusätzliche Bande zu den wt Banden detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnten bei den Linien CC3/4C und CC3/4D erst bei Proben, die länger zur Regeneration von Sprossen benötigt haben (acht Monate bei CC3/4C und sieben Monate bei CC3/4D), zusätzliche Banden zu den wt Banden detektiert werden, in früheren Proben

hingegen nicht. Die Linie CC3/4C wurde auch für den Versuch der Kaskaden-Vermehrung eingesetzt. Wie bereits oben beschrieben, konnten in der Kaskade, im Gegensatz zu der Probe nach achtmonatiger Regeneration, keine Veränderungen zu den wt Banden in der PAA-Gelelektrophorese detektiert werden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass sich die Mutationsrate der Linien am Regenerat räumlich und/oder zeitlich unterscheidet. Auffällig ist auch, dass im Gegensatz zu den untersuchten Proben mit dem Konstrukt CCMlo2, bei den Proben mit dem Konstrukt CCMlo3/4 nur zusätzliche Banden detektiert wurden, die größer als die wt Banden waren, also Insertionen abbildeten.

### 3.3.4 Amplikon-Sequenzierung der CRISPR/Cas Linien

Mittels der Auftrennung der amplifizierten Fragmente der CRISPR/Cas-Bindestellen auf PAA-Gelen können nur Unterschiede in den Längen der Amplikons bestimmt werden. Fragmente gleicher Länge oder Punktmutationen in den Sequenzen können nicht unterschieden werden. Um eine bessere Übersicht über die durch die CRISPR/Cas Konstrukte gesetzten Mutationen zu erlangen sowie die Linien aus der Kaskaden-Vermehrung besser hinsichtlich ihrer Mutationsfrequenzen miteinander vergleichen zu können und auf mögliche off-target Effekte zu untersuchen, wurden ausgewählte Proben für eine Sequenzierung von Amplikons herangezogen. Für das Konstrukt CCMlo1 wurde nur eine Probe für die Sequenzierung ausgewählt, da die Ergebnisse aller untersuchten Proben des Kaskaden-Versuches mit diesem Konstrukt nahelegten, dass keine Veränderungen der Zielsequenz erreicht wurden. Dies sollte mit einer Probe, welche zum Ende der Kaskade von CC1A (Probe 3.3.3) genommen wurde, überprüft werden. Zur Amplikon-Sequenzierung mit Linien die das Konstrukt CCMlo2 trugen, wurden zwei Proben aus der Kaskaden-Vermehrung der Linie CC2C gewählt. In dieser Kaskade konnten zwischen den zwei ausgewählten Proben Unterschiede im Bandenmuster detektiert werden (vergl. Abbildung 57). Als weitere Probe mit diesem Konstrukt wurde die Probe CC2G 8x ausgewählt, da diese in der PAA-Gelelektrophorese ein diverses Muster an zusätzlichen Banden aufwies (vergl. Abbildung 58). Diese Probe wurde von einem Klon der Linie CC2G entnommen, der insgesamt acht Monate zur Regeneration benötigte (kurz: 8x). Von der Linie CC3/4A wurde zum einen die Probe CC3/4A 2 verwendet, welche einen Anfangspunkt der Kaskade darstellt, und zum anderen die Probe CC3/4A 2.2.2, welche zum Ende der Kaskade genommen wurde und mit der Abwesenheit der zweiten wt Bande und zusätzlicher Fragmente in der PAA-Gelelektrophorese ein verändertes Muster aufwies (vergl. Abbildung 59). Als weitere Probe mit dem Konstrukt CCMlo3/4 wurde die Probe von CC3/4E gewählt, die fünf Monate auf Regenerationsmedium benötigte (kurz 5x). Diese Probe wies in der PAA-Gelelek-

trophorese ein komplexes Muster an größeren Fragmenten zur wt Kontrolle auf (vergl. Abbildung 60). In der nachfolgenden Tabelle 55 ist eine Übersicht über die sequenzierten Proben als auch die Read-Ausbeute jedes genspezifischen Pools der Proben angegeben.

**Tabelle 55: Eingesetzte Proben der CRISPR/Cas Linien für die Amplikon-Sequenzierung und erhaltene Anzahl der Reads pro Probe.**

Probe	Amplifiziertes <i>RhMLO</i>	Anzahl Paired-Reads	
'Pariser Charme'	<i>RhMLO1</i>	9614	
Kontrolle CCMlo1	<i>RhMLO2</i>	14636	
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	16254	
CC1A 3.3.3	<i>RhMLO1</i>	9310	
	<i>RhMLO2</i>	10724	
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	12441	
'Pariser Charme'	<i>RhMLO2</i>	15680	
	Kontrolle CCMlo2	<i>RhMLO1</i>	8376
		<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	14971
CC2C 2	<i>RhMLO2</i>	16217	
	<i>RhMLO1</i>	13369	
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	15545	
CC2C 2.3	<i>RhMLO2</i>	12430	
	<i>RhMLO1</i>	11409	
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	15254	
CC2G 8x	<i>RhMLO2</i>	9366	
	<i>RhMLO1</i>	9719	
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	11922	
'Pariser Charme'	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	20556	
	Kontrolle CCMlo3/4	<i>RhMLO1</i>	14861
		<i>RhMLO2</i>	10419
CC3/4A 2	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	19812	
	<i>RhMLO1</i>	22029	
	<i>RhMLO2</i>	8213	
CC3/4A 2.2.2	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	16722	
	<i>RhMLO1</i>	19088	
	<i>RhMLO2</i>	7538	
CC3/4E 5x	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	11791	
	<i>RhMLO1</i>	19449	
	<i>RhMLO2</i>	10386	

Für jede Bindestelle der CRISPR/Cas Konstrukte wurde zusätzlich zu den transgenen Linien noch die Wildtyp-Sequenz einer nicht-transgenen 'Pariser Charme' Kontrolle amplifiziert, sowohl für die jeweilige Zielregion als auch für die möglichen off-target Regionen der anderen *RhMLOs* aus Klade V. Insgesamt wurden für die Kontrollen und die transgenen Linien 408.101 Paired-Reads analysiert. Die Anzahl an Reads pro Pool variiert zwischen 7.538 (off-target Pool von *RhMLO2* bei der Probe CC3/4A 2.2.2) und 22.029 Reads (off-target Pool von

*RhMLO1* der Probe CC3/4A 2) (siehe Tabelle 55). Beim Poolen der Amplikons der Sequenzierung wurde für die jeweiligen Ziel-Amplikons der CRISPR/CasKonstrukte die doppelte Menge eingesetzt, um die Read-Ausbeute in diesen Proben zu erhöhen. Vergleicht man jedoch die erzielten Read-Ausbeuten in Tabelle 55, fällt auf, dass dieses Ziel nicht immer erreicht werden konnte. Mit einer Ausbeute von mindestens rund 10.000 Paired-Reads pro Probe stand indes eine ausreichend hohe Anzahl an Reads für die Analyse zur Verfügung.

### **3.3.4.1 Auswertung der Amplikons der Probe von Linie CC1A**

Die Linie CC1A wies in den Analysen der PAA-Gelelektrophoresen der Kaskade keine Veränderung zum Wildtyp auf. Auch in allen anderen untersuchten Linien, die das Konstrukt CCMLo1 trugen, konnten keine Veränderungen zum Wildtyp detektiert werden. Diese Ergebnisse sollten mittels Amplikon-Sequenzierung verifiziert werden, denn die Analyse mittels PAA-Gelelektrophorese kann nur Mutationen oberhalb eines gewissen Schwellenwertes detektieren (siehe hierzu Ergebnisse der TALEN Linien) und ist nicht in der Lage Punktmutationen innerhalb der aufgetrennten Sequenzen zu visualisieren. Aus diesem Grund wurde die Probe CC1A 3.3.3 zum Ende der Kaskade von CC1A ausgewählt. Im Vergleich der Reads von CC1A 3.3.3 mit den Reads der 'Pariser Charme' Kontrolle, konnten keine abweichenden Varianten oberhalb des Schwellenwertes von 1,0 % detektiert werden. Es wurden also keine Mutationen aufgrund von induzierten Doppelstrangbrüchen in der Binderegion des CCMLo1 Konstrukts nachgewiesen. Der festgelegte Schwellenwert sollte Fehler, die auf die PCR zur Amplifikation der Produkte oder die Sequenzierreaktion zurückgehen ausschließen. Oberhalb dieses Schwellenwertes konnten weder in der Probe der Kontrolle noch in der von CC1A 3.3.3 Varianten detektiert werden.

### **3.3.4.2 Auswertung der Amplikons der Linien von CCMLo2**

#### **3.3.4.2.1 Auswertung der Amplikons der Kaskade von CC2C**

Die Analyse der Varianten der Probe CC2C 2 stellte sich als aufgrund der unterschiedlichen Insertionen und Deletionen als komplexer dar, als es bei den TALEN Linien der Fall war. Daher wurde der Pool der Reads für *RhMLO2* in drei Sub-Pools aufgeteilt (siehe 2.2.5.4). Auf diese Weise wurde das komplexe Muster an Sequenzen unterschiedlicher Länge vereinfacht, was das Mapping gegen die Referenz-Sequenz und somit nachfolgend auch die Varianten Detektion verbesserte. Der *RhMLO2*-Gesamtpool umfasste insgesamt 16217 Sequenzen. In den Sub-Pool mit Sequenzen gleicher Länge zur Referenz-Sequenz konnten 9417 Reads sortiert werden, in den mit kürzeren Sequenzen 4822 und in den Sub-Pool mit längeren

Sequenzen konnten 1781 Reads sortiert werden. Die Detektionsschwelle für Varianten wurde auch bei den Sub-Pools auf 1,0 % gesetzt. Daraus ergab sich, dass Varianten detektiert wurden, die in dem Sub-Pool zwar mit einer Frequenz von über 1,0 % vorkamen, im Gesamtpool lagen die Frequenzen jedoch oftmals unterhalb der 1,0 % Schwelle. In der nachfolgenden Tabelle 56 sind die detektierten Insertionen und Deletionen gleicher Länge der Sub-Pools zusammengefasst und die jeweilige Frequenz im Gesamtpool angegeben. Im Pool mit den Sequenzen gleicher Länge konnten neben InDels auch keine SNPs oberhalb des 1,0 % Schwellenwertes detektiert werden. Die ausführliche Auflistung aller detektierten Varianten kann dem Anhang A.9 entnommen werden.

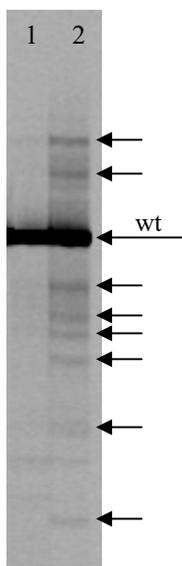
**Tabelle 56: Detektierte Varianten gleicher Länge der Probe CC2C 2.**

Typ	Länge	Frequenz
Deletion	5	0,35
Deletion	8	0,46
Deletion	9	0,39
Deletion	10	1,45
Deletion	11	1,41
Deletion	13	0,37
Deletion	15	0,54
Deletion	17	0,38
Deletion	18	0,35
Deletion	21	1,49
Deletion	26	1,31
Insertion	1	0,12
Insertion	2	0,13
Insertion	4	0,15
Insertion	5	0,16
Insertion	6	0,30
Insertion	8	0,59
Insertion	10	0,16
Insertion	11	1,12
Insertion	13	0,79
Insertion	14	1,38
Insertion	15	0,14
Insertion	16	0,57
Insertion	17	0,27
Insertion	18	0,47

Insgesamt konnten in der Probe CC2C 2 zwölf verschiedene Deletionen von 5 bis 26 bp Länge detektiert werden, von denen 11 die gleiche Länge aufwiesen. Lediglich vier dieser Deletionen konnten mit einer Frequenz von über 1,0 % im Gesamtpool der Reads aber unterhalb von 1,5 % nachgewiesen werden (10, 11, 21 und 26 bp Deletionen). Die in der Probe detek-

tierten 23 unterschiedlichen Insertionenwiesen Längen von 1 bis 18 bp auf und konnten in 14 Insertionen gleicher Länge zusammengefasst werden. Von diesen lagen nur zwei mit einer Frequenz von über 1,0 %, jedoch unter 1,5 %, im Gesamtpool vor (11 und 14 bp Insertion). Damit stellte die 21 bp Deletion mit 1,49 % die am häufigsten detektierte Variante der Probe CC2C 2 dar. Insgesamt konnte eine Mutationsfrequenz von 15,32 % in der Probe nachgewiesen werden. Von diesen 15,32 % führten 11,17 % der Insertionen und Deletionen zu einer Verschiebung des Leserasters und somit zu einem Knock-out des *RhMLO2* Gens. Die restlichen InDels, wie die am häufigsten detektierte Deletion von 21 bp, führten lediglich hingegen zu einem Verlust oder der Insertion von Aminosäuren.

Vergleicht man die detektierten Mutationen mit dem Bild der PAA-Gelelektrophorese dieser Probe (Abbildung 61), fällt auf, dass eine Zuordnung der in der Amplikon-Sequenzierung detektierten Varianten zu den Banden im Gel-Bild schwierig ist. Aufgrund der niedrigen Mutationsraten insgesamt wurden die PCR Reaktionen zur Amplifikation der Bindestellen für die PAA-Gelelektrophorese im Vergleich zu denen der TALEN-Linien auf 33 Zyklen hochgesetzt. Hinzukommt, dass die PAA-Gele der CRISPR/Cas Linien im Vergleich zu denen der TALEN-Linien niedriger prozentig waren, was die zwar Auflösung verminderte, aber aufgrund der größeren Amplikons und der Bandbreite an Insertionen und Deletionen nötig war.



**Abbildung 61: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCMlo2 Bindestelle der Probe CC2C 2.**

1) Probe CC2C 1 und 2) Probe CC2C2; wt: Wildtyp-Bande; die Pfeile markieren prägnante Banden abweichender Größe zur wt Bande.

Zum Vergleich wurde in Abbildung 61 zusätzlich zur Probe CC2C 2 (Spur 2) auch die Probe CC2C 1 (Spur 1) abgebildet, in der keine deutliche Veränderungen zur wt Bande in der PAA-Gelelektrophorese beobachtet werden konnte. In der Spur der Probe CC2C konnte die genaue

Anzahl ein Banden oberhalb und unterhalb der wt Bande nicht eindeutig bestimmt werden. Es traten jedoch zwei stärkere Banden oberhalb der wt Bande auf, die die 11 bp und 14 bp Insertion repräsentieren könnten (mit Pfeilen in der Abbildung markiert). Beide lagen mit über 1,0 % in den Reads der Amplikons-Sequenzierung am häufigsten vor. Insgesamt sechs Banden traten unterhalb der wt Bande deutlicher hervor (mit Pfeilen in der Abbildung markiert). Diese könnten die 8 bp, 10 bp, 11 bp, 15 bp, 21 bp und 26 bp Deletionen repräsentieren, da diese Deletionen in der Amplikon-Sequenzierung mit den höchsten Frequenzen detektiert wurden (vergl. Tabelle 56). Allerdings scheinen hier die Abstände zwischen den Fragmenten nicht immer nachvollziehbar mit den Größen der detektierten Deletionen übereinzustimmen. So war der Abstand zwischen der möglichen Bande der 21 bp Deletion und der der 26 bp Deletionen proportional zu groß. Dies lässt darauf schließen, dass die Zuordnung der InDels nicht ganz korrekt ist.

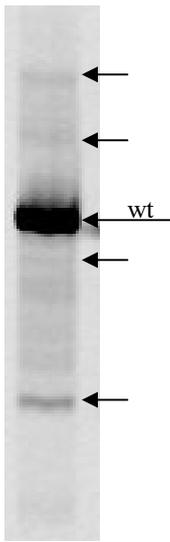
Zur Amplikon-Analyse des nächsten Vermehrungsschrittes der Kaskade von CC2C wurde die Probe CC2C 2.3 ausgewählt. Die Analyse der Probe CC2C 2.3 wurde wie bei CC2C 2 in Sub-Pools basierend auf Sequenzen größerer, kleinerer und gleicher Länge zur Referenz-Sequenz durchgeführt. In dem Pool mit Sequenzen gleicher Länge konnten auch in dieser Probe keine Varianten zur Wildtyp-Sequenz oberhalb von 1,0 % nachgewiesen werden. Die ausführliche Auflistung der Varianten der beiden Pools mit Sequenzen unterschiedlicher Länge kann dem Anhang A.9 entnommen werden. In der nachfolgenden Tabelle 57 sind die detektierten Insertionen und Deletionen gleicher Länge der Probe CC2C 2.3 und deren Frequenz im Gesamtpool aufgeführt.

**Tabelle 57: Detektierte Varianten gleicher Länge der Probe CC2C 2.3.**

Typ	Länge [bp]	Frequenz
Deletion	3	1,20
Deletion	6	0,63
Deletion	8	0,57
Deletion	9	0,39
Deletion	10	0,69
Deletion	11	0,89
Deletion	13	0,44
Deletion	15	0,28
Deletion	17	0,27
Insertion	1	0,24
Insertion	2	0,13
Insertion	4	0,09
Insertion	6	0,10
Insertion	10	0,19
Insertion	11	0,50
Insertion	13	1,10
Insertion	14	0,73
Insertion	15	0,14
Insertion	16	0,40
Insertion	17	0,27
Insertion	20	0,53

Insgesamt konnten neun verschiedene Deletionen in der Probe CC2C 2.3 detektiert werden, von denen alle unterschiedliche Längen von 3 bis 17 Basenpaaren aufwiesen. Gemessen am Gesamtpool der Reads konnte lediglich die 3 bp Deletion mit einer Frequenz 1,2 % oberhalb der 1,0 % Schwelle detektiert werden. Im Vergleich zu den Deletionen der vorangegangenen Probe CC2C 2 fällt auf, dass Veränderungen in der Zusammensetzung der Deletionen festzustellen sind. So konnte beispielsweise die 21 bp Deletion, die im Pool der vorangegangenen Probe am häufigsten detektiert wurde, in dieser Probe nicht mehr nachgewiesen werden. Insgesamt konnten 23 verschiedenen Insertionen in der Probe CC2C 2.3 in Längen von 1 bis 20 bp festgestellt werden. Von diesen wiesen 12 die gleiche Länge auf (Tabelle 57). Von den einzelnen Mutationen konnte keine mit mehr als 1,0 % im Gesamtpool nachgewiesen werden (Anhang A.9.4). Zusammengefasst lagen lediglich die 13 bp Insertionen mit einer Frequenz von 1,1 % oberhalb von 1,0 % in der Probe vor. Auch die Insertionen wiesen zwischen den beiden Proben zum Beginn und zum Ende der Kaskade Unterschiede im Vorkommen und der Frequenz auf. So konnte beispielsweise die 18 bp Insertion zum Ende nicht mehr nachgewiesen werden, hingegen hier eine 20 bp Insertion. Die Insertionen mit 11 bp (1,12 %), 13 bp (0,79 %) und 14 bp (1,38 %) lagen am häufigsten vor, was den Werten von CC2C 2 ähnelt

(Tabelle 56). Insgesamt wurde eine Mutationsrate von 9,8 % in der Probe CC2C 2.3 festgestellt, von denen rund 7 % zu einer Veränderung des Leserasters des Gens und somit zum Knock-out führten. Die Mutationsrate lag damit zum Ende der Kaskade in Probe CC2C 2.3 um 5,5 % niedriger als die Mutationsrate zu Beginn der Kaskade bei Probe CC2C 2 (15,3 %). Zum Vergleich der mittels Amplikon-Sequenzierung detektierten InDels mit denen der mittels PPA-Gelelektrophorese ermittelten, ist in der nachfolgenden Abbildung das Ergebnis der PAA-Gelelektrophorese der Probe CC2C 2.3 aufgeführt.

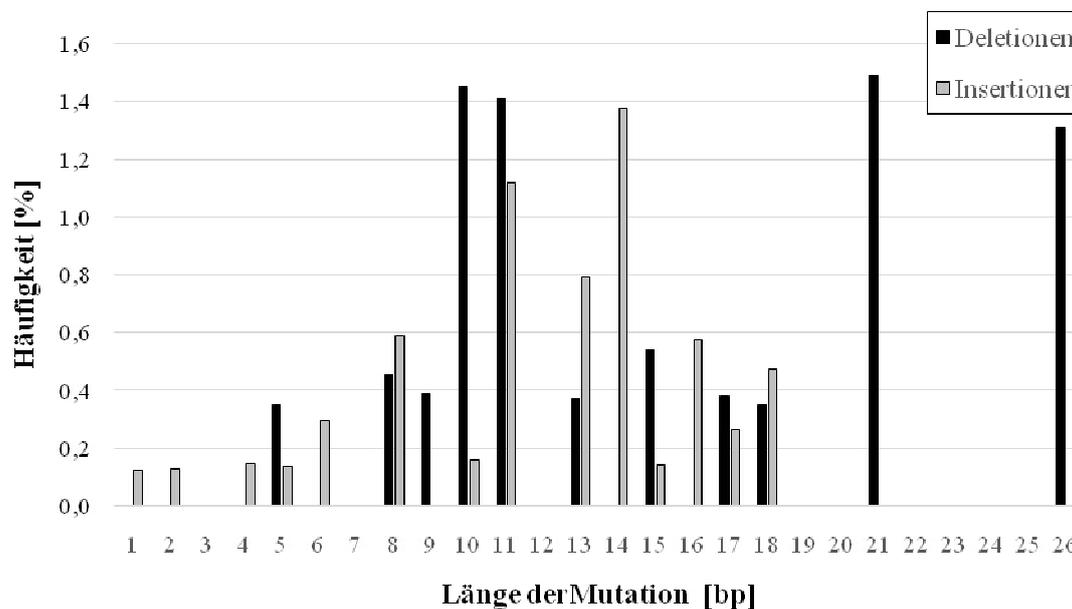


**Abbildung 62: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCMIo2 Bindestelle der Probe CC2C 2.3.**  
wt: Wildtyp-Bande; die Pfeile markieren prägnante Banden abweichender Größe zur wt Bande.

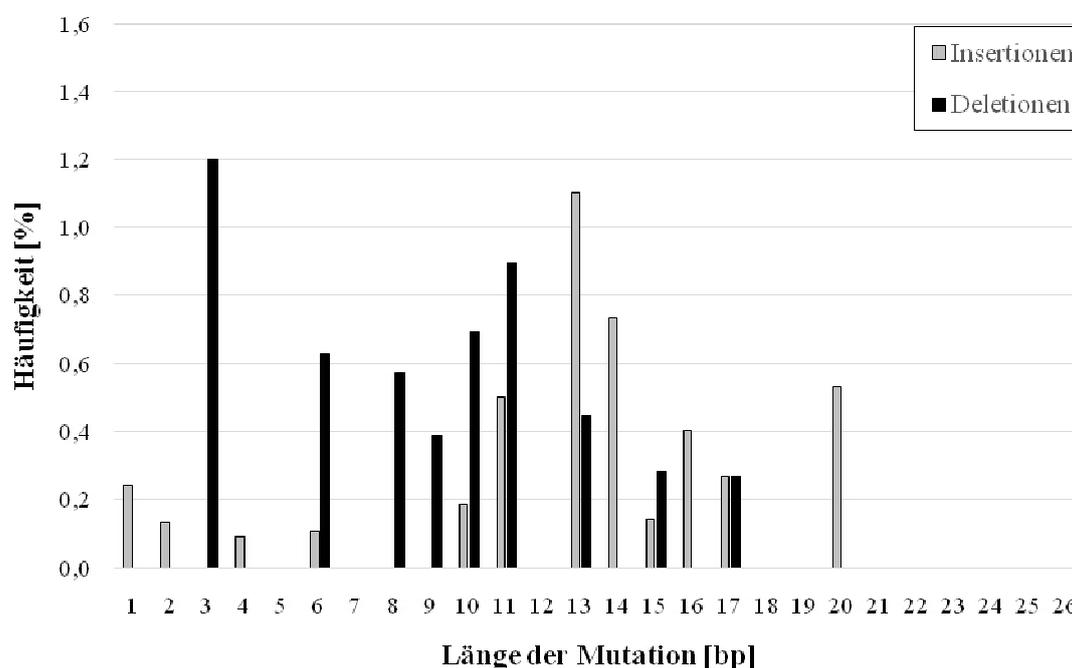
Bei der Betrachtung des Ergebnisses der PAA-Gelelektrophorese der Probe CC2C 2.3 in Abbildung 62 fiel zunächst die starke Wildtyp-Bande im Vergleich zu den zusätzlichen Banden auf. Einzelne Banden kleinerer oder größerer Fragmentewaren schwer auszumachen. Vielmehr war hier ein dunkler gefärbter Hintergrund der Probe erkennbar, was auf die diversen InDels unterschiedlicher Größen zurückzuführen ist. Dies steht mit den niedrigen detektierten Frequenzen der Deletionen und Insertionen dieser Probe im Einklang. Zwei Banden oberhalb der wt Bande traten etwas stärker in den Vordergrund (mit Pfeilen markiert). Eine Zuordnung zu den detektierten Insertionen der Amplikon-Sequenzierung fiel trotzdem schwer. Die obere Bande könnte der 13 bp Insertion entsprechen. Bei den Banden unterhalb der wt Bande konnten auch zwei Banden etwas deutlicher ausgemacht werden (mit Pfeilen in Abbildung 62 markiert). Auch hier fiel die Zuordnung zu den Deletionen der Amplikon-Sequenzierung aufgrund der Schwäche der Banden schwer. Die größere der beiden könnte zumindest der 3 bp Deletion entsprechen.

Um eine Übersicht über die festgestellte Dynamik im Auftreten der InDels zu erhalten, sind in den nachfolgenden Abbildungen die detektierten Insertionen und Deletionen der beiden Pro-

ben CC2C 2 (Abbildung 63) und CC2C 2.3 (Abbildung 64) anhand der Häufigkeit ihres Vorkommens in der jeweiligen Probe der Größe nach aufgetragen.



**Abbildung 63: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Deletionen und Insertionen der Probe CC2C 2.** Aufgetragen sind die Häufigkeiten der detektierten Varianten im Bezug zur Gesamtzahl der mutierten Reads von CC2C 2 für *RhMLO2*.



**Abbildung 64: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Deletionen und Insertionen der Probe CC2C 2.3.** Aufgetragen sind die Häufigkeiten der detektierten Varianten im Bezug zur Gesamtzahl der mutierten Reads von CC2C 2.3 für *RhMLO2*.

Die Abbildungen veranschaulichen die Verteilung der InDels in den beiden Proben CC2C 2 (Abbildung 63) und CC2C 2.3 (Abbildung 64). Bei beiden Proben lag eine Akkumulation an InDels in einem Bereich von 8 bp bis 18 bp vor, wobei bei beiden die engere Region um 11

bp und 13 bp am stärksten vertreten war. Interessanterweise konnte in keiner der beiden Proben ein InDel von 12 bp detektiert werden. Die stark vertretenen Deletionen von 21 bp und 26 bp der Probe CC2C 2 waren bei CC2C 2.3 nicht mehr vorhanden, dafür hier eine häufig vorkommende 3 bp Deletion. Allgemein scheint das Vorkommen und die Häufigkeit der vertretenen InDels zwischen den beiden Proben tendenziell ähnlich zu sein, in der genauen Beschaffenheit aber sehr dynamisch.

#### **3.3.4.2.2 Auswertung der Amplikons der Probe von Linie CC2G**

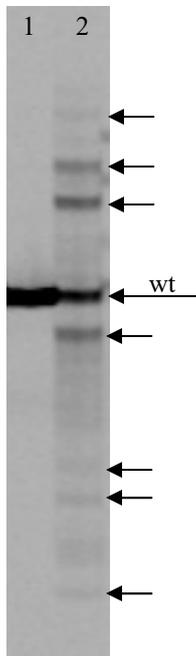
Neben den beiden Proben der Kaskade von CC2C erwies sich die Linie CC2G bei der PAA-Gelelektrophorese als solche mit interessantem Bandenmuster. Insbesondere die Probe der Linie, die acht Monate auf Regenerationsmedium benötigte bis ein Spross zur Vermehrung entnommen werden konnte (kurz: 8x). Diese wurde daher für die Amplikon-Sequenzierung der CRISPR/Cas-Binderegion ausgewählt. Die Analyse der Reads von CC2G 8x wurde, wie bei CC2C 2, in Sub-Pools durchgeführt. Der Sub-Pool mit Sequenzen gleicher Länge ergab keine Varianten abweichend zur Kontrolle oberhalb von 1,0 %. Die detaillierte Auflistung der detektierten Varianten der beiden anderen Sub-Pools kann dem Anhang A.9 entnommen werden. Die InDels gleicher Länge zusammengefasst, einschließlich der Frequenz ihres Vorkommens im Gesamtpool, sind in der nachfolgenden Tabelle 58 aufgeführt.

**Tabelle 58: Detektierte Varianten gleicher Länge der Probe CC2G 8x.**

Typ	Länge [bp]	Frequenz
Deletion	1	9,17
Deletion	2	2,38
Deletion	3	2,35
Deletion	5	8,37
Deletion	6	2,37
Deletion	8	0,75
Deletion	9	1,77
Deletion	10	1,12
Deletion	11	1,30
Deletion	15	0,66
Deletion	18	0,60
Deletion	20	0,86
Deletion	21	0,72
Deletion	27	0,75
Deletion	28	0,52
Deletion	33	2,90
Insertion	2	0,79
Insertion	4	3,09
Insertion	7	1,73
Insertion	9	1,38
Insertion	12	0,36
Insertion	15	7,66
Insertion	18	0,53
Insertion	21	3,70
Insertion	23	0,43
Insertion	25	0,57
Insertion	26	0,34
Insertion	29	0,46
Insertion	33	0,56

In der Probe CC2G 8x konnten 18 verschiedene Deletionen von 1 bis 33 bp Länge detektiert werden. Zusammengefasst konnten so 16 Deletionen gleicher Länge nachgewiesen werden (Tabelle 58). Von den 15 unterschiedlichen Insertionen der Probe wiesen 13 die gleichen Längen von 2 bis 33 bp auf. Die am häufigsten vertretene Mutation ist die Deletion von einer Base (9,17 %), gefolgt von 5 bp Deletionen (8,37 %) und 15 bp (7,66 %) Insertionen. Auffällig ist, dass keine der detektierten Varianten mit einer Frequenz von unter 0,5 % im Gesamtpool detektiert wurde. Dies konnte in den beiden zuvor untersuchten Proben nicht erreicht werden. Insgesamt konnte in der Probe CC2G 8x eine Mutationsrate von 58,2% festgestellt werden, von der in 31,88 % der Fälle die Mutation zum Knock-out von *RhMLO2* durch Änderung des Leserasters führten.

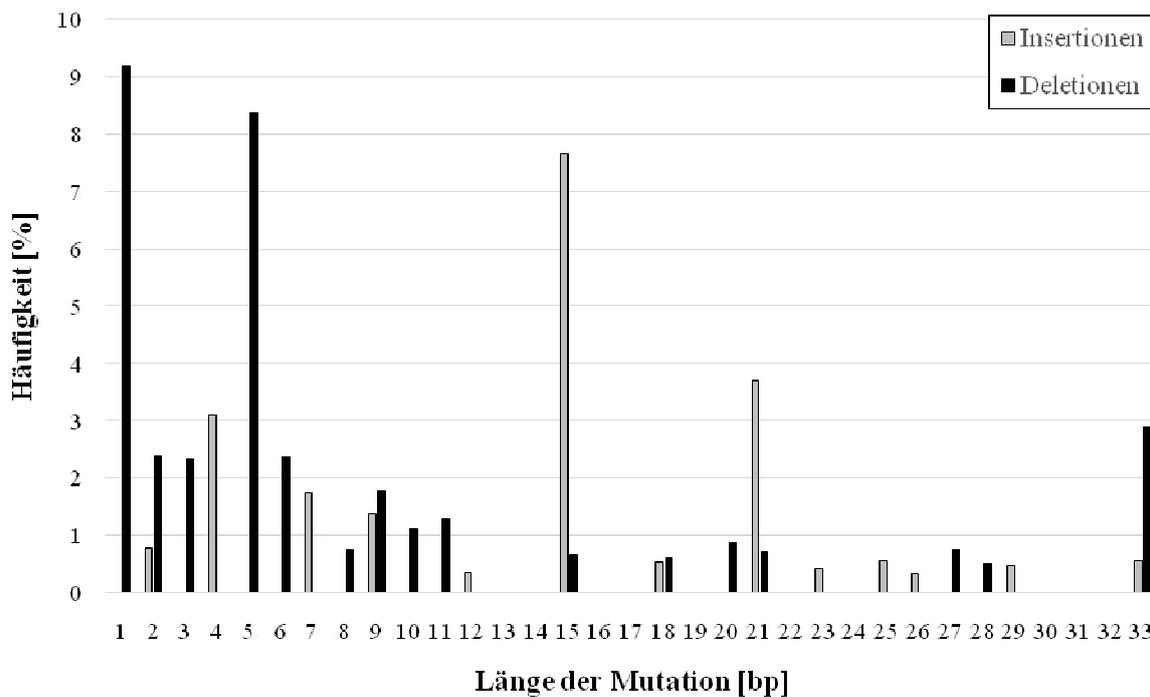
Beim Vergleich der detektierten Varianten der Amplikons-Sequenzierung mit dem Ausschnitt aus der PAA-Gelelektrophorese der Probe in Abbildung 65, fällt auf, dass eine Zuordnung der detektierten Varianten zu den Banden im Gel-Bild nicht eindeutig möglich ist.



**Abbildung 65: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCM1o2 Bindestelle der Probe CC2G 8x.** Spur 1: CC2F; Spur 2: CC2G 8x; wt: Wildtyp-Bande; die Pfeile markieren prägnante Banden abweichender Größe zur wt Bande.

Zunächst fällt in Abbildung 65 die schwächere Wildtyp-Bande der Probe CC2G 8x (Spur 2) im Vergleich zur Probe CC2F (Spur 1) auf. In der Probe CC2F konnte keine Abweichung zur Wildtyp-Kontrolle festgestellt werden, weshalb sie hier mit aufgeführt ist, um das Verhältnis der wt Bande zu verdeutlichen. Die schwächere wt Bande der Probe steht im Einklang mit der, im Verhältnis zu den anderen beiden untersuchten Proben des Konstrukts CCM1o2, hohen Mutationsrate (58,2%). Die am stärksten vertretenden Insertionen der Probe waren die 4 bp (3,09 %), 7 bp (1,73 %), 15 bp (7,66 %) und die 21 bp Insertion (3,7 %) (Tabelle 58). Deutlich erkennbar sind in Abbildung 65 oberhalb der wt Bande nur zwei Banden und schwächer eine dritte (siehe Pfeile). Bei diesen könnte es sich um die 4 bp, 7 bp und 15 bp Insertion gehandelt haben, eindeutig ist dies jedoch nicht. Hinzu kommt, dass die Abstände zwischen der wt Bande, der 4 bp und der 7 bp Insertion nicht ganz schlüssig waren und die Intensitäten der drei Banden nicht im Einklang mit den detektierten Frequenzen standen. Die am stärksten vertretenen Deletionen der Probe CC2G 8x sind die 1 bp Deletion (9,17 %), die 5 bp Deletion (8,37 %) und die 33 bp Deletion (2,9 %) (Tabelle 58). In Abbildung 65 ist unterhalb der wt Bande nur eine Bande klar erkennbar und drei weitere schwach (durch Pfeile markiert). Berücksichtigt man die detektierten Intensitäten, könnte sowohl die 1 bp als auch die 5 bp De-

letion die stärkere Bande repräsentiert haben. Für die 1 bp Deletion war die Bande jedoch zu klein und für die 5 bp Deletion zu groß. Sie entsprach vom Abstand zur wt Bande eher der 3 bp Deletion. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Frequenzen aus Tabelle 58 nur schwerlich mit dem Bandenmuster aus Abbildung 65 in Einklang zu bringen sind. Zur besseren Darstellung der Verteilung der detektierten InDels aus Tabelle 58, sind diese in Abbildung 66 mit ihren jeweiligen Frequenzen graphisch dargestellt.



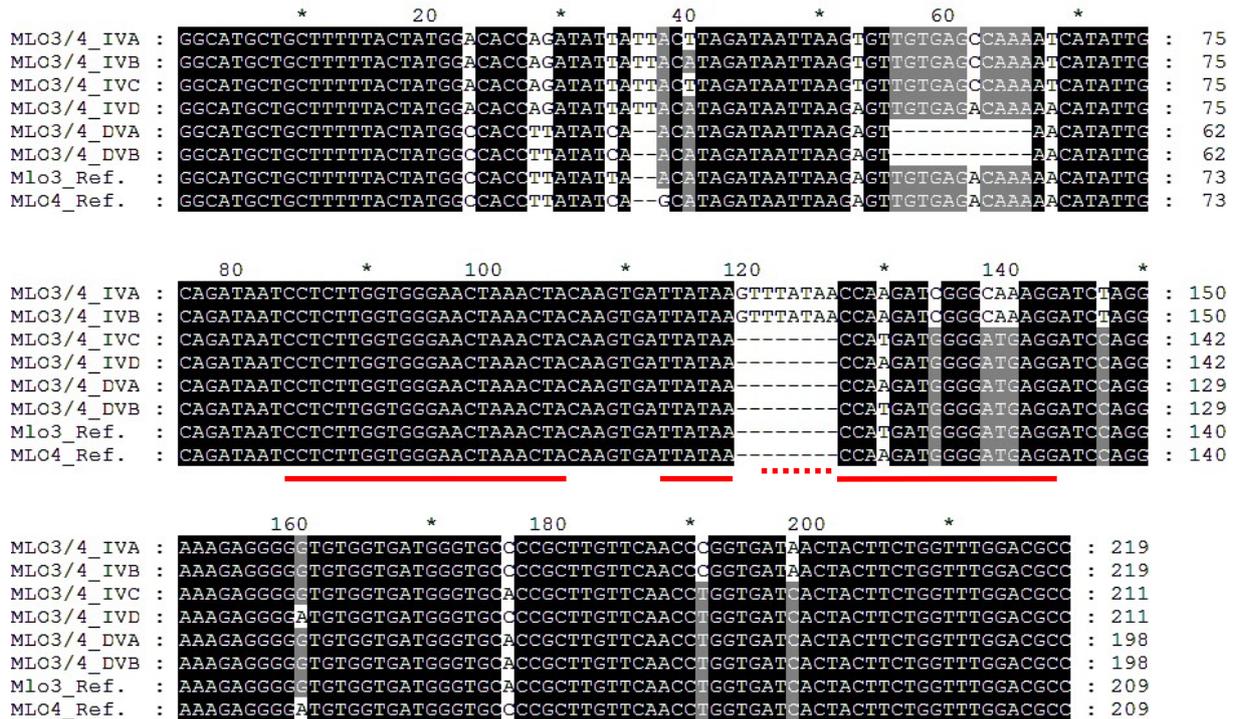
**Abbildung 66: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Deletionen und Insertionen der Probe CC2G 8x.** Aufgetragen sind die Häufigkeiten der detektierten Varianten im Bezug zur Gesamtzahl der mutierten Reads von CC2G8x für *RhMLO2*.

Aus Abbildung 66 wird die Verteilung der detektierten Varianten von CC2G 8x deutlich. Es lag eine Akkumulation von InDels um 5 bp vor. Die das Auftreten von Mutationen fiel, bis auf einige Ausnahmen, zu beiden Seiten davon ab. Zwei stark vertretene Insertionen von 15 bp und 21 bp sowie die Deletionen von 1 bp und 33 bp fielen aus diesem Muster heraus. Tendenziell liegt jedoch eine Präferenz auf der Bildung kleinerer InDels, wenn auch die Bandbreite bis hin zu 33 bp relativ gleichmäßig abgedeckt ist.

### 3.3.4.3 Auswertung der Amplikons der Linien von CCMlo3/4

Bei den Analysen mittels PAA-Gelelektrophoreseder Linien mit dem Konstrukt von CCMlo3/4 fiel auf, dass die bei den anderen Konstrukten typische Wildtyp-Bande als Doppelbande im Gelbild auftrat (vergl. Kapitel 3.3.3.3). Bei der Analyse des 'Pariser Charme' Kontroll-Pools für *RhMLO3* und *RhMLO4* fielen Unterschiede in den Sequenzen auf, die in den

vor der Amplikon-Sequenzierung untersuchten Proben nicht detektiert wurden. So konnte eine 8 bp Insertion (TTATAAGT an Position 110<sup>^</sup>111) mit 1,52 %, eine 2 bp Insertion (TT an Position 35<sup>^</sup>36) mit 1,02 % und eine 11 bp Deletion (TGTGAGACAAA an Position 54-65) mit 10,18 % in den Reads detektiert werden. Die 8 bp Insertion trat immer gemeinsam mit der 2 bp Insertion auf, umgekehrt war dies jedoch nicht der Fall. Die 8 bp Insertion ist im Exon lokalisiert und dies auch direkt in der Bindestelle des CRISPR/Cas Konstrukts zum 3'-Ende. Die Sequenz der Insertion ist dabei identisch zu der direkt davor befindlichen Sequenz (Duplikation), wodurch die Binderegion von CCMlo3/4, selbst wenn es sich um eine reale Variante handeln würde, nicht beeinträchtigt wäre (siehe Abbildung 67). Die 2 bp Insertion und die 11 bp Deletion liegen hingegen in der Intron-Sequenz und somit außerhalb der CRISPR/Cas-Bindestelle. Unter Berücksichtigung der sehr niedrigen Frequenz der 8 bp (1,52 %) und 2 bp Insertion (1,02 %), die nur knapp über der gesetzten Schwelle der Fehlerrate von 1,0 % lagen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei beiden um Fehler in der PCR-Amplifikation oder Sequenzierung handelte. Da beide Varianten jedoch in allen analysierten Proben von *RhMLO3/4* auftraten, scheint es sich hier um ein strukturelles Problem basierend auf der Sequenz zu handeln. Die 11 bp Deletion im Intron kam hingegen mit 10,18 % deutlich häufiger vor und konnte auch als diskrete zweite und kleinere Wildtyp-Bande in der PAA-Gelelektrophorese detektiert werden. Bei der Sequenzierung der Amplikons von *RhMLO3* und *RhMLO4* wurden alle acht Allele der beiden Gene abgedeckt, so dass jedes Allel – rein rechnerisch – mit 12,5 % an Reads vorlag. Dies spricht dafür, dass es sich bei der 11 bp Deletion um eine allelische Besonderheit eines der acht Allele handelt, welche jedoch keinen Einfluss auf die Analysen der durch CRISPR/Cas induzierten Mutationen hatte. In der nachfolgenden Abbildung sind die detektierten Varianten im Vergleich zu den Referenz-Sequenzen von *RhMLO3* und *RhMLO4* abgebildet.



**Abbildung 67: Detektierte Varianten in der Kontrollprobe von *RhMLO3* und *RhMLO4*.**

Aufgeführt sind die in der Amplikon-Sequenz detektierten Varianten von *RhMLO3/4*. IV: Insertionsvariante A bis D, DV: Deletionsvariante A und B, Ref.: Referenz-Sequenz; die schwarz hinterlegten Bereiche weisen 100% Übereinstimmung auf, die grau hinterlegte 80 % und die weiß hinterlegten Bereiche der Sequenz weniger als 60 % Übereinstimmung; der rote Balken markiert in durchgezogener Linie die CRISPR/Cas Binderegionen von CCmlo3/4 und gestrichelt die alternative Bindestelle der Insertionsvariante.

Aus Abbildung 67 wird die hohe Sequenzübereinstimmung der detektierten Varianten mit den Referenz-Sequenzen deutlich. Hieraus lässt sich schließen, dass die 11 bp Deletionsvariante ein Allel von *RhMLO3* oder *RhMLO4* darstellt. Zu welchem Gen und Allel genau die Variante zuzuordnen ist, lässt sich ob der Kürze der Amplikon-Sequenzen nicht bestimmen.

### 3.3.4.3.1 Auswertung der Amplikons der Kaskade von CC3/4A

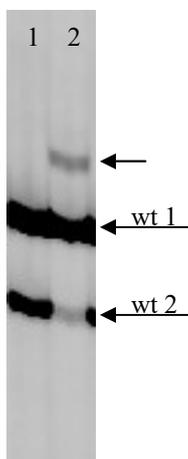
Die Probe CC3/4A 2 stellte einen der Startpunkte der Kaskade der Linie CC3/4A dar und wies in der PAA-Gelelektrophorese eine zusätzliche Bande zu den wt Banden sowie eine schwächere Wildtyp-Bande auf. Die Analyse der Amplikons dieser Probe erfolgte, wie bereits beschrieben, durch Unterteilung des Gesamt-Pools in Sub-Pools. Sowohl im Pool mit Reads gleicher Länge zur Referenz-Sequenz als auch im Pool der kürzeren Sequenzen konnten keine Varianten oberhalb von 1,0 % detektiert werden. Die detektierten Varianten des Sub-Pools mit längeren Sequenzen im Vergleich zur Referenz-Sequenz sind, samt ihrer Position in der Amplikon-Sequenz, Tabelle 59 zu entnehmen.

**Tabelle 59: Detektierte Varianten der Probe CC3/4A 2.**

Position	Typ	Länge [bp]	Insertions-Sequenz	Frequenz (Sub-Pool)	Frequenz (gesamt)
104^105	Insertion	6	AAGTGA	1,05	0,31
116^117	Insertion	5	CAAGT	1,94	0,57
116^117	Insertion	12	CCAAGATGTAGT	28,27	8,32
116^117	Insertion	25	CCATGGTGGGAACTAAACTAC AAGT	1,47	0,43

Insgesamt konnten vier unterschiedliche Insertionen in der Probe CC3/4A 2 detektiert werden (Tabelle 59). Mit Abstand am häufigsten lag die 12 bp Insertion mit 8,32 % Frequenz im Gesamt-Pool der Reads vor. Lediglich die 5 bp Insertion konnte noch mit über 0,5 % im Gesamt-Pool detektiert werden. Insgesamt konnte so eine Mutationsrate von 9,64% in der Probe CC3/4A 2 festgestellt werden. Da die am häufigsten vertretene Insertion der Probe mit 12 bp nicht zu einer Verschiebung des Leserasters führte, sondern lediglich zur Insertion von vier zusätzlichen Aminosäuren, führten nur 1,0 % der in dieser Probe detektierten Varianten zu einem Knock-out des entsprechenden Gens.

In Abbildung 68 ist das Ergebnis der PAA-Gelelektrophorese der Probe CC3/4A 2 aufgeführt. Zum Vergleich ist hier zusätzlich die Probe CC3/4A 1 der Kaskade abgebildet, welche keine Veränderungen zum Wildtyp aufwies.



**Abbildung 68: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCMIo3/4 Bindestelle der Probe CC3/4A 2.**

Spur 1: CC3/4A 1; Spur 2: CC3/4A 2; wt 1: größere Wildtyp-Bande; wt 2: kleinere Wildtyp-Bande; der Pfeil markiert die von der wt Banden abweichende, zusätzliche Bande.

Aus Abbildung 68 wird deutlich, dass die kleinere der beiden wt Banden (wt 2) in der Probe CC3/4A 2 (Spur 2) deutlich schwächer vertreten war, als in der Probe CC3/4A 1 (Spur 1). Diese Bande spiegelte die 11 bp Deletion, welche in den Wildtyp-Sequenzen detektiert wurde, wider. Auch kann aus Spur 1 der Abbildung 68 entnommen werden, dass die wt 2 Bande im Wildtyp schwächer ausgeprägt ist, als die wt 1 Bande. Dies entspricht der Beobachtung,

dass die Deletion nur mit circa 12,5 % im Wildtyp vorliegt (siehe oben). Durch das Auftreten von Insertionen in der Probe wurde der Anteil an Sequenzen, welche 11 bp kürzer waren als die restlichen, geringer. Das Vorliegender Insertion von 12 bp mit einer Frequenz von 8,32 % erklärte somit die geringere Intensität der unteren wt Bande sowie das Auftreten der zusätzlichen größeren Bande oberhalb der ersten wt Bande (mit Pfeil markiert). Die drei weiteren Insertionen (5 bp, 6 bp und 25 bp) waren nur mit insgesamt 1,31 % in den Reads der Probe vertreten und konnten nicht in der PAA-Gelelektrophorese detektiert werden.

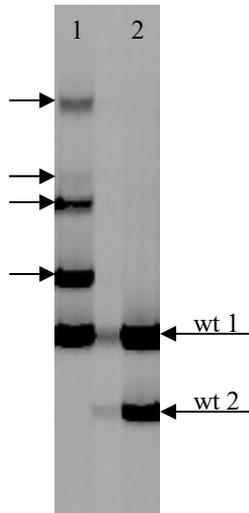
Die Probe CC3/4A 2.2.2 stellte eine Probe zum Ende der Kaskade der Linie CC3/4A dar, welche ein deutlich abweichendes Bandenmuster in der PAA-Gelelektrophorese zur Wildtyp-Kontrolle aufwies. Die Analyse der Sub-Pools der Probe ergab keine abweichenden Varianten zur Kontrolle im Sub-Pool mit Sequenzen gleicher Länge. Die detektierten Varianten der beiden Sub-Pools mit Sequenzen unterschiedlicher Länge zur Referenz sind vollständig in Tabelle 60 aufgeführt.

**Tabelle 60: Detektierte Varianten der Probe CC3/4A 2.2.2.**

Position	Typ	Länge [bp]	Insertions-/Referenz-Sequenz	Frequenz (Sub-Pool)	Frequenz (gesamt)
90	Deletion	1	T	8,97	4,86
108-119	Deletion	12	TGATTATAACCA	1,99	0,26
86^87	Insertion	36	TGGTGGGAAGTAACTACA AGTGATTATAACCATGA	9,12	4,76
98^99	Insertion	20	AACTACAAGTGATTATAACC	17,16	8,96
99^100	Insertion	24	ACTACAAGTGATTATAACCAT GAT	1,42	0,74
105^106	Insertion	20	AGTGATTATAACCAAGATGT	32,59	17,02

Die detektierte 12 bp Deletion (0,26 % im Gesamt-Pool) konnte zu Beginn der Kaskade bei der Analyse der Probe CC3/4A 2 nicht festgestellt werden. Durch Herabsetzung des Schwellenwertes auf 0,5 % konnte diese 12 bp Deletion allerdings auch schon im Sub-Pool zu Beginn der Kaskade mit einer Frequenz von 0,67 % detektiert werden (0,13 % im Gesamtpool, Daten nicht aufgeführt). Die 1 bp Deletion lag mit 4,86 % im Gesamt-Pool wesentlich häufiger vor, konnte aber nicht in der Probe zu Beginn der Kaskade detektiert werden. Insgesamt konnten vier verschiedene Insertionen detektiert werden (Tabelle 60). Am häufigsten trat die 20 bp Insertion mit 17,02 % auf, gefolgt von der 20 bp Insertion mit 8,96 %. Damit lagen 20 bp Insertionen in 25,98 % aller Reads der Probe CC3/4A 2.2.2 vor. Insgesamt wurde in der Probe CC3/4A 2.2.2 in 36,29% der Reads eine Mutation in Form von InDels detektiert. Zu Beginn der Kaskade in Probe CC3/4A 2 konnte nur in 9,64% der Reads

eine Mutation detektiert werden. Das entspricht einem Zuwachs von 26,65 % über die drei Vermehrungsstufen der Kaskade. Lediglich die 12 bp Deletion und die 36 bp Insertion führten nicht zu einer Verschiebung des Leserasters, womit 30,84 % der InDels zum Knock-out des entsprechenden Gens führten. Zum Vergleich der detektierten Varianten mit denen der PAA-Gelelektrophorese der Probe CC3/4A 2.2.2, ist letztere in Abbildung 69 dargestellt.



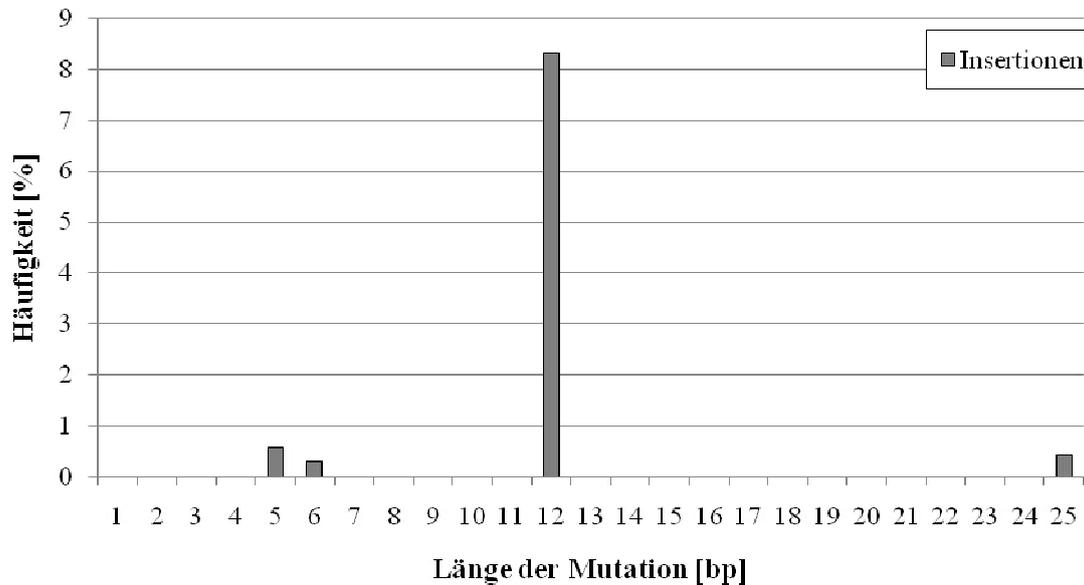
**Abbildung 69: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCMIo3/4 Bindestelle der Probe CC3/4A 2.2.2.**

Spur 1: Probe CC3/4A 2.2.2; Spur 2: Probe CC3/4A 2.3.1; wt 1: größere der Wildtyp-Banden; wt 2: kleinere der Wildtyp-Banden; Pfeile markieren Banden abweichender Größe zu den wt Banden.

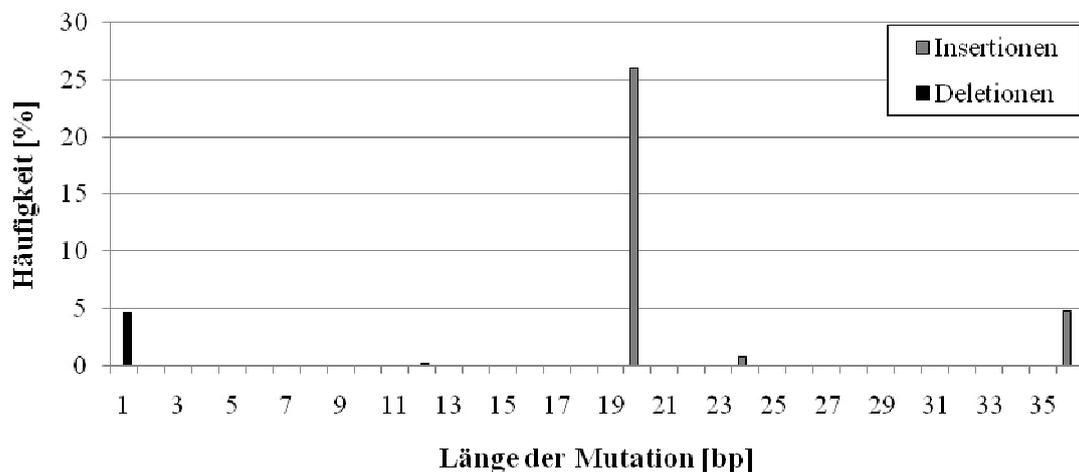
In Abbildung 69 ist neben der Probe CC3/4A 2.2.2 in Spur 1 noch die Probe CC3/4A 2.3.1 (Spur 2) aufgeführt, welche keine Veränderungen im Bandenmuster zur Wildtyp-Kontrolle aufwies. Beim Vergleich der beiden Proben fallen zunächst die vier zusätzlichen Banden in Probe CC3/4A 2.2.2 auf (durch Pfeile markiert) sowie die Abwesenheit der wt 2 Bande in ebendieser Probe. Mittels Amplikon-Sequenzierung konnte in 25,98 % der Reads der Probe eine 20 bp Insertion detektiert werden. Das Vorkommen dieser Insertion erklärt sowohl die Abwesenheit der kleineren wt Bande, da der Anteil der Reads dieser Größe stark reduziert wurde, als auch die erste und zweite Bande oberhalb der wt 1 Bande. Die erste Bande oberhalb der wt 1 Bande hatte eine Größe von ungefähr 9 bp oberhalb von wt 1, die sich aus der Differenz der 11 bp Deletion der wt 2 Bande und der 20 bp Insertion ergab. Die zweite zusätzliche Bande entsprach den 20 bp Insertionen, da neben den 11 bp Deletions-Sequenzen auch solche ohne die Deletion eine 20 bp Insertion trugen. Die schwache Bande oberhalb dieser entsprach den 24 bp Insertionen, die mit 0,74 % in den Reads detektiert werden konnten. Die oberste der zusätzlichen Banden entsprach den Fragmenten, welche die 36 bp Insertion trugen. Die 12 bp Deletion, welche mit 0,26 % detektiert wurde, konnte in Abbildung 69 nicht festgestellt werden. Interessanterweise konnte auch die 1 bp Deletion, welche mit 4,86 % im Gesamtpool detektiert wurde, nicht in der PAA-Gelelektrophorese

beobachtet werden. Allerdings war die wt 1 Bande stark ausgeprägt, so dass eine kleinere Bande von dieser überdeckt hätte sein können.

Zur Veranschaulichung der Dynamik und Veränderungen der InDels über die Kaskade sind in den nachfolgenden Abbildungen die detektierten Mutationen der Proben CC3/4A 2 und CC3/4A 2.2.2 anhand ihrer Häufigkeit aufgetragen.



**Abbildung 70: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der detektierten Insertionen der Probe CC3/4A 2.** Aufgetragen sind die Häufigkeiten der detektierten Varianten im Bezug zur Gesamtzahl der mutierten Reads von CC3/4A 2 für *RhMLO3* und *RhMLO4*.



**Abbildung 71: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der detektierten Insertionen und Deletionen der Probe CC3/4A 2.2.2.**

Aufgetragen sind die Häufigkeiten der detektierten Varianten im Bezug zur Gesamtzahl der mutierten Reads von CC3/4A 2.2.2 für *RhMLO3* und *RhMLO4*.

Beim Vergleich der beiden Abbildungen fällt besonders ins Auge, dass in den Proben der Linie CC3/4A die Variation an detektierten Mutationen wesentlich geringer ist, als in den Proben mit dem Konstrukt CCMLo2 aus dem vorherigen Kapitel. Bei jeder der hier beschriebenen

Proben konnte jeweils eine Hauptmutation in Form einer 12 bp (CC3/4A 2) und einer 20 bp (CC3/4A 2.2.2) Insertion detektiert werden. Deletionen kommen nur in der Probe zum Ende der Kaskade oberhalb des Schwellenwertes von 1,0 % vor und sind damit wesentlich weniger als Insertionen in den Proben vertreten. Auffällig ist auch, dass die beiden Hauptmutationen jeweils nicht in der anderen Probe detektiert werden konnten und auch die weiteren Varianten geringerer Frequenzen jeweils nur in einer der beiden Probe vorkommend sind.

### 3.3.4.3.2 Auswertung der Amplikons der Probe von Linie CC3/4E

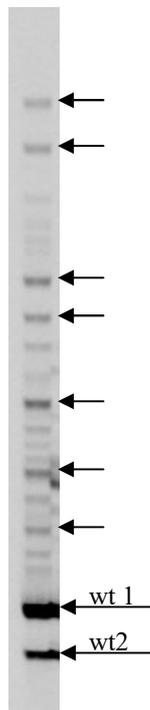
Bei der PAA-Gelelektrophorese der Linien die das Konstrukt CCMlo3/4 trugen, fiel die Probe der Klons von Linie CC3/4E auf, welcher fünf Monate auf Regenerationsmedium benötigte (kurz: 5x). Diese Probe wies ein sehr komplexes Muster an zusätzlichen Banden auf, was sie für die Analyse mittels Amplikon-Sequenzierung interessant machte. Zur Analyse der sequenzierten Amplikons wurden, wie schon beschrieben, Sub-Pools der Reads erstellt, in denen insgesamt eine Deletion von 1 bp und 13 unterschiedliche Insertionen von 5 bis 47 bp detektiert werden konnten (12 von gleicher Länge). Die Varianten gleicher Länge sind mit ihren Frequenzen im Gesamt-Pool der Probe in Tabelle 61 aufgeführt.

**Tabelle 61: Detektierte Varianten gleicher Länge der Probe CC3/4E 5x.**

Typ	Länge [bp]	Frequenz
Deletion	1	0,25
Insertion	5	0,32
Insertion	6	3,91
Insertion	11	3,11
Insertion	14	2,51
Insertion	15	0,45
Insertion	22	0,69
Insertion	26	0,71
Insertion	28	0,89
Insertion	35	1,13
Insertion	36	0,79
Insertion	43	0,53
Insertion	47	0,62

Die 6 bp Insertion lag mit 3,91 % am häufigsten in den Reads vor, gefolgt von der 11 bp Insertion (3,11 %), den beiden 14 bp Insertionen (insgesamt 2,51 %) und der 35 bp Insertion (1,13 %) (Tabelle 61). Alle weiteren Insertionen, wie auch die 1 bp Deletion, kamen nur mit Frequenzen unterhalb von 1,0% im Gesamtpool vor. Insgesamt ergab dies für die Probe CC3/4E 5x eine Mutationsrate von 15,9 %, von denen 10,76 % zu einer Veränderung des Leserasters und somit zum Knock-out des Gens führten. Zum Vergleich der beiden Metho-

den zur Variantendetektion, ist das Ergebnis der PAA-Gelelektrophorese der hier beschriebenen Probe CC3/4E 5x in Abbildung 72 aufgeführt.

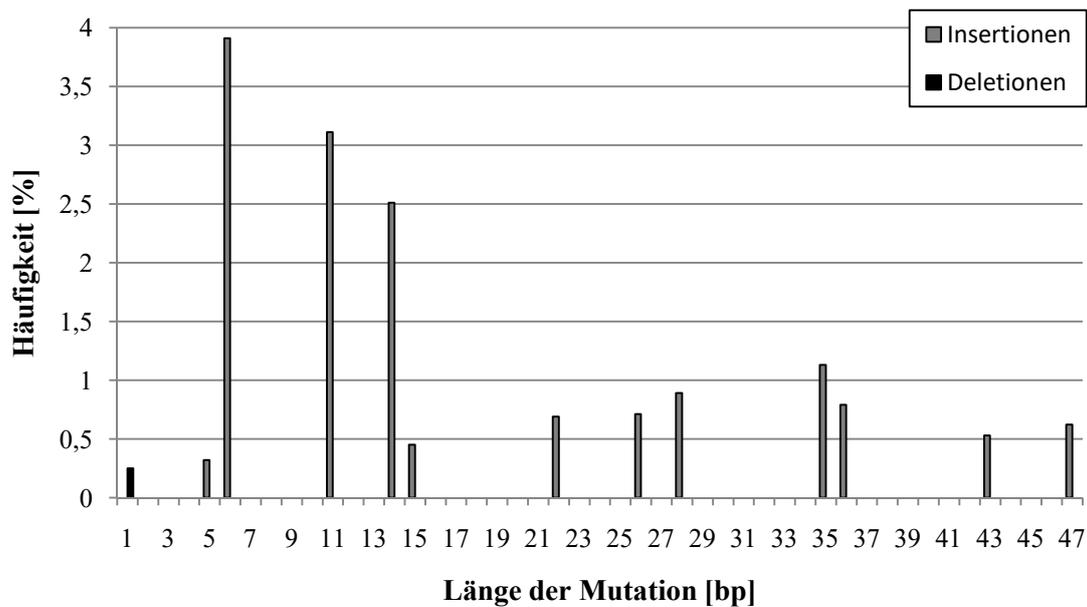


**Abbildung 72: PAA-Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten CCMIo3/4 Bindestelle der Probe CC3/4E 5x.**

wt 1: größere der Wildtyp-Banden; wt 2: kleinere der Wildtyp-Banden; Pfeile markieren markante Banden abweichender Größe zu den wt Banden.

Im Bandenmuster der PAA-Gelelektrophorese waren deutlich die beiden Wildtyp-Banden (wt 1 und wt 2) zu erkennen (Abbildung 72). Zusätzlich konnte eine Vielzahl von Banden oberhalb dieser detektiert werden, nicht jedoch unterhalb. Insgesamt konnten rund 17 zusätzliche Banden beobachtet werden, von denen sieben deutlicher hervortraten (mit Pfeilen markiert). In der Amplikon-Sequenzierung konnten nur 13 unterschiedliche Mutationen gleicher Länge oberhalb von 1,0 % Frequenz in den Sub-Pools detektiert werden. Somit konnten in der PAA-Gelelektrophorese mehr Varianten als mit der Amplikon-Sequenzierung detektiert werden. Des Weiteren war die größte detektierte Insertion der Amplikons 47 bp lang, die größte Bande im Gelbild aus Abbildung 72 war jedoch um 100 bp größer als die wt 1 Bande. Dies lässt vermuten, dass der Teil an Insertionen, welcher größer als 47 bp groß war, nicht mit der Amplikon-Sequenzierung erfasst werden konnte. Eine klare Zuordnung der detektierten Mutationen der Amplikon-Sequenzierung zu den zusätzlichen Banden der PAA-Gelelektrophorese der Probe war nur schwer möglich, was auch an den niedrigen Frequenzen, mit denen die Varianten detektiert worden sind, gelegen haben kann.

Zur Übersicht über die detektierten Mutationen, sind diese in Abbildung 73 anhand der Häufigkeit des Auftretens in der Probe CC3/4E 5x aufgetragen.



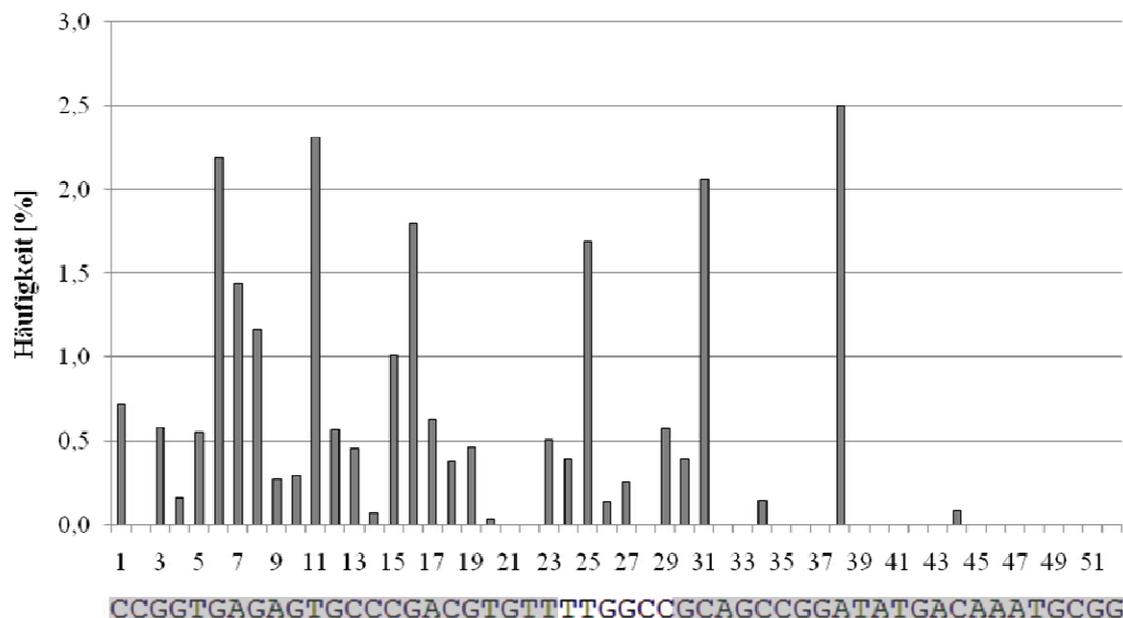
**Abbildung 73: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der detektierten Insertionen und Deletionen der Probe CC3/4E 5x.**

Aufgetragen sind die Häufigkeiten der detektierten Varianten im Bezug zur Gesamtzahl der mutierten Reads von CC3/E 5x für *RhMLO3* und *RhMLO4*.

Auffällig in Abbildung 73 ist die Akkumulation an höheren Frequenzen bei Insertionen von 6 bp, 11 bp und 14 bp Länge. Die übrigen Insertionen schwanken um einen Wert von ungefähr 0,5 %, mit einer kleinen Akkumulation leicht erhöhter Frequenzen um die 35 bp Insertion. Die einzige detektierte Deletion von 1 bp Länge bleibt mit 0,25 % Häufigkeit in den Reads unterhalb der Frequenzen aller detektierten Insertionen.

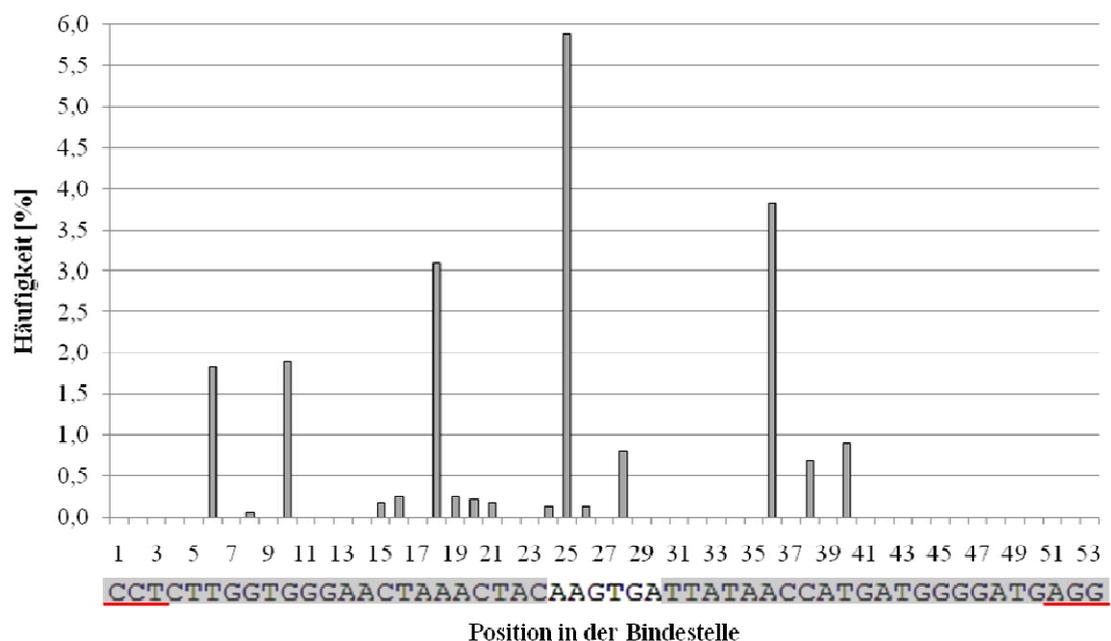
#### 3.3.4.4 Analyse der Positionen der gesetzten Mutationen

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Varianten der CRISPR/Cas Linien umfassen ein großes Spektrum an Insertionen und Deletionen, welche durch den induzierten Doppelstrangbruch in der DNA-Sequenz verursacht wurden. In den nachfolgenden Abbildungen sind die Startpunkte (vom 5'Ende aus) aller detektierten Insertionen und Deletionen der Linien von CCMlo2 und CCMlo3/4 innerhalb der Bindestellen der Konstrukte abgebildet. Hierzu wurden für jede Position die Anzahl der Reads, die dieser in der Variantendetektion zugeordnet wurden, addiert und deren Anteil an der Gesamtzahl der Reads über alle Proben des jeweiligen Konstrukts hinweg berechnet.



**Abbildung 74: Position der gesetzten Mutationen von CCMLo2 in der Bindestelle.**

Aufgetragen ist der Anteil aller Reads mit Varianten (InDels) an derselben Startposition in der Bindestelle des CRISPR/Cas Konstrukts CCMLo2 und die Häufigkeit des Vorkommens im Bezug zur Gesamtzahl aller analysierten Reads. Die Sequenz unter der X-Achse bildet die Zielsequenz des Konstrukts ab, die grau hinterlegten Bereiche die *Protospacer* und die roten Balken jeweils die PAM-Sequenz.



**Abbildung 75: Position der gesetzten Mutationen von CCMLo3/4 in der Bindestelle.**

Aufgetragen ist der Anteil aller Reads mit Varianten (InDels) an derselben Startposition in der Bindestelle des CRISPR/Cas Konstrukts CCMLo3/4 und die Häufigkeit des Vorkommens im Bezug zur Gesamtzahl aller analysierten Reads. Die Sequenz unter der X-Achse bildet die Zielsequenz des Konstrukts ab, die grau hinterlegten Bereiche die *Protospacer* und die roten Balken jeweils die PAM-Sequenz.

Beim Vergleich der beiden Abbildungen fällt auf, dass bei den untersuchten Proben mit dem Konstrukt CCMLo2 eine Vielzahl unterschiedlichster Startpunkte (vom 5'Ende) bei den detektierten Varianten vorkamen (Abbildung 74). Von Position 1 bis 20 in der Bindestelle befand sich an jeder Position (außer Position 2) ein Startpunkt für InDels. Dabei konnten sechs Peaks

identifiziert werden, die sich an den Positionen 6, 11, 26, 25, 31 und 38 befanden (Abbildung 74). Um diese herum flachten die Häufigkeiten der Startpunkte ab. Eine Ausnahme war hier der Peak bei Position 38, der nur bei den Positionen 34 und 44 die nächsten Startpunkte mit geringeren Häufigkeiten in der Umgebung aufwies. Drei der sechs Peaks, und somit der überwiegende Teil, befand sich in der 5'-Bindestelle des Konstrukts, einige Basen nach der PAM-Sequenz.

Die Abbildung der Startpunkte für InDels in der Bindestelle von CCMlo3/4 in Abbildung 75 ist überschaubarer als die von CCMlo2. Hier konnten fünf Peaks ausgemacht werden (Position 6, 10, 18, 25 und 36). Andere Startpunkte neben diesen waren seltener und kamen nur mit niedriger Frequenz vor. Am stärksten vertreten, mit über 5,5 %, war der Peak an Position 25, gefolgt von denen an Position 36 und 18. Auch hier konnten drei Peaks in der 5'-Bindestelle festgestellt werden und nur einer in der 3'-Bindestelle. Der am stärksten vertretene Peak befand sich in der Region zwischen den beiden Erkennungsstellen des Konstrukts.

Beiden Konstrukten war gemein, dass die Mutationen verteilt zwischen den beiden Bindestellen der Nickasen vorkamen, mit einer Präferenz zur 5'-Bindestelle. Dieses kann jedoch auch der Analyse der Varianten-Detektion geschuldet sein, da diese die Varianten vom 5'-Ende der Sequenz her bestimmte. Des Weiteren war die Verteilung der Startpunkte der gesetzten Mutation bei den Proben von CCMlo2, im Vergleich zu den Proben von CCMlo3/4, wesentlich gleichmäßiger verteilt, was zu niedrigeren Frequenz der einzelnen Startpunkte führte.

Die Bindestelle von CCMlo2 in der Proteinstruktur von *RhMLO2* befindet sich im ersten extrazellulären Loop (Aminosäure 131 bis 149) zwischen dem zweiten und dritten konservierten Cystein (vergl. Kaufmann et al. 2012). Beide Cysteine waren jedoch nicht von den Mutationen betroffen. Die Bindestelle von CCMlo3/4 in der Proteinstruktur von *RhMLO3/4* befindet sich am Übergang der fünften Transmembrandomäne zum dritten cytoplasmatischen Loop (Aminosäuren 309/313 bis 326/330). Hier befindet sich ein konserviertes Motiv zwischen den *RhMLOs* und denen von *A. thaliana*, Gerste und Weizen (KLEMII, vergl. Kaufmann et al. 2012.)

### 3.3.4.5 Analyse der Insertions-Sequenzen der CRISPR/Cas Linien

In diesem Unterkapitel sollen die integrierten Sequenzen der Insertions-Varianten der CRISPR-Cas Proben näher betrachtet werden. Hierfür wurden alle detektierten Insertionen der Proben, welche größer als 2 bp waren, auf Übereinstimmungen mit der Wildtyp-Sequenz untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass es sich bei allen detektierten Insertionen um Micro-Duplikationen der *RhMLO* Sequenz handelt. In den nachfolgenden Abbildungen sind

exemplarisch die Insertions-Sequenzen der Probe CC2C 2.3 (Abbildung 76) und der Probe CC3/4E 5x (Abbildung 77) mit der jeweiligen Wildtyp-Sequenz von *RhMLO2* und *RhMLO3* aufgeführt.

	*	20	*	40	*		
wt_RhMLO2	:	CCGGT	GAGAGT	GCCCCGACGTGTTT	TGGCC	GCAGCCGGATATGACAAATGCGG	: 52
CC2C_23_1	:	-----	GTGCCCGACGTGTTTT	-----			: 16
CC2C_23_2	:	-----	TGCCCGACGTGTTTT	-----			: 14
CC2C_23_3	:	-----	GCCCCGACGTGTTTTG	-----			: 15
CC2C_23_4	:	-----	CCGACGTGTTTTGG	-----			: 14
CC2C_23_5	:	-----	CCGACGTGTTTTGGCCGCAG	-----			: 20
CC2C_23_6	:	-----	GACGTGTTTTG	-----			: 11
CC2C_23_7	:	-----	GACGTGTTTTGGCCGCA	-----			: 17
CC2C_23_8	:	-----	CGTGTTTTGG	-----			: 10
CC2C_23_9	:	-----	CGTGTTTTGGC	-----			: 11
CC2C_23_10	:	-----	CGTGTTTTGGCCG	-----			: 13
CC2C_23_11	:	-----	CGTGTTTTGGCCGCAGC	-----			: 17
CC2C_23_12	:	-----	GTGTTTTGGCCGCA	-----			: 14
CC2C_23_13	:	-----	GTTTTGGCCGCAGC	-----			: 14
CC2C_23_14	:	-----	TGGCCGCAGCCGG	-----			: 13
CC2C_23_15	:	-----	TGGCCGCAGCCGGA	-----			: 14
CC2C_23_16	:	-----	TGGCCGCAGCCGGATA	-----			: 16
CC2C_23_17	:	-----	GGCC	-----			: 4
CC2C_23_18	:	-----	GGCCGCAGCC	-----			: 10
CC2C_23_19	:	-----	GGCCGCAGCCGGA	-----			: 13
CC2C_23_20	:	-----	GCCGCA	-----			: 6

**Abbildung 76: Insertionsvarianten der Probe CC2C 2.3.**

Aufgeführt sind die 20 unterschiedlichen Insertionsvarianten (>2 bp) von CC2C 2.3, durchnummeriert von 1 bis 20. In der Wildtyp-Sequenz von *RhMLO2* (wt\_RhMLO2) sind mit grau die *Protospacer* hinterlegt und mit roten Balken die PAM-Sequenzen markiert.

Bei der Betrachtung der integrierten Sequenzen der Probe CC2C 2.3 ist auffällig, dass die Sequenzen vollständig mit der Wildtyp-Sequenz von *RhMLO2* aliniert werden konnten (Abbildung 76). Es handelte sich jeweils um Micro-Duplikationen aus der CRISPR/Cas Binderegion in Längen von 4 bis 20 bp, die sich von Position 10 bis Position 40 in der Binderegion erstreckten. Eine Tendenz zur 5'-Bindestelle ist erkennbar, welches zu den Positionen der gesetzten Mutationen aus dem vorherigen Kapitel deckend ist. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für die anderen beiden untersuchten Proben des Konstrukts CCMLo2 (Daten nicht aufgeführt).

	*	20	*	40	*	
wt_RhMl <sub>o</sub> 3	:	TAAT	<u>CCTCTTGGTGGGA</u>	ACTAACTACAAGTGATTATA	ACCATGATGGGGATGAGG	: 56
CC3/4E_1	:	-----	TGGTGGGA	ACTAACTACAAGTGATTATA	ACCATGA-----	: 36
CC3/4E_2	:	-----	GGGA	ACTAACTACAAGTGATTATA	ACCAAGATGG-----	: 35
CC3/4E_3	:	-----	CTAA	ACTACAAGTGATTATAAC-----		: 22
CC3/4E_4	:	-----	TAA	ACTACAAGTGAT-----		: 15
CC3/4E_5	:	---	TAA	ACTACAAGTGATTAA	ACTACAAGTGATT-----	: 47
CC3/4E_6	:	-----	CTA	CAAGTGATTATAACCA	AGATGGGGC-----	: 28
CC3/4E_7	:	-----	TACA	AGTGATTATAACCA	AGATGGGG-----	: 26
CC3/4E_8	:	GTGATTATA	ACCATGTGATTATA	ACCATGGTGATTATA	ACCAT-----	: 43
CC3/4E_9	:	-----		GATTATA	ACCA-----	: 11
CC3/4E_10	:	-----	A	ACTACAAGTGATT-----		: 14
CC3/4E_11	:	-----	A	AGATCAAGTGATT-----		: 14
CC3/4E_12	:	-----		A	ACCAA-----	: 6
CC3/4E_13	:	-----		A	AGATT-----	: 5

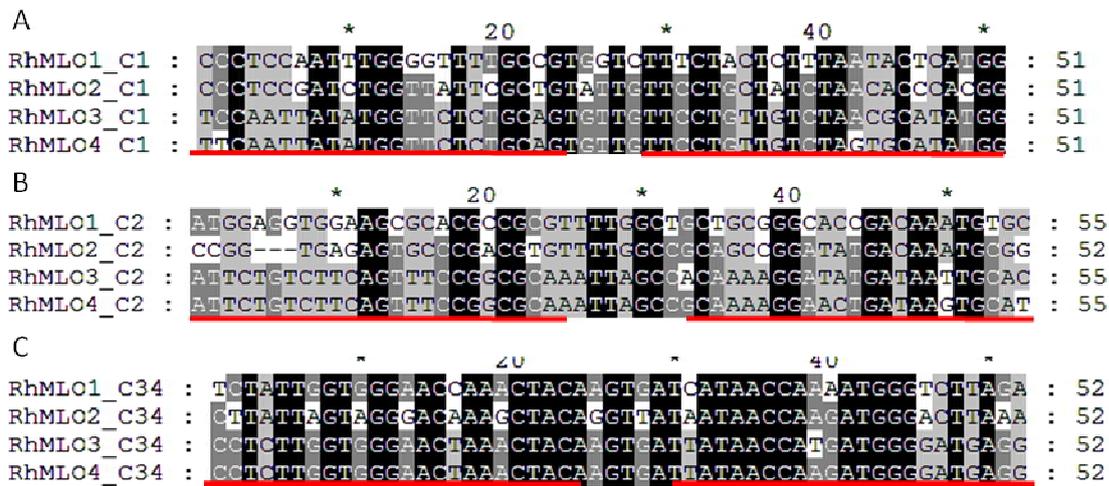
**Abbildung 77: Insertionsvarianten der Probe CC3/4E 5x.**

Aufgeführt sind die 13 unterschiedlichen Insertionsvarianten (>2 bp) von CC3/4E 5x, durchnummeriert von 1 bis 13. In der Wildtyp-Sequenz von *RhMLO3* (wt\_RhMLO3) sind mit grau *Protospacer* hinterlegt und mit roten Balken die PAM-Sequenz markiert.

Die Insertionsvarianten der Probe CC3/4E 5x wiesen Längen von 5 bp bis 47 bp auf, wobei Insertionen von unter 2 bp nicht aufgeführt sind (Abbildung 77). Dargestellt sind die Sequenzen hier nur im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz von *RhMLO3*, da die Sequenzen von *RhMLO3* und *RhMLO4* in diesem Bereich 100 % identisch sind. Die inserierten Sequenzen der Probe CC3/4E 5x alinierten nicht in allen Fällen zu 100 % mit der Wildtyp-Sequenz von *RhMLO3*, so zum Beispiel jene mit den Nummern 5 und 8. Beide Sequenzen stellten mit 47 bp (Nr.5) und 43 bp (Nr.8) die größten detektierten Insertionen in den Proben dar. Bei genauer Betrachtung der Insertionsvariante Nr. 5 wird deutlich, dass der 5'-Bereich der Sequenz bis zur Position 20 in der wt Sequenz nicht deckungsgleich war, ab Position 20 bis Position 36 alinierte und ab Position 37 wieder nicht mit der wt Sequenz übereinstimmte. Die Region bis Position 20 war jedoch deckungsgleich mit der wt Sequenz von Position 21 bis 34. Des Weiteren war die Region ab Position 37 wiederum deckungsgleich mit der wt Sequenz von Position 22 bis 35. Dieses Sequenzstück rund um die wt Sequenz 20 bis 36 wurde also dreimal hintereinander, jedoch in etwas unterschiedlichen Längen integriert. Bei der Insertionsvariante Nr. 8 lag ein ähnlicher Fall vor. Hier alinierte die integrierte Sequenz erst ab Position 30 zu der wt Sequenz. Der Bereich davor (Position 1-15) hingegen war deckungsgleich mit der wt Sequenz von Position 30 bis 44. Die Position 16 bis 30 war wiederum deckungsgleich mit der wt Sequenz von Position 21 bis 44. Hier lag also wieder die Integration eines Bereiches dreimal hintereinander in unterschiedlichen Längen vor, was einer dreifachen Micro-Duplikation entspricht. Diese komplexen Muster an multiplen Micro-Duplikationen konnten in den Proben CC3/4A 2 und CC3/4A 2.2.2 nicht beobachtet werden. Bei diesen beiden Proben konnten jedoch auch insgesamt nur acht unterschiedlichen Insertionsvarianten bis maximal 36 bp Länge detektiert werden.

### 3.3.4.6 Analyse der off-target Effekte der CRISPR/Cas Linien

In den bisherigen Kapiteln zur Amplikon-Sequenzierung der CRISPR/Cas-Proben wurden ausschließlich die Ergebnisse der Pools der Zielregion des jeweiligen Konstrukts, also für CCMlo2 der Pool von *RhMLO2* und für CCMlo3/4 der Pool für *RhMLO3/4*, betrachtet. In diesem Kapitel wird auf die Analyse der Pools zur Überprüfung der off-target Sequenzen eingegangen. Die vier untersuchten *RhMLOs* fallen in eine Klade des phylogenetischen Stammbaums und stellen somit jeweils die am nächsten verwandten Gene zueinander innerhalb der Gen-Familie dar. Daher wurde bei jeder Probe eines jeden CRISPR/Cas Konstrukts auch die mögliche Zielregion des Konstrukts in den anderen *RhMLOs* dieser Klade amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzen der off-target Pools wurden wie die Sequenzen der Pools der Zielregion auf Varianten zur Wildtyp-Sequenz untersucht, wobei auch hier ein Schwellenwert von 1,0 % zur Detektion gesetzt wurde, um Fehler durch die PCR-Reaktion und/oder die Sequenzierreaktion auszuschließen. Wie schon bereits beschrieben, konnten mit dem Konstrukt CCMlo1 keine Varianten in der Zielregion von *RhMLO1* detektiert werden. Auch in den off-target Analysen von *RhMLO2* und *RhMLO3/4* konnten keine Varianten oberhalb der Frequenz von 1,0 % detektiert werden. In den off-target Regionen des Konstrukts CCMlo2 von *RhMLO1*, *RhMLO3* und *RhMLO4* konnten ebenfalls keine vom Wildtyp abweichenden Varianten oberhalb von 1,0 % detektiert werden. Dieses Ergebnis konnte auch für das Konstrukt CCMlo3/4 in den off-target Bereichen von *RhMLO1* und *RhMLO2* bestätigt werden – auch hier konnten keine Varianten oberhalb des Schwellenwertes nachgewiesen werden. Damit konnte für alle Konstrukte eine off-target Rate von 0 % festgestellt werden (siehe auch Anhang A.9). In der nachfolgenden Abbildung 78 sind die Sequenzen der vier *RhMLO* Gene aus Klade V im Bereich der Bindestellen der drei verwendeten CRISPR/Cas Konstrukte abgebildet.



**Abbildung 78:** Sequenzen der Bindestellen der CRISPR/Cas Konstrukte im Vergleich zu den homologen Sequenzbereichen der anderen *RhMLO* Gene aus Klade V.

Sequenzen der jeweiligen *RhMLO* Gene (RhMLO1/2/3/4) im Bereich der Bindestellen (*Protospacer* und *PAM*, rot markiert) von A) CCMIo1 (\_C1), B) CCMIo2 (\_C2) und C) CCMIo3/4 (\_C34). Schwarz hinterlegte Bereiche weisen Identitäten von 100 % auf, dunkelgraue hinterlegte mit weißer Schrift Identitäten von 80 %, hellgrau hinterlegte mit schwarzer Schrift von 60 % und weiß hinterlegte Bereiche weisen Identitäten von unter 60 % auf.

Aus Abbildung 78 wird deutlich, dass bei allen Bindestellen der potentiellen off-target *RhMLO* Gene insbesondere die für die Bindung essentielle *PAM*-Sequenz abwich. Einzig bei der 3'-Bindestelle von CCMIo1 (Abbildung 78 A) war die *PAM*-Sequenz über alle Gene identisch. Aber auch hier wiesen die *PAM*-nahen Bereiche, wie bei den anderen Konstrukten, diverse Basenpaar-Abweichungen der off-target Gene zur Sequenz des *Protospacers* auf.

## 4 Diskussion

### 4.1 Transformationseffizienzen

Die Rose gilt als eine für die Produktion von stabil transgenen Pflanzen widerspenstige Art (Debener und Hibrand-Saint Oyant 2009). Für funktionelle Analysen mit transgenen Linien, als auch für die Anwendung von Genome Editing Methoden zur Bearbeitung und Optimierung von Merkmalen, ist es nötig, ausreichend hohe Transformationseffizienzen zu erzielen um diese Anwendung erst zu ermöglichen. In diesem Abschnitt wird daher zunächst auf die erzielten Transformationsraten der verschiedenen Ansätze eingegangen.

#### 4.1.1 Transformationseffizienzen durch Optimierung des Protokolls

Bei den Transformationsexperimenten mit den RNAi Konstrukten wurden noch leichte Veränderungen im Protokoll vorgenommen, um die Transformationseffizienz zu steigern. Das ursprüngliche Protokoll basierte auf dem Transformationsprotokoll von Dohm et al. (2002). Abweichend von diesem wurden hier die somatischen Embryonen vor der Ko-Kultur mittels Ultraschall verwundet. Da der Transfer der T-DNA der Agrobakterien durch die Wahrnehmung von bestimmten phenolischen Verbindungen wie zum Beispiel Acetosyringon und Zuckerverbindungen initiiert wird (Ashby et al. 1987, Cangelosi et al. 1990, Melchers et al. 1989, Stachel et al. 1986), sollte die Verwundung der Explantate zu einer erhöhten Transformationseffizienz beitragen. Verwundetes Pflanzengewebe setzt diese Induktoren der Stimulation der *Vir* Gene (im Speziellen dem *VirA* Gen) frei (übersichtlich zusammengefasst von Gelvin 2000).

In den Transformationsexperimenten A und B wurde dieses Verfahren zum einem mit dem *A. tumefaciens* Stamm GV2260 (A) und zum anderen mit dem Stamm EHA105 (B) durchgeführt. Die Transformationsraten reichten hier von 0 % bis 23 %, wobei die Werte von 23 % der RhMLO1-RNAi Linien und von 13 % der GUS-RNAi Linien höchstwahrscheinlich durch Fehler in der Vermehrung der Regenerate zu erklären sind und somit die tatsächliche Transformationseffizienz überschätzen. Die beobachteten 1,3 % bis 2,0 % bei beiden Experimenten scheinen eher die tatsächlichen Effizienzen widerzuspiegeln. Alle regenerierten Linien dieser beiden Transformationsrunden benötigten mindestens acht Monate auf Regenerationsmedium und wiesen einen aberranten Phänotyp auf, welcher sich durch ein gedrungenes, buschiges Wachstum mit verminderter Wüchsigkeit, stark gezackten Blättern und einer verminderten Bewurzellungsfähigkeit auszeichnete. Auf diesen Phänotyp wird im Folgenden noch einge-

gangen. Für die Transformationsexperimente C und D wurde eine weitere Änderung im Protokoll vorgenommen, in dem die somatischen Embryonen nach der zweitägigen Ko-Kultur grob gehackt wurden, bevor sie auf antibiotikahaltiges Embryoproliferationsmedium überführt wurden. Das Hacken der Embryonen wird bei der Kultur und Vermehrung der somatischen Embryonen zur Induktion und Proliferation sekundärer somatischen Embryonen eingesetzt. In diesem Kontext sollte es auch zu einer sekundären somatischen Embryogenese führen, um die Bildung von Chimären zu vermeiden beziehungsweise das Risiko der Chimärenbildung zu reduzieren. Somatische Embryonen entwickeln sich aus einer oder weniger Zellen aus Kallusstrukturen. Liegen nach der Ko-Kultur transformierte Zellen vor, können sich diese im Gegensatz zu nicht-transgenen Zellen durch die Antibiotika-Selektion stärker vermehren. Wäre hier die direkte Organogenese nachgeschaltet, bestünde das Risiko, dass sich Sprosse aus chimärem Gewebe bilden, da die enge Verbindung der transgenen zu den nicht-transgenen Zellen, diese vor einem Absterben bewahren könnten (Dong und McHughen 1993, Jordan und McHughen 1988). Ein weiterer Vorteil dieser Methode wurde erst bei der Regeneration von Sprossen deutlich: Aus den Regeneraten, die nach diesem Protokoll produziert wurden, entwickelten sich wesentlich schneller Sprosse (zum Teil bereits nach zwei Monaten, spätestens jedoch nach fünf Monaten) und keine der regenerierten Linien wies einen aberranten Phänotyp zu den Kontrollen und nicht-transgenen Pflanzen der Sorte 'Pariser Charme' auf. Bei den Transformationsexperimenten C und D wurde der Stamm GV2260, wie auch bei allen weiteren Transformationsexperimenten, verwendet, da dieser sich im Vergleich zwischen Versuch A und B als auch in Vor-Versuchen (Daten nicht aufgeführt) als der effizienter erwies. Beim Transformationsexperiment von Versuch C und D konnten Raten von 6 % bis 7,6 % beziehungsweise 2 % bis 3,3 % erzielt werden. Bei der Transformation mit den CRISPR/Cas Konstrukten wurden Transformationseffizienzen von 4 % bis 9,9 % mit dem optimierten Protokoll erzielt. Auch hier konnte eine geringe Regenerationsdauer von Sprossen von zwei bis fünf Monaten beobachtet werden, ohne dass abweichende Phänotypen bei den regenerierten, transgenen Linien auftraten.

In der Literatur ist eine Vielzahl erfolgreicher Transformationsversuche mit *Rosa hybrida* beschrieben. So konnten in diploiden und tetraploiden Sorten Transformationseffizienzen von 1 % - 2 % (Souq et al. 1996), über 3 % bis 9 % (Dohm et al. 2002, van der Salm et al. 1997, Vergne et al. 2010, Li et al. 2003) bis hin zu 12 % (Kim et al. 2004) beschrieben werden. Die hier erzielten Effizienzen von im Schnitt 5,5 % liegen im Vergleich mit den in der Literatur berichteten Frequenzen im Mittel, wobei auch Werte von über 9 % in einzelnen Versuchen erzielt werden konnten. Dohm et al. (2002) konnte mit 'Pariser Charme' lediglich Transforma-

tionseffizienz von maximal 3 % verzeichnen. Da der Transformationserfolg auch stark vom verwendeten Genotyp abhängt, ist dieser Vergleich am besten geeignet, das hier beschriebene Transformationsprotokoll als eine Optimierung der bisherigen Methode einzuordnen.

Die Verwundung mittels Ultraschall wurde bei einer Reihe von Arten erfolgreich zur *Agrobacterium*-vermitteltet Transformation eingesetzt: Pinie (Humara et al. 1999), Lein (Beranová et al. 2008), Orange (Oliveira et al. 2009) und Soja (Trick und Finer 1997, Santarém et al. 1998). Firoozabady et al. (1994) konnten hingegen keine Steigerung der Transformationseffizienz durch die Verwundung des embryogenen Materials bei Rosen feststellen, wobei hier die Verwundung mittels Quetschen mit einem Spatel herbeigeführt wurde. Allerdings konnte in der Studie von Firoozabady et al. (1994) ein signifikant positiver Effekt durch die Zugabe von Acetosyringon festgestellt werden, welches auch in dem hier verwendeten Protokoll dem Medium zur Ko-Kultur zugegeben wurde. Vergne et al. (2010) verwendeten in ihrem Protokoll erfolgreich sterilen See-Sand zur Verwundung der somatischen Embryonen vor der Transformation. Dieser muss jedoch anschließend wieder durch Waschen entfernt werden, was zusätzliche Arbeitsschritte und mögliche Kontaminationsquellen nach sich zieht. In dem verwendeten Protokoll von Li et al. (2002) wurden Nadel-Stiche zur Verwundung des embryogenen Kallus eingesetzt. Auch diese Methode ist wesentlich aufwendiger als die hier eingesetzte Verwundung mittels Ultraschall.

Sekundäre somatische Embryogenese nach Transformationsexperimenten von somatischen Embryonen von Rosen wurde auch von Li et al. (2002) und Li et al. (2003) beschrieben. Hier wurde allerdings embryogener Kallus nach der Transformation sechs Monate auf Antibiotikahaltigem Medium kultiviert, bevor er auf Antibiotika-freies Medium für die sekundäre somatische Embryogenese überführt wurde. Nach zwei Monaten wurde dann für vier Monate die Regeneration von Sprossen initiiert. Dies erforderte folglich zwölf Monate von der Transformation bis zur Regeneration von transgenen Sprossen und hat einen erheblichen Teil in einer Phase undifferenziertem Wachstums beansprucht, was unerwünschte somaklonale Variation begünstigt (Arene et al. 1993). In dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll wurde die sekundäre somatische Embryogenese direkt nach der Ko-Kultur eingeleitet und wurde lediglich für insgesamt fünf Wochen zugelassen. Nach dieser Zeit wurde direkt die Sprossregeneration initiiert, die im günstigsten Fall nach zwei Monaten zu vermehrungsfähigen, stabil transgenen Sprossen führte. Damit konnte die Zeitspanne von der Transformation bis zu regenerierten, vermehrungsfähigen Sprossen auf bis zu 13 Wochen verkürzt werden.

#### 4.1.2 Transformationseffizienzen mit den TALEN Konstrukten

Die oben beschriebenen Transformationseffizienzen ließen sich bei den Transformationen mit den TALEN Konstrukten trotz des identischen Protokolls nicht realisieren. Hier konnten nur Transformationseffizienzen von maximal 1,18 % (für TMlo3/4-2) und im Mittel über alle Konstrukte und Transformationsexperimente eine Effizienz von 0,34 % erreicht werden. Da dieses Problem schon mit den Konstrukten TMlo3/4-1 und TMlo3/4-2 beobachtet wurde, wurden vom Kooperationspartner (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Lahaye, Universität Tübingen) zusätzliche Konstrukte bereitgestellt, die in den Vektorhintergrund von pBinPlus kloniert worden waren. Dieser Vektor wurde in der Vergangenheit schon mehrfach für die Transformation von Rosen in der Abteilung Molekulare Pflanzenzüchtung erfolgreich eingesetzt (u.a. Terefe-Ayana et al. 2011). Die Umklonierung erfolgte unter der Annahme, dass es zu einer möglichen Inkompatibilität des Vektor-Backbones und der verwendeten Rosensorte kam und dadurch die geringen Transformationsraten zu erklären sind. Eine generelle Inkompatibilität konnte allerdings nicht vorliegen, da mit dem originären Konstrukt TMlo3/4-2 fünf transgene Linien erzeugt werden konnten. Die Transformationsexperimente mit den TALEN Konstrukten im pBinPlus Hintergrund führten allerdings nicht zu einer Steigerung der Transformationseffizienz, wodurch der Vektor-Hintergrund als Ursache zwar nicht vollständig, aber doch zum größten Teil, ausgeschlossen werden kann.

Ein weiterer Punkt könnte sein, dass ein kompletter Knock-out der *RhMLOs* letal ist und daher nur Linien mit genügend hohem Anteil an Wildtyp-Sequenzen, wie es bei den Linien mit TMlo3/4-2 der Fall ist, regenerieren können und lebensfähig sind. Dafür, dass der Knock-out eines oder auch mehrerer *MLO* Gene aus der Klade der an der Mehltau-Anfälligkeit involvierten *MLOs* letal ist, gibt es in der Literatur jedoch keinen Hinweis (Bai et al. 2008, Humphry et al. 2011, Pavan et al. 2011). Es wurden pleiotrophe Effekte wie Papillenablagerungen (Wolter et al. 1993, Consonni et al. 2006), verfrühte Seneszenz (Piffanelli et al. 2002, Consonni et al. 2006), spontaner Zelltod von Mesophyll-Zellen (Peterhänsel et al. 1997) und erhöhte Anfälligkeit gegenüber hemibiotrophen und nekrotrophen Erregern (Kumar et al. 2001, Jarosch et al. 1999, Consonni et al. 2006, McGrann et al. 2014) in Gerste und *A. thaliana* beobachtet. Auch abweichende *A. thaliana* Phänotypen durch den Knock-out von *MLO* Genen aus anderen Kladen wurden berichtet (Bidzinski et al. 2014, Chen et al. 2009, Kessler et al. 2010). Es wurden jedoch keine Effekte, die das Absterben der Regenerate in dieser Arbeit erklären könnten, beschrieben. Des Weiteren müssten die TALEN Konstrukte für einen totalen Knock-out sehr effizient sein und alle vier Allele (bei *RhMLO3/4* insgesamt acht Allele) simultan ausschalten. Hierfür gibt die transiente Infiltration mit dem TALEN

Konstrukten TMlo3/4-1 und TMlo3/4-1\* allerdings keinen Hinweis, da keine abweichenden Fragmente, die auf Mutationen hinweisen, in der PAA-Gelelektrophorese der Proben detektiert werden konnten. Eine weitere Erklärung könnte in einer möglichen Problematik mit den TALEN *repeats* im Rosengenom liegen, die die Regeneration von exprimierenden TALEN Linien beeinträchtigen. Generell müsste die Transformationseffizienz unabhängig von der Funktionalität der TALEN sein und die Selektion der transformierten Regenerate über die vermittelte Kanamycin-Resistenz erfolgen. Unabhängig von der Funktionalität konnten aber nur sehr wenige, für drei der sechs getesteten Konstrukte keine, Linien regeneriert werden. Die geringe Effizienz könnte auch an der Größe der TALEN Konstrukte liegen. Park et al. (2000) konnten nachweisen, dass die Transformationseffizienz bei Baumwolle und Reis durch Reduktion der Länge der T-DNA von 8,4 kb auf 4,3 kb um das Zweifache gesteigert werden konnte. Allerdings sind die hier verwendeten TALEN und CRISPR/Cas Konstrukte mit rund 15,5 kb in etwa gleich groß. In diesem Fall wäre daher eine erhöhte Rekombinationsrate, begünstigt durch die *repeats* der TALEN, denkbar. Osborn et al. (2016) berichteten von toxischen Effekten in T-Zellen bei zu hoher TALEN-Konzentration. Mögliche Mehrfach-Insertionen, die zu einer hohen Expression geführt haben könnten, sind bei *A. tumefaciens* transformierten Rosen nicht selten und daher nicht auszuschließen. Auch ist es möglich, dass die repetitiven Elemente der TAL-Effektoren zu Problemen bei der Integration in das Genom geführt haben. Eine Erklärung für dieses Phänomen bleibt jedoch rein spekulativ. Hier müssten weitere Versuche mit unterschiedlichen TALEN Konstrukten, auch gegen andere Gene, zur Klärung der Lage erfolgen. Des Weiteren könnte eine Überprüfung der integrierten T-DNA mittels Sequenzierung die Hypothese der Rekombination überprüfen. In der Literatur konnte kein Hinweis auf ähnliche Probleme mit TALEN Konstrukten in pflanzlichen Transformationssystemen gefunden werden. Dies muss aber nicht bedeuten, dass diese Probleme nicht auftauchen. Vielmehr kann es sein, dass aufgrund des Systems des Publizierens diese negativen aber für die Forschung dennoch wichtigen Hinweise nicht publiziert wurden und so nicht zugänglich sind. Durch persönliche Mitteilung ist allerdings bekannt, dass bei Versuchen mit TALEN Konstrukten des gleichen Ursprung (Arbeitsgruppe Lahaye, Uni Tübingen) und des gleichen Vektor-Hintergrunds gegen das *MLO* Gen der Gerste, keine überlebensfähigen transgenen Gersten Linien erzeugt werden konnten (persönliche Mitteilung Dr. Jochen Kumlehn, IPK Gatersleben). Da in Gerste der Knock-out des *MLO* Gens sehr gut charakterisiert ist und keine letalen Effekten nachgewiesen wurden, kann dies im Fall von Gerste ausgeschlossen werden (Jorgensen 1992, Piffanelli et al. 2004, Reinstädler et al. 2010). Auch konnte zum Beispiel in Weizen der erfolgreiche Einsatz von TALENs zur Erzeugung von *MLO* Knock-

outs nachgewiesen werden (Wang et al. 2014). Dies stützt die These, dass im vorliegenden Fall ein generelles Problem mit den TALEN Konstrukten vorlag, dass jedoch nicht auf den Vektor-Hintergrund zurückzuführen ist.

#### 4.1.3 Beobachtete Phänotypen

Bei den regenerierten Linien, die aus den ersten beiden Transformationsexperimenten (A und B) mit den RNAi Konstrukten und den Transformationen mit dem TALEN Konstrukt TMlo3/4-2 entstanden sind, konnte ein aberranter Phänotyp im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Dieser zeichnete sich durch ein gedrungenes und buschiges Wachstum mit verminderter Wüchsigkeit, als auch verminderte Fähigkeit zur Ausbildung von Wurzeln aus. Des Weiteren wiesen die Pflanzen stärker gezackte Blätter als die Kontrollen auf. Dieser Phänotyp konnten bei den regenerierten Linien der übrigen Transformationsexperimente mit den RNAi Konstrukten, als auch bei denen mit den CRISPR/Cas Konstrukten, nach dem optimierten Transformationsprotokoll nicht beobachtet werden.

Die aberranten Linien der RhMLO-RNAi Konstrukte wurden ohne den Schritt der sekundäre somatische Embryogenese erzeugt und benötigten mindestens acht Monate auf Regenerationsmedium bis sich Sprosse ausbildeten. Das hier verwendete Regenerationsmedium wurde mit einer Cytokinin-Konzentration von 2 mg/L eingesetzt. Diese hohe Konzentration des Pflanzenwachstumsregulator (engl.: *plant growth regulator*, kurz: PGR) und die lange Verweildauer der Regenerate auf diesem Medium können zu einer Akkumulation von Cytokinin im Pflanzengewebe geführt haben. In George et al. (2007) ist beschrieben, dass zu hohe Level an Cytokinin während der In-Vitro-Kultur zur Produktion von vielen Sprossen an Explantaten führen, welche oftmals kein normales Streckungswachstum aufweisen (siehe auch Sachs und Thimann 1967). Weiterhin wird beschrieben, dass zu hohe Konzentrationen an Cytokinin zu veränderten Blattmorphologien führen können. George et al. (2007) fassen zusammen, dass eine hohe Konzentration von 0,5 bis 10 mg/L Cytokinin einen hemmenden Effekt, nicht nur auf die Initiation von Wurzeln ausübt, sondern auch deren Wachstum beeinträchtigt. Außerdem wird angeführt, dass es zu weilen mehrere Runden der Sub-Kultivierung auf PGR-freiem Medium bedarf, um das endogene Level an Cytokinin im Pflanzengewebe ausreichend zu reduzieren. Diese beschriebenen Effekte auf den Phänotyp von Pflanzen durch eine zu hohe Cytokinin-Konzentration im Kulturmedium decken sich mit dem beobachteten Phänotyp der transgenen Linien. Da Linien, die kürzere Regenerationszeiten benötigten, diesen Phänotyp nicht aufwiesen, scheint die Dauer während der die Regenerate der hohen Konzentration an Cytokinin zur Sprossbildung ausgesetzt sind, einen wichtigen Faktor darzustellen. Dieser

scheint den Ausschlag zu geben, ob die Regenerate einen aberranten Phänotyp aufwiesen oder nicht. Um die Bewurzelung zu initiieren wurden die Linien für mehrere Monate auf Wurzeln-Induktionsmedium kultiviert. Dieses beinhaltete Auxin als auch Riboflavin. Die ersten fünf Tage wurden die Pflanzen im Dunkeln kultiviert, um die Wurzelbildung zusätzlich zu fördern (nach Quambusch 2016). Sobald die Pflanzen ins Licht überführt wurden, wurde durch Riboflavin zusätzlich die Photo-Oxidation des Auxins bewirkt, da dieses zwar für die Wurzel-Initiierung benötigt wird, die Wurzel-Elongation aber beeinträchtigt (George et al. 2007). Somit wurde nach wenigen Tagen ein PGRs freies Medium erreicht. Allerdings wiesen auch nach Monaten der Kultivierung auf diesem Medium nur einige wenige Sprosse ein kümmerliches Wurzelwachstum auf, welches sich in sehr kurzen und dicken Wurzeln in geringer Anzahl äußerte. Das Überführen in Erde und die Akklimatisierung war folglich nur in sehr wenigen Fällen erfolgreich. Pflanzen, die in die Phytokammer überführt werden konnten, wiesen auch hier den Phänotyp auf und starben innerhalb weniger Monate ab. Somit konnte der veränderte Phänotyp, entgegen der Beschreibungen von George et al. (2007), nicht reversiert werden.

Die regenerierten Pflanzen der Transformation mit dem TALEN Konstrukt TMlo3/4-2 wiesen den gleichen Phänotyp wie die der Transformation mit den RNAi Konstrukten auf. Diese Linien wurden dem optimierten Protokoll folgend erzeugt und benötigten trotzdem mindestens fünf bis acht Monate bis zur Regeneration von Sprossen. Dies könnte an dem bereits beschriebenen Problemen der Rosensorte 'Pariser Charme' im Zusammenhang mit der Transformation der TALEN Konstrukte gelegen haben und ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Transformation mit den TALEN Konstrukten einen nicht näher bekannten, abträglichen Effekt auf das Pflanzengewebe ausübte. Eine weitere mögliche Erklärung könnte in den für die Transformation verwendeten somatischen Embryonen liegen. Diese wurden aus dem Bestand der Abteilung Molekulare Pflanzenzüchtung übernommen und befanden sich zum Start der Transformationsexperimente im Schnitt zwei Jahre in der In-Vitro-Kultur. Es wurden jedoch auch neue somatische Embryonen aus Blattexplantaten von 'Pariser Charme' nach dem Protokoll von Dohm et al. (2001) induziert, als auch aus embryogenem Kallus nach dem Protokoll von Kamo et al. (2004). Die Linien der unterschiedlich lange *in vitro* kultivierten somatischen Embryonen wurden zwar getrennt von einander kultiviert, jedoch für die Transformationsexperimente gemischt eingesetzt. Es kann daher insbesondere bei den ersten Transformationsexperimenten (A und B) durchaus vorgekommen sein, dass hauptsächlich solche Embryonen eingesetzt wurden, die schon mehrere Jahre *in vitro* kultiviert wurden. Dies kann zusätzlich zu einer Akkumulation von Cytokinin im Gewebe geführt haben, da auch das Embryoproliferationsmedium zunächst mit einer hohen Konzentration an Cytokinin (4,0 mg/l

TDZ) verwendet wurde. Die Konzentration wurde jedoch im Laufe der Arbeiten auf 0,5 mg/l TDZ reduziert. Des Weiteren könnten auch durch die lange Kultivierung, im oftmals undifferenzierten Zustand (embryogene Kallusstrukturen, aus denen sich die Embryonen entwickelten), somaklonale Variationen aufgetreten sein, die den Phänotyp der sich daraus entwickelten Sprosse nachhaltig beeinflussten (siehe hierzu die umfangreichen Zusammenfassungen von Larkin und Scowcroft 1981 und George et al. 2007). In George et al. (2007) berichten die Autoren, dass embryogene Kulturen nicht länger als sechs Monate kultiviert wurden, um dem Risiko der somaklonalen Variation vorzubeugen. Diese Kulturdauer wurde bei den in dieser Arbeit verwendeten somatischen Embryonen in dem meisten Fällen deutlich überschritten. Auch wenn die Beschreibungen der Auswirkungen die lange Kultivierung bei hoher Cytokinin-Konzentration als Ursache für die Phänotypen nahe legen, bleibt dies eine Hypothese. Auch somaklonale Variation oder epigenetische Effekte könnten durch die lange In-Vitro-Kultur in undifferenziertem Zustand zu phänotypischen Effekten geführt haben. Für letzteres würde sprechen, dass sich der Phänotyp der Linien auch auf PGR-freiem Medium oder nach Akklimatisierung in PGR-freiem Substrat nicht rückgängig machen lassen.

#### 4.1.4 Feststellung des transgenen Charakters

Die in dieser Arbeit beschriebenen Linien wurden durch die Integration des *NPTII* Gens über die etablierte Resistenz gegen Kanamycin selektiert. Nach der Anpassung der Kanamycin-Konzentration im Regenerations-Medium von zuvor 60 mg/l auf 150 mg/l konnten keine falsch-positiven Sprosse (*Escapes*) mehr nachgewiesen werden. Die zuvor niedrigere Konzentration an Kanamycin führte zu diversen *Escapes*. Ein Versuch zur Bestimmung des Toleranzlevels der Sorte 'Pariser Charme' zeigte, dass erst ab 150 mg/l Kanamycin im Medium alle nicht-transgenen Kontrollen verlässlich abstarben (Daten nicht aufgeführt). In der Literatur finden sich Konzentrationen von 5 mg/l Kanamycin (van der Salm et al. 1997) und 10 mg/l (Qiu et al. 2015a), über 60 mg/l (Dohm et al. 2002) und 250 mg/l (Marchant et al. 1998b) bis hin zu 300 mg/l Kanamycin (Firoozabady et al. 1994) für die Selektion von transgenen Rosen nach Übertragung des *NPTII* Gens. Die nötige Toleranz gegenüber Kanamycin scheint also stark vom verwendeten Genotyp abzuhängen. Allerdings haben Dohm et al. (2002) auch die Sorte 'Pariser Charme' verwendet und lediglich mit 60 mg/l Kanamycin selektiert.

In den PCR-Analysen zur Detektion des *NPTII* Gens, konnte in allen analysierten Linien das Transgen nachgewiesen werden. Keine der Linien stellte sich als *Escape* heraus oder gab Anlass zur Vermutung von Chimärenbildung. Des Weiteren wurde mittels PCR überprüft, ob das

positive *NPTII* Signal tatsächlich durch eine Integration der T-DNA herrührte und nicht durch persistierende Agrobakterien. Hierzu wurde die DNA in einer PCR mit Primern getestet, die das Chromosom der Agrobakterien binden. In keiner der untersuchten Linien konnte DNA von Agrobakterien detektiert werden, wodurch das positive *NPTII* Signal ausschließlich durch eine Übertragung der T-DNA herrühren konnte. Des Weiteren wurden die RhMLO-RNAi Linien positiv auf die Expression des RNAiKonstrukts mit Primer, die sowohl im 35S Promotor als auch in der inklonierten *RhMLO* Sequenzen binden, getestet. In Linien der CRISPR/Cas Konstrukte konnte weiterhin die Expression der Cas9n mittels RT-PCR nachgewiesen werden.

Die transgenen Linien wurden nicht mittels Southern Blot auf die Integration der T-DNA untersucht. Dies ist ursächlich in mehreren Gründen. Zum einen konnte der transgene Charakter der Pflanzen eindeutig mittels PCR nachgewiesen werden. Zum anderen stellt eine mögliche mehrfache Integration der T-DNA beim Ansatz des RNAi Silencing keine Hürde dar, sofern die *NPTII* Expression nicht durch Silencing-Effekte betroffen ist. Letztere konnte durch die Kanamycin-Selektion ausgeschlossen werden. Auch die Induktion der Mutationen durch die Übertragung der TALEN und CRISPR/Cas T-DNA würde nicht bei mehrfachen Insertionen unterbunden werden. Dies könnte vielmehr die Mutationsraten durch die höhere Expression erhöhen, wenn auch toxische Effekte bei zu hohen Konzentrationen von TALENs in T-Zellen berichtet wurden (Osborn et al. 2016). Bei Pflanzen wurde dieses Phänomen jedoch noch nicht beschrieben. Mehrfache Insertionen wären allerdings bei späteren Kreuzungsversuchen hinderlich. Diese waren jedoch mit den RNAi Linien nicht geplant, da zum einen durch die Herunterregulierung der Gene keine vollständige Resistenz erreicht werden kann und nur eine vollständige Resistenz das Einkreuzen in neue Sorten sinnvoll macht. Hinzu kommt, dass die RNAi Konstrukte für die Homologien zu den Genen von 'Pariser Charme' erstellt wurden und es durch die Variabilität des C-Terminus der Genen nicht ausgeschlossen ist, dass in anderen Sorten die Konstrukte unzureichender oder gar nicht das jeweilige *RhMLO* herunterregulieren. Zum anderen wären alle Kreuzungsprodukte wie die ursprünglichen RNAi Linien als GVO (gentechnisch veränderter Organismus) klassifiziert. Diese haben jedoch in der Gesellschaft eine geringe Akzeptanz und eine Vermarktung ist neben den rechtlichen Hürden und der unvollständigen Resistenz kaum wahrscheinlich. Somit dienten die Versuche der RhMLO-RNAi Linien rein dem „*proof-of-concept*“, um die Funktion der *RhMLO* Gene in der Vermittlung der Mehltau-Anfälligkeit nachzuweisen. Hinzu kommt, dass die Isolation von ausreichenden Mengen an qualitativ hochwertiger DNA bei Rosen nicht trivial ist und große Mengen an jungem Blattmaterial erfordert. Dies ist allerdings eine Bedin-

gung für die Durchführung von Southern Blots. Daher sollte nur bei vielversprechenden RhMLO-RNAi Linien ein solcher durchgeführt werden. Keine der Linien erwies sich allerdings in den Analysen als stabil in der Reduktion der *RhMLO* Expression, weswegen von Southern Blots abgesehen wurde.

Die Sprosse der TALEN Linien wiesen allesamt den aberranten Phänotyp auf, was eine erfolgreiche Überführung der Pflanzen in die Phytokammer unterband. Die Kultivierung von Pflanzen in der Phytokammer wäre allerdings Voraussetzung für die Beprobung von genügend jungem Blattmaterial gewesen, da die DNA Isolation von In-vitro-Material mit zusätzlichen Hürden verbunden ist und die Reinheit der isolierten DNA in der Regel auch nicht ausreichend ist. Die resultierten Linien der Transformation mit den CRISPR/Cas Konstrukten waren zum Abschluss der Arbeiten noch nicht in ausreichender Anzahl und Größe in der Phytokammer kultiviert, um ausreichend Material für die DNA Isolation zu erhalten. Für diese beiden Genome Editing Ansätze wäre die Bestimmung der Anzahl der T-DNA Integrationen interessant gewesen. Eine Analyse hinsichtlich der Anzahl der Integrationen und dem Auftreten von Mutationen und der resultierenden Mutationsfrequenz der Linien könnte Rückschlüsse auf einen negativen oder positiven Effekt der Anzahl der übertragenden T-DNA erlauben. So könnte unter anderem geklärt werden, ob durch mehrfach Integrationen die Mutationsraten zunehmen oder ganz ausbleiben, was auf mögliche Silencing Effekte hinweisen würde.

Ein großer Vorteil der Genome Editing Ansätze mit TALEN und CRISPR/Cas ist, dass die integrierte T-DNA unabhängig von den induzierten Mutationen wieder heraus gekreuzt werden kann, sofern die Integration weit genug vom Ziel-Gen entfernt liegt. Auf diese Weise können Nachkommen erzeugt werden, die die Mutation, nicht jedoch die T-DNA tragen. Das Auskreuzen der T-DNA ist jedoch bei multiplen Insertionen erheblich erschwert und kann mehrere Kreuzungs-Generationen erfordern. Daher wäre hier die Detektionen von Linien mit nur einer einzelnen Insertion vorteilhaft. Multiple Insertionen der T-DNA in das Genom durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer bei Rosen stellen keine Seltenheit dar. So konnten Li et al. (2003) bei ihren Untersuchungen Einzel-Insertionen bis hin zu achtfachen Integrationen der T-DNA feststellen. Auch Firoozabady et al. (1994), Kim et al. (2004), Souq et al. (1996) und Vergne et al. (2010) stellten neben Einzel-Insertionen auch Linien mit multiplen Insertionen mit bis zu elf Kopien fest.

Bei Southern Blot Analysen von vermeintlich unabhängigen Linien wurde oftmals berichtet, dass sich einige als identisch herausstellten und somit auf dasselbe Transformationsereignis zurückzuführen waren (Souq et al. 1996, van der Salm et al. 1997, Li et al. 2002, Li et al.

2003, Kim et al. 2004, Vergne et al. 2010). Dies lässt sich bei den in dieser Arbeit beschriebenen Linien aufgrund der fehlenden Southern Blot Analysen nicht gänzlich ausschließen. Allerdings wurde ab Transformation B der RhMLO-RNAi Konstrukte sowie bei allen Transformationsexperimenten der TALEN und CRISPR/Cas Konstrukte, jedes regenerierende Explantat einzeln umgesetzt und eine Vermischung der Regenerate verhindert. Somit konnte jeder sich regenerierende Spross als Klon eines spezifischen Regenerats (Linie) zurückverfolgt werden. Da die Ausgangsregenerate durch das Hacken nach der zweitägigen Ko-Kultur einen ungefähren Durchmesser von 0,2 bis 0,5 cm aufwiesen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den regenerierten Sprossen einer Linie um identische Events handelt hoch. Das durch das Hacken ein Event geteilt und fortan als vermeintlich zwei unterschiedliche geführt wurde, ist unwahrscheinlich, jedoch auch nicht gänzlich auszuschließen.

## 4.2 Funktionelle Analysen der *RhMLO*s mittels RNAi Silencing

Die vier *RhMLO* Gene aus Klade V sind aufgrund ihrer Phylogenie und Aminosäure-Sequenz Kandidaten für funktionell in der Mehltau-Anfälligkeit beteiligte MLO-Proteine (Kaufmann et al. 2012). Zur Überprüfung dieser potenziellen Funktionalität, wurden RhMLO-RNAi Konstrukte erstellt, um die Expression von *RhMLO1* (RhMLO1-RNAi), *RhMLO2* (RhMLO2-RNAi), *RhMLO3* und *RhMLO4* (RhMLO3/4-RNAi) mittels RNAi Silencing zu unterdrücken. Die Reduktion der Expression der *RhMLO* Gene in Rosen (*R. hybrida*, Sorte 'Pariser Charme') wurde dann hinsichtlich des Effekts auf die Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau (*P. pannosa*) untersucht. Hierzu wurden zwei Ansätze verfolgt: Zum einen ein transienter Ansatz mittels Agro-Infiltration von Petalen und zum anderen ein stabil transgener Ansatz mit RhMLO-RNAi exprimierenden Linien. Nachfolgend wird zunächst auf den Effekt des Gen-Silencing durch die RNAi Konstrukte in den beiden Ansätzen eingegangen und anschließend der davon ausgehende Effekt auf die Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau diskutiert. Abschließend erfolgt die Einordnung der daraus gezogenen Schlüsse im Bezug auf die Funktionalität der untersuchten *RhMLO* Gene in der Anfälligkeits-Vermittlung gegenüber dem Pathogen.

### 4.2.1 Expressionsanalysen zur Regulation der *RhMLO*s

#### 4.2.1.1 Expressionsanalysen der transienten Transformation von Petalen

Mittels q-RT-PCR Analysen konnte für jedes der drei RhMLO-RNAi Konstrukte eine Reduktion in der Expression des jeweiligen *RhMLO* Gens in Agro-infiltrierten Petalen nach sechs Tagen nachgewiesen werden. Die statistischen Analysen konnten zwar nur für RhMLO1-

RNAi und RhMLO3/4-RNAi einen signifikanten Effekt auf die Expression der Ziel-Gene belegen, bei RhMLO2-RNAi konnte jedoch ebenfalls eine deutliche – wenn auch nicht statistisch signifikante – Reduktion von *RhMLO2* festgestellt werden. Die Funktionalität des RhMLO3/4-RNAi Konstrukts wurde mittels der Expression von *RhMLO4* nachgewiesen. Die Untersuchung von nur einem der beiden Ziel-Gene des Konstrukts resultierte zum einen aus der Belegung der Multititerplatten für die q-RT-PCR Reaktionen und zum anderen aus den abweichenden Annealingtemperaturen der Expressionsprimer von *RhMLO3* im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen. Die Funktionalität des Konstrukts auf die Reduktion der Expression von *RhMLO3* konnte in zwei unabhängigen Analysen nachgewiesen werden (Daten im Anhang aufgeführt). Die nicht-Ziel *RhMLO* Gene aus Klade V wiesen in den jeweiligen Behandlungen keine statistisch nachweisbaren Effekte in ihrer Expression auf. Es konnte weder eine geringere noch eine höhere Expression festgestellt werden. Als Kontrolle diente in allen Fällen die Expression der *RhMLO* Gene in den mit dem GUS-RNAi Konstrukte infiltrierten Petalen. Somit konnte die Funktionalität der RhMLO-RNAi Konstrukte in Rosen nachgewiesen werden, ohne das off-target Effekte in den nah-verwandten *RhMLO* Genen beobachtet werden konnten.

Die Transformationskontrolle mit dem GUS-RNAi Konstrukt stellte in diesen Versuchen eine wichtige Größe dar, da sich die *RhMLO* Gene durch eine generell niedrige Expression und starke Induzierbarkeit ausweisen (Erkenntnisse aus Vorversuchen) und der durch die Agro-Infiltration und Lagerung der Petalen ausgelöste starke biotische und abiotische Stress die Expression beeinflusst haben kann. Nicht-transformierte Petalen würden somit dieses System nur ungenügend widerspiegeln. Die Kontrolle auf mögliche off-target Effekte der RhMLO-RNAi Konstrukte ist von hoher Relevanz für nachfolgende Analysen, mit denen ein Einfluss der spezifischen *RhMLOs* auf die Mehltau-Anfälligkeit überprüft werden sollte. *MLO* Gene sind in einer großen Gen-Familie organisiert, die sich in sechs bis acht phylogenetische Kladen einteilen lässt (Acevedo-Garcia et al. 2014, Feechan et al. 2008, Jiwan et al. 2013, Zheng et al. 2016), wobei die Einteilung in sieben phylogenetische Kladen über die verschiedenen Arten die Phylogenie der *MLO* Proteine am geeignetsten darstellt (Kusch et al. 2016). Die Transmembran-Regionen weisen, neben weiteren konservierten Motiven der Sequenz, einen hohen Grad an Übereinstimmung über die Vertreter der *MLO* Genfamilie auf (Devoto et al. 1999, Elliott et al. 2005, Kusch et al. 2016, Zheng et al. 2016). Unspezifische Herunterregulierung von weiteren *MLO* Genen bei RNAi-Ansätzen konnten bei Versuchen mit Tomate und Wein (Zheng et al. 2016, Pessina et al. 2016a) nachgewiesen werden. So wurde beschrieben, dass das verwendete RNAi Konstrukt für *SIMLO1* aus Tomate, welches nur einen kurzen Be-

reich des Gens abdeckte (~160 bp), neben dem Ziel-Gen *SIMLO1* auch *SIMLO5* und *SIMLO8* statistisch signifikant herunter regulierte (Zheng et al. 2016). Das gleiche Phänomen wurde bei Wein beschrieben, wo ein RNAi Konstrukt von 600 bp Länge neben dem Ziel-Gen zu off-target Silencing-Effekten in anderen *MLO* Genen derselben Klade geführt hat (Pessina et al. 2016a). In der vorliegenden Arbeit wurde für die endogenen Bereiche der RNAi Konstrukte jeweils der variable C-Terminus der *RhMLO* Gene gewählt, um die Wahrscheinlichkeit von off-target Effekten zu minimieren. Des Weiteren wurden Konstrukte von einer Länge von 300 bp gewählt, um eine Balance zwischen Spezifität und Effektivität der Konstrukte zu gewährleisten. Wären die hier verwendeten *RhMLO*-RNAi Konstrukte nicht spezifisch genug und lägen off-target Effekte vor, könnte in Inokulationsversuchen kein Rückschluss auf die Wirkung der einzelnen *RhMLOs* gezogen werden.

Die Proben für die Expressionsanalysen wurden nach sechs Tagen genommen, da das Reportergen *dsRed* erst ab dem vierten Tag nach der Infiltration stark leuchtend unter LED-Licht nachgewiesen werden konnte. Ferner wurde die Inkubation von sechs Tagen gewählt, um den Abbau der in der Zelle vorliegenden *MLO* Proteine zu gewährleisten. Durch den Abbau der *RhMLO* mRNA ist nur die Neu-Bildung von Proteinen betroffen, bereits in der Zelle vorliegenden Proteine jedoch nicht. Diese vor der Infiltration gebildeten und in der Membran lokalisierten *RhMLO* Proteine könnten ansonsten, trotz erfolgreichen RNAi-Silencings, die Infektion mit dem Erreger ermöglichen. Eden et al. (2011) konnten in ihren Untersuchungen zum Protein-Abbau in menschlichen Zellen Halbwertszeiten von 45 Minuten bis zu 22,5 Stunden beobachten. Außerdem stellten die Autoren fest, dass Proteine, welche im Cytoplasma lokalisiert sind, höhere Abbauraten aufwiesen. In gestressten Zellen wurden hingegen deutlich geringere Abbauraten von Protein beobachtet, während sich die Halbwertszeiten im Durchschnitt verdoppelten. Auch Johansen und Carrington (2001) wiesen in ihren Versuchen zur Agro-Infiltration mit RNAi Konstrukten auf potenzielle, bereits in der Zelle transkribierte und akkumulierte, Gen-Produkte hin, die den Effekt des RNA Silencing beeinflussen könnten. Daher sind bei funktionellen Analysen mittels RNAi Silencing – insbesondere bei solchen in denen die Zellen, wie hier, starkem Stress ausgesetzt sind – ausreichend lange Wartezeiten zu berücksichtigen.

#### **4.2.1.2 Expressionsanalysen der stabil transgenen *RhMLO*-RNAi Linien**

Insgesamt wurden acht Linien je *RhMLO*-RNAi Konstrukt auf die Expression des jeweiligen *RhMLOs* untersucht. Bei keiner der insgesamt 24 untersuchten Linien konnte eine Reduktion des *RhMLOs* über alle Wiederholungen hinweg im Vergleich zur Kontrolle festgestellt wer-

den. Wenn auch bei einzelnen Versuchswiederholungen eine deutlich geringere Expression beobachtet werden konnte, lies sich diese in weiteren Wiederholungen nicht mehr nachweisen. Teilweise wurde sogar eine höhere Expression im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Insgesamt konnten hohe Schwankungen und keine stabile Reduktion in der Expression der *RhMLO* Gene bei den Linien zwischen den Wiederholungen beobachtet werden. Zu einem ähnlichen Befund kamen auch Weigl et al. (2015), die den p9U10-RNAi Vektor in Apfel verwendeten und ebenfalls keine signifikante Reduktion der Expression des untersuchten *MdTFL1* Gens zur Kontrolle nachweisen konnten. Für die Analysen wurden circa 300 bp große Fragmente zwischen zwei flankierende Promotoren kloniert und zwei Apfelsorten stabil transformiert. Allerdings nutzten Weigl et al. (2015) den hitzeinduzierten Gmhsp17.5-E Promotor und nicht wie in dieser Arbeit den 35S Promotor. Dadurch fällt ein direkter Vergleich mit den hier beobachteten Daten schwer. In den Analysen von Terefe-Ayana et al. (2011) zum transienten Silencing des *Rdr1* Gens in Petalen von in *R. hybrida* zur Untersuchung der Resistenz gegen Sternrußtau wurde der p9U10-RNAi Vektor mit 35S Promotoren eingesetzt. Hier wurde lediglich im transienten System die Erhöhung der Anfälligkeit nachgewiesen und auf Analysen zur Expression der Gene verzichtet. Da die Funktionalität der hier verwendeten RhMLO-RNAi Konstrukte mittels transientser Analysen in Petalen bereits nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 4.2.1.1), tragen die Analysen von Terefe-Ayana et al. (2011) nicht zur Klärung des hier beobachteten Ausbleibens des Silencing Effekts bei. Die Funktionalität des stabil übertragenden Vektors mit zwei flankierenden 35S Promotoren wurde in GUS-exprimierenden Tabak-Pflanzen anhand des erfolgreichen GUS-Silencings beschrieben (Schmidt et al. 2012). Bei dem in Tabak regulierten *GUS* Gen handelte es sich um ein konstitutiv hoch exprimiertes Gen unter der Kontrolle eines 35S Promotors (Schmidt et al. 2012). Die transiente Agro-Infiltration mit den RhMLO-RNAi Konstrukten führte zu einer im Vergleich zu den stabil exprimierenden Linien sehr starken Expression der RNAi Konstrukte. Koscianska et al. (2005) beobachteten in Agro-Infiltrationsversuchen mit Tabak, dass die Reduktion der Expression mittels RNAi von Transgenen, wie GFP, wesentlich effektiver ist, als die Reduktion der Expression von endogenen Genen. Des Weiteren konnten Han et al. (2004) in ihren Untersuchungen nachweisen, dass bei niedrig exprimierten Genen ein Silencing-Effekt ausblieb, wohingegen bei hoher und mittlerer Expression desselben Gens mit demselben Konstrukt ein Silencing-Effekt nachweisbar war. Auch in *Caenorhabditis elegans* konnte die Abhängigkeit der endogenen Expressionsstärke und des Silencing-Effekts nachgewiesen werden (Cutter et al. 2003). Die *RhMLO* Gene in *R. hybrida* zeichnen sich durch eine geringe Expression und starke Induzierbarkeit aus. Daher kann eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben des Silen-

cing-Effekts in den RhMLO-RNAi Linien in der Dosis-Abhängigkeit des RNAi-Mechanismus liegen, indem ein bestimmter Schwellenwert für eine erfolgreiche Reduktion der Expression in den RhMLO-RNAi Linien nicht erreicht werden konnte. Qiu et al. (2015a) konnten den Knock-down von *RhMLO1* mittels eines stabil übertragenen RNAi Konstrukts in *R. hybrida* nachweisen. Allerdings wurde das RNAi Konstrukt anhand der vollständigen Gen-Sequenz von *RhMLO1* erstellt und überspannte somit den gesamten *open reading frame*. Wie bereits beschrieben, weisen die *RhMLO* Gene einen hohen Grad an Sequenzübereinstimmung auf, weshalb davon auszugehen ist, dass ein RNAi Konstrukt, welches die ganze Länge des Gens abdeckt, nicht nur das Ziel-*MLO* herunter reguliert, sondern auch seine nah-verwandten Vertreter der Gen-Familie aufgrund von Sequenzhomologien beeinflusst. Sequenzhomologien von rund 21 Basenpaaren, aber auch schon geringere Übereinstimmungen, können off-target Effekte an anderen Genen hervorrufen (Senthil-Kumar et al. 2007, Xu et al. 2006). Jackson et al. (2003) zeigen auf, dass schon Homologien von 11 bis 15 bp in humanen Zellen ausreichen, um off-target Effekte an anderen Genen zu erzeugen. Besonders Sequenzhomologien in der *seed region* am 5' Ende der gebildeten siRNAs haben einen starken Einfluss auf die Translation von off-target mRNA (Jackson et al. 2006). Qiu et al. (2015a) haben lediglich die Expression von *RhMLO1* untersucht und keine Analysen bezüglich der Expression anderer Vertreter der Klade durchgeführt. Das Silencing von multiplen Genen könnte somit zu einer Menge an siRNA geführt haben, die unter anderen einen RNAi Effekt bei *RhMLO1* ausgelöst hat.

Auch in Apfel, Wein und Petunie konnte das Silencing von *MLO* Genen mittels RNAi nachgewiesen werden (Jiang et al. 2016, Pessina et al. 2016a, Pessina et al. 2016b). Allerdings wurde zum Teil eine größere Anzahl an Linien analysiert, um solche mit einem Effekt zu identifizieren. Pessina et al. (2016b) haben insgesamt 41 Apfel-RNAi Linien auf die Reduktion von *MdMLO19* getestet. In 13 Linien konnte ein signifikanter Knock-down beobachtet werden, der allerdings nach der Überführung der Pflanzen ins Gewächshaus nur noch in drei Linien nachweisbar war. Jiang et al. (2016) konnten hingegen in vier von neun transgenen Petunien Linien eine signifikante Reduktion von *PhMLO1* mittels RNAi nachweisen. Pessina et al. (2016a) haben Wein mit vier verschiedenen RNAi Konstrukten für die Regulation von *VvMLO6*, *VvMLO7*, *VvMLO11* und *VvMLO13* transformiert. In drei von elf Linien mit dem *VvMLO11*-RNAi Konstrukt und drei von neun Linien mit dem *VvMLO13*-RNAi Konstrukt konnte ein Knock-down des jeweiligen *MLO* Gens festgestellt werden. In Linien der *VvMLO6*- und *VvMLO7*-RNAi Konstrukte konnte hingegen keine Reduktion der Expression festgestellt werden (Pessina et al. 2016a). Diese Beispiele und insbesondere das des Weins zeigen, dass RNAi Silencing mit *MLO* Genen durchaus mit komplexen Schwierigkeiten ver-

bunden ist, die in dem Expressionsniveau, der Induzierbarkeit der Gene oder auch weiteren Ursachen begründet sein können. Bei den RNAi Versuchen mit Apfel wird deutlich, dass mitunter viele Linien analysiert werden müssen, um einen Silencing-Effekt nachzuweisen, der zudem nicht immer stabil nachweisbar ist (Pessina et al. 2016b). In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 24 RhMLO-RNAi Linien untersucht. Unter Berücksichtigung der Funktionalität der Konstrukte und der Ergebnisse von Jiang et al. (2016), Pessina et al. (2016a) und Schmidt et al. (2012) mit Tabak, kann diese Anzahl als ausreichend betrachtet werden, um funktionelle Knock-down Linien – sofern vorhanden – identifizieren zu können. Eine weitere Erklärung im Ausbleiben des Effekts der RNAiKonstrukte kann in der starken Induzierbarkeit der *RhMLO* Expression liegen, die auch zu der hohen Variabilität in der Expression der Linien zwischen den einzelnen Versuchswiederholungen geführt hat. Obwohl bei der Probenahme darauf geachtet wurde, homogenes Pflanzenmaterial zu sammeln (gleiches Entwicklungsstadium der Blätter, gleiche Tageszeit, sofortiges Überführen in flüssigen Stickstoff) und auch bei den molekularen Analysen Einflüsse auf RNA und cDNA möglichst vermieden wurden (frische cDNA Synthese für jede Reaktion aus RNA Aliquots, kein wiederholtes Einfrieren und Auftauen von RNA und cDNA, zügiges Arbeiten auf Eis), ließ sich die Variation in der Expression nicht verhindern.

Eine Erklärung für das Ausbleiben eines detektierbaren Silencing-Effekts in den stabil transgenen Linien wäre daher, dass die starke Induzierbarkeit der *RhMLO* Gene einen möglicherweise schwachen und dosisabhängigen Knock-down der Gene überlagert hat und somit nicht statistisch nachweisbar gemacht hat. Hinzu kommt, dass der hier verwendete Vektor mit flankierenden 35S Promotoren zur Regulierung von niedrig exprimierten *MLO* Genen weniger geeignet zu sein scheint, als RNAi Kassetten, die auf einem *inverted repeat* des Gens basieren (Jiang et al. 2016, Pessina et al. 2016a, Pessina et al. 2016a).

## 4.2.2 Quantitative Inokulationsversuche

### 4.2.2.1 Quantitative Inokulationsversuche der transienten Transformation von Petalen

Der Einfluss des *RhMLO* Silencings auf die Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau wurde mittels Agro-Infiltration im transienten System getestet. Hierzu wurden Petalen der Rosensorte 'Pariser Charme' transient mit einer *Agrobacterium*-Suspension der RhMLO-RNAi Konstrukte gemischt, mit einem dsRed Reporter-gen-Konstrukt infiltriert und sechs Tage später mit einer Sporensuspension von *P. pannosa* inokuliert. Die Inokulationen wurden nach drei Tagen quantitativ auf den Infektionserfolg hin ausgewertet. Die Expressionsanalysen der Versuche zur Bestimmung des Gen-Silencings nach sechs Tagen wurden bereits in Abschnitt

4.2.1.1 diskutiert. Die statistische Analyse ergab, dass die mit den Konstrukten von RhMLO1-RNAi und RhMLO2-RNAi infiltrierten Petalen einen signifikant geringeren Anteil an Konidien mit Myzelbildung aufwiesen als die Kontrolle (GUS-RNAi). Auch Petalen, die mit dem Konstrukt RhMLO3/4-RNAi infiltriert wurden, wiesen einen reduzierten Anteil an myzelbildenden Sporen im Vergleich zur Kontrolle auf. Dieser konnte jedoch nicht als statistisch signifikant bestätigt werden (p-Wert: 0.1517). Auffällig ist, dass die Reduktion des Anteils myzelbildender Konidien, also die Erhöhung der Resistenz, bei den RhMLO1-RNAi Proben mit einem p-Wert von 0.0116 ausgeprägter war als bei den Proben von RhMLO2-RNAi (p-Wert: 0.0329).

Die Versuche der transienten Expression von RNAi Konstrukten in Petalen mit anschließender Inokulation stellen ein künstliches System dar, welches nicht ohne weiteres übertragbar ist. Durch die Agro-Infiltration der abgenommenen Petalen kommen sowohl biotische als auch abiotische Stressoren zum System (Pflanze-Pilz) hinzu, die unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen. So konnten zum Beispiel Santos-Rosa et al. (2008) einen Effekt der Agro-Infiltration auf die Infektionsraten des Falschen Mehltaus bei Wein feststellen. Auch die Lagerung der Petalen von insgesamt neun Tagen bis zur Auswertung stellt einen Faktor dar, der die Ergebnisse beeinflussen kann. Die transiente Expression zur funktionellen Charakterisierung von Genen ist jedoch, insbesondere für schwer zu transformierende Arten, aber auch in leichter zugänglichen Systemen, eine Methode, welche zur schnellen Charakterisierung oder Vor-Screenings von vielversprechenden Konstrukten verwendet wird (Bendahmane et al. 2000, Tang et al. 1996, Santos-Rosa et al. 2008). So konnten zum Beispiel Guan et al. (2011) mittels transientser Überexpression einer Glyoxal Oxidase (*VpGLOX*) aus *Vitis pseudoreticulata* in Wein und anschließender Inokulation mit *Erysiphe necator*, dem Erreger des Echten Mehltaus, eine Erhöhung der Resistenz nachweisen. Die gute Einsatzmöglichkeit von Petalen der Rosensorte 'Pariser Charme' für Agro-Infiltrationsversuche wurden mit Hilfe des *GUS* Reportergens von Yasmin und Debener (2010) beschrieben. Aufbauend darauf konnten Terefe-Ayana et al. (2011) durch transientes Silencing des *Rdr1* Gens in Petalen von *R. hybrida* die Verminderung der Resistenz gegenüber dem Sternrußtau nachweisen. Da Petalen auch in der Natur vom Echten Mehltau befallen werden, können sie zur Untersuchung der Anfälligkeit im transienten System herangezogen werden. Wheeler (1978) beschreibt, dass Petalen, mehr noch als junge Blätter, besonders anfällig gegenüber dem Echten Mehltau sind. Diese stärkere Anfälligkeit hat jedoch keinen Einfluss auf die ermittelten Ergebnisse, sondern ermöglicht vielmehr die leichtere Beobachtung einer potenziell erhöhten Resistenz.

Da Santos-Rosa et al. (2008) nachgewiesen haben, dass die Infiltration mit *A. tumefaciens* an sich schon grundlegende Abwehrreaktionen in den Pflanzenzellen auslösen kann und ferner Page und Angell (2002) belegt haben, dass auch bestimmte Reportergenkonstrukte die Expression von endogenen Genen beeinflussen können, war für die Bewertung der Ergebnisse der vorliegende Untersuchung die Wahl der richtigen Kontrolle essentiell. Um Einflüsse der Behandlung der Petalen, der Infiltration mit *A. tumefaciens*, des Reportergenkonstrukts und auch des RNAi-Vektors auszuschließen, wurden als Kontrollen Petalen mit dem GUS-RNAi Konstrukt (Teilfragment des *GUS* Gens zwischen den flankierenden 35S Promotoren) gemischt mit dem dsRed Konstrukt infiltriert. Vergleiche mit nicht-infiltrierten oder nur mit Wasser infiltrierten Petalen wären, aufgrund der verschiedenen Einflüsse auf das System, nicht zulässig gewesen.

Durch die Ergebnisse der Agro-Infiltration mit anschließender Inokulation konnte somit für alle vier untersuchten *RhMLO* Gene ein Effekt auf die Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau in Rosen nachgewiesen werden – wobei die Herunterregulierung mittels RNAi zu einer erhöhten Resistenz geführt hat. Für den Knock-down von *RhMLO1* konnte der größte Effekt auf die Resistenzentwicklung nachgewiesen werden, gefolgt von *RhMLO2*. Die Herunterregulierung der Kombination von *RhMLO3* und *RhMLO4* wies einen schwächeren Effekt auf die Resistenzentwicklung in 'Pariser Charme' gegenüber dem Echten Mehltau auf. Ob sich dieser nur auf eins der beiden Gene oder beide zusammen begründet, lässt sich anhand der Daten nicht feststellen. Aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung beider Gene, ist eine funktionelle Übereinstimmungen jedoch höchst wahrscheinlich.

#### 4.2.2.2 Quantitative Inokulationsversuche der RhMLO-RNAi Linien

Trotz der unklaren, beziehungsweise schwer zu interpretierenden, Ergebnisse der Expressionsanalysen der RhMLO-RNAi Linien, wurden von jedem RNAi Konstrukt fünf Linien für die Durchführung quantitativer Inokulationsexperimente mit dem Erreger des Echten Mehltaus ausgewählt. Die Analyse der Daten offenbarte eine große Streuung der Werte, was zu signifikanten Unterschieden in den Ergebnissen zwischen den einzelnen Versuchswiederholungen führte. Beispielsweise konnten bei der dritten Wiederholung der Inokulationsexperimente durchschnittlich höhere Infektionsraten beobachtet werden, als bei der ersten Wiederholung. Des Weiteren schwankten die Ergebnisse der einzelnen Linien signifikant zwischen den Wiederholungen der Versuche. Über alle drei Versuchswiederholungen konnte nur bei den Linien 1C8 (*RhMLO1*-RNAi), 2C4 und 2C12 (*RhMLO2*-RNAi) eine signifikante Reduktion der Konidien mit Myzelwachstum im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden.

Keine der Linien von RhMLO3/4-RNAi wies über alle Wiederholungen eine signifikante Reduktion an myzelbildenden Konidien auf. Bei einzelnen Linien konnte in einzelnen Wiederholungen eine signifikante Reduktion der Myzelbildungsraten festgestellt werden (z.B. 1C4, 2C3, 2/4E2). Dieser Trend ließ sich in anderen Wiederholungen nicht erkennen oder wurde sogar umgekehrt, so dass höhere Infektionsraten im Vergleich zur Kontrolle auftraten. Somit ist eine schlüssige Bewertung der Ergebnisse der Inokulationen der untersuchten RhMLO-RNAi Linien aufgrund der großen Streuung der Daten und der inkonsistenten Ergebnisse der untersuchten Linien über die Versuchswiederholungen hinweg schwierig.

Bei der Betrachtung der Daten aller untersuchten Linien des jeweiligen RhMLO-RNAi Konstrukts über alle Versuchswiederholungen hinweg, konnte für alle drei RhMLO-RNAi Konstrukte eine signifikante Reduktion in der Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau im Vergleich zu den beiden Kontrollen (nicht-transgene 'Pariser Charme' und transgene Vektorkontrolle) festgestellt werden. Auffällig ist hierbei, dass die Ausprägung der Signifikanz bei den Linien von RhMLO1-RNAi am stärksten ausfällt, gefolgt von den Linien von RhMLO2-RNAi. Die Reduktion der Anfälligkeit in der Gruppe von RhMLO3/4-RNAi konnte nur noch schwach signifikant nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen für alle untersuchten *RhMLO* Gene einen Effekt auf die Anfälligkeitsvermittlung gegenüber dem Echten Mehltau auf. Auch wenn bei den Expressionsanalysen kein signifikanter Effekt in der Reduktion der Expression der *RhMLO* Gene in den einzelnen Linien nachgewiesen werden konnte, so deuten diese Ergebnisse auf ein in Teilen erfolgreichen Knock-down der Gene hin, der sich durch die zusammengefassten Daten der untersuchten Linien offenbart. Hierdurch scheint die Streuung der Daten zum Teil kompensiert werden zu können. Des Weiteren decken sich diese Ergebnisse in ihrer Ausprägung mit denen der transienten Agro-Infiltrationsversuche mit Petalen (siehe 4.2.2.1). Auch hier konnte für die Behandlung mit RhMLO1-RNAi eine höhere Signifikanz als für die Behandlung mit RhMLO2-RNAi nachgewiesen werden. Im transienten System konnte die Behandlung mit RhMLO3/4-RNAi nicht als signifikant festgestellt werden, jedoch war auch hier eine Reduktion in der Anfälligkeit sichtbar. Somit weist die Reduktion der Anfälligkeit bei beiden Systemen die gleiche Tendenz für die *RhMLO* Gene auf.

Diese schwer zu interpretierenden Ergebnisse der einzelnen Linien resultieren aber nicht nur aus der großen Streuung der Daten, sondern auch aus der Variabilität der Daten zwischen den Versuchswiederholungen. Da das Silencing der *RhMLO* Gene mittels RNAi nicht vollständig ist, und in diesem Fall auch nicht besonders stark ausgeprägt, weisen die transgenen Linien immer noch eine Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau auf. Die verschieden starke

Ausprägung der Anfälligkeit zwischen den Versuchswiederholungen kann in dem verwendeten Inokulum begründet sein. Für die Herstellung der Sporensuspension wurden mit Echtem Mehltau befallene Blätter von 'Pariser Charme' Pflanzen aus dem Gewächshaus gesammelt. Die Infektion der Pflanzen im Gewächshaus wurde zum einen durch ein Einsporisolat initiiert, welches *in vitro* auf 'Pariser Charme' etabliert und vermehrt wurde (nach Linde und Debener 2003), und zum anderen aus dem natürlich auftretenden Befall der 'Pariser Charme' Pflanzen im Gewächshaus. Durch die zeitliche Trennung der Wiederholungen könnte somit ein Sporengemisch unterschiedlicher Rassen des Pathogens aufgebracht worden sein. Die Zusammensetzung dieses Gemischs wies zwar jeweils einen identischen Pathotyp (aus der *In-vitro*-Kultur) auf, abgesehen von diesem kann sie sich jedoch zwischen den Versuchen unterschieden haben. *P. pannosa* stellt ein stark Rassen-bildendes Pathogen dar, welches sich durch eine hohe genetische Diversität innerhalb der Population auszeichnet (Wolfe und McDermott 1994, Linde und Debener 2003, Leus et al. 2006). Moghaddam et al. (2013) stellten in ihren Untersuchungen an einer diploiden Kreuzungspopulation von Rosen fest, dass die Resistenzreaktion der Rosen nicht nur vom Genotyp der Pflanze bestimmt, sondern auch Pathotyp-spezifisch ist. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Differenzen in der Anfälligkeit der Pflanzen zwischen den Versuchswiederholungen auch durch eine unterschiedliche Zusammensetzung an Pathotypen von *P. pannosa* herrühren. Ein weiterer Grund für die Variation der Daten kann in der Anwendung der Sprühapplikation begründet sein. Die Sporen von *P. pannosa* benötigen eine hohe relative Luftfeuchte für eine erfolgreiche Infektion der Zellen, offenes Wasser auf der Blattoberfläche in den ersten Stunden der Infektion hingegen beeinträchtigt dies (Butt 1978, Horst und Cloyd 2007, Linde und Shishkoff 2003). Bei der Aufnahme der Sporen in die Flüssigkeit, über den Vorgang des Sprühens bis hin zur Trocknung der Blätter, wurde daher auf eine möglichst zügige Durchführung geachtet. Wenn auch bei Butt (1978) berichtet wird, dass innerhalb von drei Minuten in Wasser rund 50 % der Konidien des Echten Mehltau Erregers deaktiviert wurden, so konnten in der vorliegenden Arbeit nach 20 Minuten mittels Phenosafranin-Färbung noch mindestens 2/3 der Konidien als lebend nachgewiesen werden. Bei jedem der Versuche konnte innerhalb von 20 Minuten die Aufnahme, Inokulation und Abtrocknung der Blätter mittels Luftzug realisiert werden. Wenn auch nicht mehr alle Konidien nach dieser Zeit vital waren, reichte deren Zahl aus, um eine ausreichend starke Infektion für die Auswertung zu gewährleisten. Unterschiede in der Infektionsstärke zwischen den Versuchswiederholungen können jedoch, aufgrund der Durchführung sowie leichter Schwankungen in der Dauer bis zum vollständigen Abtrocknen der Sporensuspension auf den Blättern, nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Auch Yan et al. (2006) be-

richten über den erfolgreichen Einsatz einer Sprühapplikation mit Sporensuspensionen von *P. pannosa* an Rosen. Die Autoren betonen jedoch die Notwendigkeit einer zügigen Ausführung der Flüssiginokulation.

Neben dem Inokulum kann auch das getestete Blattmaterial einen Teil zur Variabilität der Ergebnisse beitragen. Der physiologische Status der beprobten Pflanzen für die Inokulationsversuche wurde durch die streng kontrollierten Bedingungen in der Phytokammer möglichst uniform gehalten. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass durch nicht näher zu charakterisierende Effekte die Pflanzen zum Teil einen abweichenden physiologischen Status aufwiesen, der zu abweichenden Ergebnissen in der Mehltau-Anfälligkeit geführt hat. So konnte in Versuchen mit Gerste gezeigt werden, dass *mlo*-resistente Pflanzen die einem Trockenstress ausgesetzt waren, welcher durch plötzliche Bewässerung wieder aufgehoben wurde, eine moderate Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau aufwiesen (Newton und Young 1996, Baker et al. 1998). Nicht nur der physiologische Status der Pflanze, sondern auch das Blattalter kann einen entscheidenden Einfluss auf die Befallsstärke des Echten Mehltaus ausüben. Ältere Blätter weisen eine höhere Resistenz gegenüber *P. pannosa* auf als jüngere Blätter (Wheeler 1978, Frinking und Verweij 1989, Hijwegen et al. 1996, Moghaddam et al. 2013). Dies konnte auch in Vorversuchen mit *R. hybrida* bestätigt werden, weshalb bei der Probennahme darauf geachtet wurde, Fiederblätter von derselben Position an den Pflanzen zu entnehmen. Trotz der gleichen Blattposition, wiesen manche Blätter morphologische Unterschiede wie Größenunterschiede oder verschieden starke Chlorophyll-Pigmentierungen auf, was auf ein leicht unterschiedliches Alter und divergierenden physiologischen Status der Blätter hindeuten könnte. Diese marginalen Unterschiede könnten die beobachteten Infektionsstärken beeinflussen und somit auch zu der Variation der Linien zwischen den Versuchswiederholungen beigetragen haben.

Es ist daher zu vermuten, dass die Variabilität der Ergebnisse durch eine Kombination der genannten Einflussfaktoren hervorgerufen wurde, die sich in ihrer Mannigfaltigkeit nicht völlig ausschließen lassen. Auch Moghaddam et al. (2013) konnten in ihren Versuchen Variationen im Krankheits-Index der untersuchten Kreuzungslinien mit den Echten Mehltau feststellen. Hier vermuten die Autoren ebenfalls, dass der physiologische Status des Blattmaterials und das Inokulum für diese Effekte verantwortlich waren. Diese natürliche Variation in den Experimenten kann nur durch eine genügend hohe Anzahl an Wiederholungen ausgeglichen, beziehungsweise reduziert werden (Moghaddam et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche dreimal wiederholt, Moghaddam et al. (2013) hingegen haben fünf Wiederholungen durchgeführt. Linde und Debener (2003) wiederholten Inokulationsexperimente an

Rosen mit *P. pannosa* drei bis fünf Mal und Linde et al. (2004) insgesamt fünf bis acht Mal, um die Variabilität der Daten zu reduzieren. Zu erwähnen ist, dass bei den oben genannten Studien die Inokulation mittels Druckluft in einem Inokulationsturm durchgeführt wurde und nicht, wie bei der vorliegenden Studie, mittels Sprühapplikation. Die Sprühapplikation wurde jedoch gewählt, um eine gleichmäßigere Verteilung der Sporen und somit einen gleichmäßigeren Befall zu gewährleisten. Die drei Wiederholungen haben im vorliegenden Fall nicht ausgereicht, um einen eindeutigen Effekt für einzelne Linien nachzuweisen. Allerdings konnte auch bei den Expressionsanalysen keine eindeutige Herunterregulierung der *RhMLOs* in den transgenen Linien nachgewiesen werden. Es bleibt fraglich, ob hier bei mehrfacher Wiederholung ein deutlicher Effekt tatsächlich sichtbar geworden wäre. Es scheint eher, dass die Reduktion der Expression der *RhMLOs* durch das RNAi Konstrukt zu schwach beziehungsweise nicht ausreichend war, um einen stabilen Effekt bei einzelnen Linien nachweisen zu können. Bei der Betrachtung der Daten aller Linien eines *RhMLO*-RNAi Konstrukts konnten jedoch signifikante Effekte festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass der geringe Effekt der *RhMLO*-RNAi Konstrukte auf das Silencing der *RhMLO* Gene im stabilen Transformationssystem durch eine Erhöhung der Probenzahl zum Teil ausgeglichen werden konnte, so dass der Effekt nachweisbar wurde.

#### 4.2.2.3 Rolle der *RhMLOs* in der Anfälligkeitsvermittlung gegenüber *P. pannosa*

Die Rolle bestimmter *MLO* Gene in der Vermittlung der Anfälligkeit gegenüber dem Erreger des Echten Mehltaus wurde in diversen Pflanzenarten beschrieben. Neben Gerste, in der die *MLO*-Funktion erstmals beschrieben wurde (Jorgensen 1992, Büschges et al. 1997) konnte auch in *A. thaliana*, Tomate, Erbse und Weizen die Funktion bestimmter Vertreter der *MLO* Genfamilie in der Vermittlung der Mehltau-Anfälligkeit mittels Knock-out Varianten nachgewiesen werden (Acevedo-Garcia et al. 2017, Bai et al. 2008, Pavan et al. 2011, Humphry et al. 2011, Wang et al. 2014, Zheng et al. 2016). Auch in weiteren Arten wurden *MLO* Gene mittels Knock-down- und/oder Komplementations-Analysen charakterisiert und eine Funktion in der Vermittlung der Anfälligkeit dem Echten Mehltau gegenüber beschrieben: u.a. Tabak, Apfel, Wein, Petunie und Gurke (Appiano et al. 2015, Berg et al. 2015, Jiang et al. 2016, Pessina et al. 2016a, Pessina et al. 2016b). Die vorliegende Arbeit hat für insgesamt vier *RhMLO* Gene einen Effekt auf die Vermittlung der Anfälligkeit von *R. hybrida* 'Pariser Charme' gegenüber *P. pannosa* nachgewiesen. In vielen Arten wurde ein einzelnes *MLO* Gen aus der *MLO* Genfamilie als funktionell für die Vermittlung der Anfälligkeit beschrieben. In *A. thaliana* hingegen ist der simultane Knock-out von drei Genen (*AtMLO2*, *AtMLO6*,

*AtMLO12*) nötig, um eine vollständige Resistenz zu erreichen (Consonni et al. 2006). Hierbei wurde *AtMLO2* als das Hauptgen für die Anfälligkeitsvermittlung beschrieben; *AtMLO6* und *AtMLO12* haben einzeln nur einen schwachen Effekt (Consonni et al. 2006). In Tomate wurde lange Zeit ein einzelnes Gen (*SIMLO1*) als funktionell in der Vermittlung der Mehltau-Anfälligkeit erachtet (Bai et al. 2008, Seifi et al. 2014). Neueste Untersuchungen zeigten jedoch, dass auch hier zwei weitere Gene derselben Klade, nämlich *SIMLO5* und *SIMLO8*, an der Mehltau-Reaktion beteiligt sind. Die gleichzeitige Herunterregulierung der drei *SIMLO* Vertreter führte zu einer höheren Resistenz der Tomaten Linien gegenüber dem Echten Mehltau, verglichen mit der Regulierung von *SIMLO1* allein (Zheng et al. 2016). Auch in Apfel und Wein deuten Ergebnisse darauf hin, dass mehr als ein Vertreter aus Klade V der *MLO* Genfamilie in der Vermittlung der Anfälligkeit beteiligt ist (Pessina et al. 2016a, Pessina et al. 2017). Somit ist die Beteiligung aller vier *RhMLO* Gene aus Klade V kein Alleinstellungsmerkmal von Rosen, sondern deckt sich vielmehr mit den Beobachtungen aus anderen dikotylen Arten. Anders als bei *A. thaliana* und Tomate kann jedoch bisher keines der *RhMLO* Gene klar als Hauptgen identifiziert werden. *RhMLO1* weist sowohl im transienten als auch im stabilen System den stärksten Effekt auf die Anfälligkeitsvermittlung auf, ist jedoch nicht klar dominant gegenüber *RhMLO2*. Im Vergleich dazu scheinen *RhMLO3* und *RhMLO4* selbst in Kombination einen schwächeren Effekt auf die Anfälligkeitsvermittlung gegenüber dem Erreger des Echten Mehltaus auszuüben. Interessanterweise beschreiben Kaufmann et al. (2012), dass bei *RhMLO3* und *RhMLO4* das für die in der Mehltau-Anfälligkeit beteiligten *MLO* Gene diagnostische Tetrapeptid-Motiv im C-Terminus mit einer Aminosäure abweicht (S-F-S-F anstelle von D/E-F-S/T-F). Ob dies ein Hinweis auf eine geringere Beteiligung der beiden Gene in der Anfälligkeits-Vermittlung von Rosen ist, bleibt spekulativ, da dem Motiv als solches bislang keine Funktion nachgewiesen werden konnte.

Qiu et al. (2015a) haben in ihren Untersuchungen an *R. hybrida* 'Baiyu' lediglich einen Effekt von *RhMLO1* auf die Vermittlung der Anfälligkeit dem Echten Mehltau gegenüber beschrieben. Die Autoren untersuchten in der Studie das Silencing und dessen Auswirkung von *RhMLO1* mittels eines stabil übertragenden RNAi Konstrukts. Wie bereits unter 4.2.1.2 beschrieben, ist hier jedoch begründet zu vermuten, dass nicht nur *RhMLO1* in der Expression reguliert wurde, sondern dass auch bei weiteren nah verwandten Vertretern der *RhMLO* Genfamilie ein Knock-down der Expression vorlag. Die Betrachtung der starken Reduktion der Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau der von Qiu et al. (2015a) beschriebenen Linien, lässt ebenfalls die Schlussfolgerung zu, dass hier mehrere *RhMLO* Gene reguliert wurden, deren kollektiver Knock-down einen starken Effekt auf die Anfälligkeit der Linien ausübte. Aus

den veröffentlichten Daten von Qiu et al. (2015a) gehen keine Angaben über Versuchswiederholungen der quantitativen Inokulation hervor. Zudem wurden, neben weiteren Mängeln im Design der Studie, pro Probe jeweils nur „mindestens 100 Konidien“ von *P. pannosa* ausgewertet. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass nur eine Versuchswiederholung durchgeführt wurde, und diese mit einer nicht definierten Anzahl von rund 100 Konidien ausgewertet wurde. Diese Datengrundlage ist aufgrund der hohen, durch seine Biologie bedingten, Variabilität des Systems (siehe 4.2.2.2), nicht ausreichend, um belastbare Aussagen zu treffen. Daher sind die Ergebnisse der Analysen von Qiu et al. (2015a) mit Vorbehalt zu interpretieren. Hinzu kommt, dass in einer früheren Veröffentlichung der selben Autoren die Expression beziehungsweise Induktion der vier *RhMLO* Gene aus Klade V durch die Infektion mit Echtem Mehltau untersucht wurde (Qiu et al. 2015b). Hier beschrieben die Autoren eine Induktion der Expression von *RhMLO1* und *RhMLO2* durch die Infektion mit *P. pannosa*. Diese Induktion konnte hingegen nicht für *RhMLO3* und *RhMLO4* festgestellt werden. Qiu et al. (2015b) schlussfolgerten daraus, dass *RhMLO1* und *RhMLO2* in der Anfälligkeits-Vermittlung beteiligt sein könnten, nicht aber *RhMLO3* und *RhMLO4*. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Analysen deuten darauf hin, dass in Rosen der Knock-out aller vier *RhMLO* Gene aus Klade V für eine vollständige Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau nötig sein könnten. Die Literatur, wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie, stützen diese Vermutung. Diese ließe sich experimentell durch die Erzeugung von mehrfach Knock-out Mutanten, zum Beispiel durch die Anwendung von Genome Editing Methoden wie CRISPR/Cas9 oder TALENs, nachweisen.

Die genaue biologische Funktion der MLO Proteine in der Vermittlung der Anfälligkeit gegenüber den Erregern des Echten Mehltaus ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Eine Funktion der MLO Proteine im SNARE-Protein-basierten und Vesikel-assoziierten Abwehrmechanismus der Zelle zur Bildung von Papillen sowie starke Hinweise auf die Funktion als Transporter und/oder Regulatoren von molekularen Prozessen konnte beschrieben werden (Hückelhoven und Panstruga 2011, Panstruga 2005b, Kusch et al. 2016). In der Literatur wird bei Pflanzen-Pathogen-Systemen, in denen mehr als ein *MLO* Gen in der Mehltau-Reaktion beteiligt ist, von einer redundanten oder partiell redundanten Funktion der *MLO* Gene gesprochen (Consonni et al. 2006, Kusch et al. 2016, Zheng et al. 2016). Diese Erklärung scheint im vorliegenden Fall nicht schlüssig zu sein. Wäre die Funktion der *RhMLO* Gene redundant, müsste beispielsweise die Herunterregulierung von *RhMLO1* durch die Expression von *RhMLO2*, *RhMLO3* und *RhMLO4* komplementiert werden und folglich ein Effekt auf die Resistenz ausbleiben. Daher ist hier eher von einem additiven Effekt auszugehen, bei dem das

Zusammenspiel aller vier *RhMLO* Gene aus Klade V für eine vollständige Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau notwendig ist. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in der Bildung von Hetero-Dimeren oder Hetero-Oligomeren der MLO Proteine liegen. Elliott et al. (2005) konnten in ihren Untersuchungen mittels FRET-Analysen (FRET: Förster Resonanz Energie Transfer) eine mögliche Dimerisation oder auch Oligomerisation von MLO Proteinen in Gerste nachweisen. Die Autoren vermuten, dass in Gerste Homo-Oligomere von HvMLO gebildet werden und diese zur Anfälligkeitsvermittlung von Gerste gegenüber dem Echten Mehltau beitragen. Die Analysen der vorliegenden Arbeit belegen, dass in Rosen, anders als in Gerste, mehr als ein Vertreter der *MLO* Genfamilie an der Vermittlung der Anfälligkeit beteiligt ist. Folglich ist es möglich, dass sich die Dimer/Oligomer-Zusammensetzung aus unterschiedlichen Kombinationen von RhMLO1, RhMLO2, RhMLO3 und RhMLO4 Proteinen zusammensetzt. Entsprechend könnten Hetero-Dimer/Hetero-Oligomer-Komplexe von RhMLO Proteinen aus Klade V erfolgreicher korrumpierbar, sprich für den Pilz besser zugänglich, sein. Die Herunterregulierung nur eines der *RhMLO* Gene könnte zu einer veränderten Zusammensetzung der RhMLO-Komplexe führen und somit zu einer geringeren Anfälligkeit gegenüber *P. pannosa*. Aufgrund der veränderten Zusammensetzung der Proteinkomplexe kann dies die Expression der anderen *RhMLO* Gene aus Klade V nicht (oder nicht vollständig) komplementieren. Dies stellt jedoch nur eine Vermutung dar, die durch Analysen zur Bildung von RhMLO-Hetero-Dimeren/Hetero-Oligomeren und deren Einfluss auf die Anfälligkeit gegenüber dem Echten Mehltau erst noch zu belegen ist. Diese könnten, ähnlich wie bei Elliott et al. (2005), mittels FRET-Analysen erfolgen. Analysen von Iovieno et al. (2015) ergaben sowohl für den ersten extrazellulären Loop als auch den C-Terminus der MLO Proteine einen starken Hinweis auf Bereiche für Protein-Protein-Interaktionen aufgrund positiver Selektion. Die Autoren vermuten hier aber eher Bereiche für eine mögliche Pathogen-Identifikation durch Effektor-Erkennung. Konservierte Bereiche, die negativer Selektion unterliegen und essentiell für die Funktion der MLO Proteine sind, stellen daher eher mögliche Bereiche für die Dimerisation/Oligomerisation der MLO Proteine dar.

### **4.3 Einsatz von TALEN und CRISPR/Cas9 zur gezielten Mutation von *RhMLO* Genen in *R. hybrida***

Genome Editing Methoden – wie TALENs und CRISPR/Cas9 – ermöglichen die gezielte Mutagenese von Genen im Genom von Pflanzen. Auch wenn eine Vielzahl der Analysen in Eukaryonten sich auf humane Stammzellen und tierische Systeme beziehen, liegen mittlerweile eine große Anzahl an Publikationen zur Anwendung von Genome Editing Methoden an Pflan-

zen vor (siehe auch Malzahn et al. 2017). Die Mehrzahl dieser Studien befasst sich mit über Samen vermehrte Arten oder diploide und weitestgehend homozygote Pflanzen. Die Samenvermehrung, insbesondere bei Selbstbefruchtern, erlaubt eine schnelle Fixierung der induzierten Mutationen sowie das schnelle Auskreuzen der integrierten T-DNA. Dies erleichtert die Reduktion der Wahrscheinlichkeit von off-target Effekten und ermöglicht zudem die schnelle Generierung nicht-transgener Nachkommen. Für Arten die hingegen vegetativ vermehrt werden und polyploid sind, stellt dieses System größere Hürden dar. Wenn der Weg über die Keimbahn ausgeschlossen ist, um zum Beispiel wie bei Rosen die Sorte zu erhalten, ist die Möglichkeit schnell homozygot veränderte Pflanzen zu erhalten erschwert. Zum einen da dies nicht über Selbstungen erreicht werden kann und zum anderen wird das Erreichen von Homozygotie bei polyploiden Pflanzen zusätzlich durch das Vorliegen mehrere Genkopien erschwert. Bislang wurden lediglich an Kartoffeln Ergebnisse zur Anwendung von Genome Editing Methoden (TALEN und CRISPR/Cas) an vegetativ vermehrten und polyploiden Pflanzen veröffentlicht (Andersson et al. 2017, Butler und Douches 2016, Clasen et al. 2016, Forsyth et al. 2016, Nicolai et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Anwendbarkeit der gezielten Mutagenese mittels der Genome Editing Methoden TALEN und CRISPR/Cas9 in Rosen untersucht werden. Die *MLO* Gene stellen hier durch ihre potentiell funktionelle Bedeutung für die Züchtung resistenter Sorten und ihre Organisation in einer Multigenfamilie ein ideales System zur funktionellen Analyse dar.

#### 4.3.1 Transiente Analysen der TALEN und CRISPR/Cas Konstrukte

Die transiente Agro-Infiltration der TALEN und CRISPR/Cas Konstrukte in Petalen der Sorte 'Pariser Charme' sollte zum einen zur Analyse der Anwendbarkeit des transienten Systems zur Überprüfung der Funktionalität der Vektoren dienen. Zum anderen sollten mögliche Unterschiede in der Effizienz der TALEN und CRISPR/Cas Konstrukte der beiden Generationen ermittelt werden.

Mit dem TALEN Konstrukt TMlo3/4-2 konnten in drei Versuchswiederholungen mittels PAA-Gelelektrophorese Deletionen in der Wildtyp-Sequenz im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden. Diese Mutationsmuster deckten sich mit den in den stabil transgenen Linien beobachteten Mutationen – auch hier konnten nur Deletionen im überwiegend einstelligen Basenpaar-Bereich festgestellt werden. Hierauf wird in Kapitel 4.3.3 noch näher eingegangen. Der Vergleich des originären TMlo3/4-1 Konstrukts, mit welchem keine transgenen Linien regeneriert werden konnten, mit dem TMlo3/4-1\* Konstrukt, welches das gleichen TALEN-Paar jedoch im pBinPlus Hintergrund trug, ergab für beide kein abweichendes Ban-

denmuster zur Wildtyp-Bande im PAA-Gel. Mutationen in der Wildtyp-Sequenz und somit eine Funktionalität der Konstrukte konnten nicht nachgewiesen werden. Demnach scheint das Ausbleiben der Funktionalität unabhängig vom Vektor-Hintergrund zu sein, worauf auch die positiven Ergebnisse mit dem TMlo3/4-2 Konstrukt hindeuten. Was die Ursache für die fehlende Funktionalität des TMlo3/4-1 und TMlo3/4-1\* Konstrukts ist, bleibt spekulativ. Eine Ursache könnte sein, dass die TALEN-Bindestellen nicht spezifisch genug sind, nicht binden konnten und daher keine Mutationen durch den ausbleibenden Doppelstrangbruch gesetzt wurden. Allerdings konnten mit beiden Konstrukten auch keine stabil transgenen Linien erzeugt werden, was eher auf eine generelle Inkompatibilität hindeutet, da sich dies sowohl im originären als auch im pBinPlus Hintergrund zeigte. Auch mit dem TMlo3/4-2 Konstrukt, das im transienten Assay funktional war, konnten nur unterdurchschnittliche Transformationsraten bei den stabilen Transformationen erzielt werden. Wie schon an anderer Stelle diskutiert, regenerierten die Linien nur sehr langsam und wiesen einen abweichenden Phänotyp auf. Osborn et al. (2016) berichteten von toxischen Effekten in T-Zellen bei zu hoher TALEN-Konzentration. Dies könnte ebenfalls eine mögliche Erklärung sein, da bei der Agro-Infiltration eine sehr starke Expression der T-DNA verursacht wird. Allerdings konnten in den Agro-infiltrierten Petalen keine makroskopischen Beobachtungen gemacht werden, die auf toxische Effekte hindeuten. Das Konstrukt TMlo3/4-2 würde so auch eine Ausnahme von diesem Phänomen darstellen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass mögliche toxische Effekte im transienten System nicht detektiert werden, aber im stabilen System zur Ausprägung kommen könnten. Die möglichen Ursachen einer Inkompatibilität wurden schon an anderer Stelle ausführlich diskutiert.

Bei der transienten Untersuchung der CRISPR/Cas Konstrukte konnte in keiner der Wiederholungen der beiden Konstrukt-Generationen (1. 35S Promotor, 2. Ubiquitin Promotor) ein verändertes Bandenmuster zur Wildtyp-Sequenz durch die PAA-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Somit war weder der Nachweis der Funktionalität der Konstrukte, noch die Identifizierung möglicher Unterschiede in der Effizienz der beiden verwendeten Promotoren, möglich. Durch die stabil transgenen Linien konnte jedoch nachgewiesen werden, dass zumindest die Konstrukte CCMlo2 und CCMlo3/4 der ersten Generation (Cas9n unter Kontrolle des 35S Promotors) funktional waren und zu Mutationen in den Zielsequenzen führten. Hier scheint die Sensitivität des Nachweises mittels Agro-Infiltration und PAA-Gelelektrophorese nicht ausreichend gewesen zu sein, um mutierte Sequenzen festzustellen. Da die gleichen Bedingungen wie bei der Agro-Infiltration der TALEN Konstrukte vorlagen, lässt dies auf eine geringere Effektivität der CRISPR/Cas Konstrukte im Vergleich zu TMlo3/4-2 schließen.

Diese Tendenz konnte auch in den stabil transgenen Linien beobachtet werden. Damit scheint der Ubiquitin-Promotor der Konstrukte der zweiten Generation nicht zu einer – zumindest durch dieses System – messbaren Steigerung der Effektivität zu führen.

Diese negativen Ergebnisse zeigen die Schwäche des transienten Nachweises in Petalen auf: Die Sensitivität des Verfahrens ist nicht ausreichend, um die Funktionalität von Konstrukten mit geringeren Mutationsraten nachzuweisen. Hier könnten eine längere Inkubationszeit nach der Agro-Infiltration und/oder höhere Konzentrationen an Bakterien-Zellen zur Infiltration getestet werden. In der Literatur findet sich eine Vielzahl von alternativen Methoden zur transienten Analyse von TALEN und CRISPR/Cas Konstrukten. Eine einfache und wenig aufwendige Methode stellt hierbei die von Forsyth et al. (2016) beschriebene Funktionsanalyse dar. Dabei wurden Blätter von *N. benthamiana* transient mit einem TALEN-Vektor als auch mit einem Vektor, welcher die Zielsequenz des TALENs-Paares trug, Agro-infiltriert. Die Kulturen der beiden Vektoren wurden dazu 1:1 gemischt. Als Zielsequenz wurde das *GUS* Gen verwendet, welches durch das Einfügen eines Stop-Kodons inaktiv war. Bei erfolgreicher TALEN-Aktivität, wurde genau in diesem Bereich die Mutation gesetzt, so dass ein Anteil an Sequenzen wieder das aktive *GUS* Gen trug und die anschließende GUS Färbung positiv war (Forsyth et al. 2016). Johnson et al. (2013) beschreiben ein ganz ähnliches Verfahren in *N. benthamiana* unter Verwendung eines ZFN Vektors und des Luciferase Reporter-Gens. Verbreitet sind auch Funktionsanalysen in Hefe-basierten Systemen (z.B. Bogdanove und Voytas 2011, Townsend et al. 2009). Auch die hier verwendeten TALEN-Konstrukte wurden zunächst vom Kooperationspartner in einem Hefe-basiertem Assay nach Townsend et al. (2009) getestet. Dieser basierte auf einem nicht-funktionalen lacZ Promotor, welcher durch funktionale TALENs wieder aktiviert wurde, so dass die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase als Maß für die TALEN Aktivität gemessen werden konnte. Die hier verwendeten TALEN Konstrukte waren trotz positiver Testergebnisse in den meisten Fällen in Rosen nicht funktional. Hier könnte die Funktionsanalyse in Petalen von Rosen verlässlichere Aussagen liefern, da direkt im System der späteren Anwendung getestet wird. Ähnlich den Analysen von Kim et al. (2011) in humanen Zell-Linien, haben Liu et al. (2017) in Protoplasten von Rutenhirse (*Panicum virgatum* L.) erfolgreich die Aktivität des CRISPR/Cas9 Konstrukts durch Re-Aktivierung eines inaktivem *GFP* Reportergens (1bp Insertion in der Zielsequenz) getestet. So konnten die Autoren zwar die generelle Aktivität der Cas9 in der Pflanzenart feststellen, nicht jedoch die Effizienz auf das eigentliche Ziel-Gen. Clasen et al. (2016) hingegen haben in Protoplasten von Kartoffeln die Effizienz von drei TALEN Konstrukten auf das endogene Ziel-Gen getestet und mittels Amplikon-Sequenzierung (454 Pyro-Sequencing) von den drei

getesteten Konstrukten, jenes mit der höchsten Effizienz für weiterführende Versuche ausgewählt. Die Produktion von Protoplasten aus Rosen mit anschließender Transformation und Quantifizierung der Mutationsfrequenz ist im Vergleich zur Agro-Infiltration von Petalen und Analyse mittels PAA-Gelelektrophorese sehr aufwendig. Daher wäre die Ko-Infiltration der TALEN oder CRISPR/Cas Konstrukte mit Konstrukten, die die Zielsequenz tragen (Voll-Längen oder auch nur kürzere Abschnitte des Gens) in Petalen ein möglicher Ansatz zur optimierten Vor-Analyse. Die Überexpression der endogenen Zielsequenz könnte so eine wesentlich höhere Anzahl an mutierten Sequenzen liefern, die mittels PAA-Gelelektrophorese nachweisbar wären.

#### 4.3.2 Kaskaden-Vermehrung der stabil transgenen TALEN und CRISPR/Cas Linien

Alle getesteten TALEN und CRISPR/Cas Linien wiesen in den Analysen der Bindestellen noch Wildtyp-Sequenzen auf. Dies lässt darauf schließen, dass die Mutation der Allele des jeweiligen *RhMLOs* nur unvollständig war. Unter der Annahme, dass die Nukleasen in den Zellen noch aktiv vorlagen und bei intakter Zielsequenz weiterhin schneiden können, wurde mit ausgewählten Linien eine kaskadenartige Vermehrung über multiple Vermehrungsrunden durchgeführt. Hierbei sollte überprüft werden, ob weitere Mutationen in der Zielsequenz gesetzt oder angereichert werden können, um homozygote Pflanzen durch vegetative Vermehrung zu erhalten.

Von den für die Transformation eingesetzten TALEN Konstrukten gelang es nur mit dem Konstrukt TMlo3/4-2 Linien zu regenerieren, die vermehrungsfähig waren und für weiterführende Analysen zur Verfügung standen. Von diesen insgesamt fünf Linien wurden drei für die Kaskaden-Vermehrung ausgewählt (T3/4A/C/D). Alle diese Linien wiesen in der Analyse mittels PPA-Gelelektrophorese, neben der noch stark vertretenden Bande der Wildtyp-Sequenz, ein abweichendes Bandenmuster auf. Dieses war zwischen den drei Linien unterschiedlich. Bei allen drei Linien konnten ausschließlich Deletionen in der Sequenz von *RhMLO3/4* detektiert werden. Über die multiplen Vermehrungsrunden der Kaskade blieb bei allen Linien das Bandenmuster weitgehend konstant, insbesondere bei T3/4A konnte neben der 4 bp Deletion kein abweichendes Muster beobachtet werden. In den Linien T3/4C und T3/4D konnten leichte Veränderungen in der Zusammensetzung oder Intensität der zusätzlichen Banden detektiert werden. Einzig in der Linie T3/4D konnte eine Probe identifiziert werden, die zum Ende der Kaskade eine deutlich schwächere Wildtyp-Bande im Vergleich zu den übrigen Proben und damit eine potentielle Anreicherung von mutierten Allelen aufwies (Probe 1.1.2.1.x.).

Von den regenerierten Linien des CRISPR/Cas Konstrukts CCMlo1 konnten bei keiner der beiden in der Kaskade eingesetzten Linien nach zwei Vermehrungsschritten eine Mutation der Wildtyp-Sequenz von *RhMLO1* nachgewiesen werden. Auch in weiteren regenerierten Linien konnte keine Veränderung des Bandenmusters, was auf eine Funktionalität hindeuten würde, festgestellt werden. Somit scheint das Konstrukt nicht funktional in der Induktion von Doppelstrangbrüchen gewesen zu sein. Dies könnte an einer ungünstigen Sequenz der sgRNAs des Konstrukts gelegen haben, wobei schon eine nicht-funktionale sgRNA ausreichen würde, um die Funktionalität zumindest stark einzuschränken. Ist nur eine der beiden sgRNA in der Lage die Cas9n zur *RhMLO1* Sequenz zu leiten, könnte nur ein Einzelstrangbruch induziert werden. Fauser et al. (2014) konnten in *A. thaliana* nachweisen, dass ein Einzelstrangbruch durch Cas9n im Vergleich zum Doppelstrangbruch durch native Cas9 die Mutationsfrequenz um mindestens das 740-fache reduziert. Daher ist davon auszugehen, dass die Sensitivität des Nachweises über PAA-Gele nicht ausreichend ist, um derart geringe Effizienzen innerhalb weniger Vermehrungsschritte nachzuweisen. Selbst wenn beide sgRNA funktional aber wenig effizient wären, könnte es sein, dass die Sensitivität des Nachweises nicht ausgereicht hat, um Mutationen zu detektieren.

In den Kaskaden beider Linien des Konstrukts CCMlo2 konnten Mutationen in der Sequenz von *RhMLO2* in Form von Deletionen und Insertionen im niedrigen ein- bis zweistelligen Basenpaar-Bereich nachgewiesen werden. Bei CC2B traten diese jedoch erst nach dem zweiten Vermehrungsschritt auf. In der Ausgangsprobe sowie den Proben nach der ersten Vermehrung, konnten keine abweichenden Bandenmuster detektiert werden. Die Linie CC2C konnte nur einmal vermehrt werden. Hier standen zwei Ausgangsproben zur Verfügung, von denen nur eine Mutationen aufwies. Dies lässt darauf schließen, dass es zumindest bei CC2B zu einer Anreicherung mutierter Allele über die vegetativen Vermehrungsschritte in der Linie kam, die in den ersten beiden Schritten der Kaskade noch unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Ob diese Anreicherung letztlich auf die Nuklease-Aktivität zurückzuführen ist oder es durch die Teilung von Bereichen mit höherem Anteil an Mutationen von solchen mit geringerem Mutationsanteil und somit zu einer lediglich prozentualen Anreicherung bestimmter Mutationen kam, kann anhand dieser Daten nicht eindeutig bestimmt werden.

Bei den Kaskaden von CCMlo3/4 wies nur die Linie CC3/4A Mutationen in Form von Insertionen auf. Diese waren bereits in der Ausgangsprobe zu erkennen, reicherten sich aber über die zwei Vermehrungsschritte stark an, so dass eine der beiden typischen Wildtyp-Doppelbanden nicht mehr auf dem PAA-Gel nachgewiesen werden konnte. Bei der Analyse weiterer Linien von CCMlo3/4 konnten ausschließlich Mutationen in Form von Insertionen nachgewie-

sen werden, während bei den Linien von CCMlo2 sowohl Insertionen als auch Deletionen detektiert wurden. Hierauf wird in Kapitel 4.3.3 näher eingegangen. Ob die Anreicherung der mutierten Allele durch die fortschreitende Nuklease-Aktivität oder die Trennung von stärker mutierten Bereichen von schwächer mutierten Bereichen über die Sprosssteilung erfolgte, kann wie bei den Linien von CCMlo2, anhand der PAA-Gele nicht bestimmt werden.

Die Bildung von Mosaiken mit unterschiedlichen somatischen Mutationen, ohne dass ein vollständiger Knock-out aller Allele erreicht wird, ist ein Phänomen, das in Genome Editing Ansätzen mit polyploiden Pflanzen häufig, aber auch in einigen diploiden Arten (zum Beispiel Nakajima et al. 2017) nachgewiesen wurde. Die transiente Transformation von Protoplasten tetraploider Kartoffeln mit CRISPR/Cas Konstrukten ergab nur in 2% der untersuchten Linien den Knock-out aller vier Allele des *GBSS* Gens (*granule-bound starch synthase*), wohingegen in 2–12 % mindestens ein Allel und in 67 % multiple Allele mutiert vorlagen (Andersson et al. 2017). Eine ganz ähnliche Versuchsdurchführung mit TALENs gegen beide Kopien des *ALS* Gens (*Acetolactat Synthase*) in Kartoffeln ergab nur Mutationsfrequenzen von 10 % mit einer hohen Variabilität an gesetzten Mutationen ohne jedoch einen kompletten Knock-out zu erzielen (Nicolia et al. 2015). Die stabile Transformation von Kartoffel-Kallus mit CRISPR/Cas gegen das *ALS* Gen ergab auch nach einer Vermehrung über Sprossspitzen-Kulturen der T0 Linien keine Linie mit einem Knock-out aller vier Allele, sondern zum Teil ein diverses Muster an Mutationen einzelner Allele (Butler et al. 2015). Clasen et al. (2016) hingegen konnten nach Protoplasten-Transformation von Kartoffeln mit TALEN gegen das *Vacuolar Invertase* Gen (*VInv*), gefolgt von mehreren meristematischen Subkulturen, aus 18 Linien mit Mutationen insgesamt fünf Linien mit einem Knock-out in allen vier Allelen identifizieren. Auch in tetraploider Ruthenhirse konnten nach Transformation mit CRISPR/Cas von embryogenen Kallus bereits in der T0 Linien detektiert werden, die einen Knock-out aller vier Allele des Ziel-Gens aufwiesen (Liu et al. 2017). In hexaploidem Weizen führte der TALEN-vermittelte Knock-out des *MLO* Gens zur Mosaiken-Bildung und keine Linie mit komplettem Knock-out konnte in der T0 detektiert werden. Hier liegt der Vorteil der samenvermehrten Pflanzen, denn nach zwei Runden von Selbstungen konnten Linien mit einem Knock-out in allen sechs Allelen des *TaMLO* erreicht werden (Wang et al. 2014). Dies zeigt, dass es generell möglich ist, bereits in der T0 einen Knock-out aller vier Gene in tetraploiden und, wie in Kartoffeln, vegetativ vermehrten Arten zu erzeugen. Dies ist aber stark vom Transformationssystem und Ziel-Gen abhängig. Allerdings zeigen die Versuche von Clasen et al. (2016), dass mehrere Subkulturen zu einer Identifikation von Knock-out Linien führen können. Auch in Reis konnte nachgewiesen

werden, dass eine längere Kulturphase die Anzahl der durch CRISPR/Cas mutierten Zellen erhöht (Mikami et al. 2015). Durch die kaskadenartige Subkultivierung transgener Linien von Rosen konnten in der vorliegenden Arbeit solche mit einem geringeren Anteil an Wildtyp-Sequenzen durch die PAA-Gelelektrophorese identifiziert werden. Ob auf diese Weise eine 100 %-ige Homozygotie erreicht werden kann, bleibt Gegenstand weiterführender Analysen. Hinzu kommt, dass das Risiko somaklonaler Variation und somit bei langer In-vitro-Kultur das Auftreten sich negativ auswirkender Mutationen berücksichtigt werden sollte. Dieses ist zwar bei Meristemkulturen im Vergleich zu Regenerationsprozessen oder undifferenzierten Kulturen, wie Kallus, eher gering, jedoch nicht gänzlich auszuschließen. Auf diese Weise könnten unter Umständen Mutationen in der T-DNA oder der Erkennungssequenz auftreten, was eine fortschreitende Nuklease-Aktivität unterbinden könnte.

Von den regenerierten Linien des CRISPR/Cas Konstrukts CCMlo1 konnten bei keiner der fünf untersuchten Linien Mutationen in der Sequenz von *RhMLO1* detektiert werden. Von den insgesamt sieben getesteten Linien von CCMlo2, wiesen vier Mutationen in der Sequenz von *RhMLO2* auf. In den neun getesteten Linien von CCMlo3/4 konnten ebenfalls in vier Linien Mutationen in *RhMLO3/4* detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden bei allen regenerierten, transgenen TALEN Linien des Konstrukts TMlo3/4-2 Mutationen in der *RhMLO* Sequenz nachgewiesen. Dieser Befund lässt eine geringere Effizienz der CRISPR/Cas Konstrukte im Vergleich zum TALEN Konstrukt vermuten. Insbesondere bei CCMlo1, das zu keinerlei mutierten Sequenzen (trotz exprimierter Cas9) geführt hat. Dies kann in der Wahl wenig effizienter sgRNAs begründet sein. Die Wahl der „richtigen“ sgRNAs ist essentiell für die Effizienz (Bortesi und Fischer 2015, Mikami et al. 2015). Allerdings ist zu beachten, dass in dieser Arbeit Nickase-Konstrukte verwendet wurden, so dass zwei CRISPR-Paare, ähnlich dem System in TALENs, die DNA für einen Doppelstrangbruch binden müssen. Während Cho et al. (2014) in humanen Zelllinien und Schiml et al. (2014) in *A. thaliana* von ähnlichen Mutationsraten im Vergleich zu natürlichen Cas9 berichten, stellten Mikami et al. (2016) in Reis zum Teil große Unterschiede in der Effektivität der Cas9n fest. Die Autoren betonen, dass die Wahl der sgRNAs einen entscheidenden Einfluss hat. Im drastischsten Fall wurden Unterschiede von 84 % (Nuklease) zu 0 % (Nickase) durchschnittlicher Mutationsfrequenz der analysierten transgenen Linien festgestellt. Aber auch im günstigsten Fall wurden noch Unterschiede von rund 42 % (Nuklease) zu 23 % (Nickase) beobachtet. Unter Verwendung von Konstrukten mit natürlicher Cas9 könnten folglich höhere Mutationsraten möglich sein. Allerdings ist dies in Hinblick auf mögliche off-target Effekte kritisch zu bewerten, wie in Kapitel 4.3.4 noch näher erläutert wird. Bei den Linien der CRISPR/Cas Konstrukte konnte

beobachtet werden, dass spätere Proben, sowohl in der Kaskade, als auch in später regenerierten Klonen der Linien, höhere Mutationsraten aufwiesen. Hingegen lagen bei den TALEN Linien schon früh höhere Raten vor, die sich allerdings nur selten stärker anreicherten und höchstwahrscheinlich nicht auf eine vorschreitende Nuklease-Aktivität zurückzuführen sind. Eine Erklärung hierfür könnte in der Inaktivierung der integrierten T-DNA der TALEN in den Linien liegen. Dies könnte durch Mechanismen wie Rekombination, Mutation oder auch Silencing-Effekte hervorgerufen sein. Eine Überprüfung der Sequenz der integrierten T-DNA in Kombination mit quantitativen Expressionsanalysen könnte zur Klärung dieser Hypothese beitragen. Allerdings scheint diese Vermutung nicht sehr überzeugend, da dieses Phänomen der Inaktivierung in allen untersuchten Linien gleichermaßen und dies auch erst in späteren Regenerationsschritten aufgetreten sein müsste, wohingegen die CRISPR/Cas Linien zum Großteil nicht davon betroffen waren. Möglich ist auch, dass der beobachtete Phänotyp der TALEN Linien einen Einfluss auf die Expression der T-DNA und/oder die Aktivität der TALEN Proteine ausgeübt hat. Das verminderte Wachstum und die stark verminderte Bewurzelungsfähigkeit sprechen für eine physiologische Änderung, bei der nicht auszuschließen ist, dass auch weitere, nicht makroskopisch zu detektierende Effekte durch diese bedingt wurden. Eine weitere mögliche Erklärung könnte in der Promotorwahl liegen. Bei beiden Konstrukten befinden sich die Nukleasen zwar unter Kontrolle des 35S Promotors, allerdings sind diese nicht zu 100 % identisch, sondern weisen Sequenzidentitäten von rund 93 % auf. Die Konstrukte stammen aus unterschiedlichen Laboren und die TALENs befanden sich unter der Kontrolle eines 35S pro Promotors. Ob mit diesen Unterschieden in der Sequenz die hier beobachtete unterschiedliche Aktivität zu erklären ist, bleibt eine Vermutung, die durch gezielte Vergleiche der Promotoren untersucht werden müsste. Für zukünftige Anwendungen von Genome Editing Methoden in Rosen wäre daher eine experimentelle Überprüfung verschiedener Promotor-Spezifitäten empfehlenswert. Promotoren können in unterschiedlichen Pflanzenarten zu unterschiedlichen Expressionsmustern führen (Benfey und Chua 1990), weshalb die Funktionalität in einem System nicht unbedingt auf jedes weitere übertragbar ist. Ein möglicher Ansatz zur Analyse könnte zum Beispiel durch die Transformation des *dsRed* Reportergens unter der Kontrolle verschiedener Promotoren in somatischen Embryonen von Rosen erfolgen. Die Detektion unter LED-Licht würde so *in vivo* die Analyse der Expression in den verschiedenen Geweben über den Verlauf der Regeneration ermöglichen. Auf diese Weise könnte ein Promotor identifiziert werden, der in embryogenem Gewebe möglichst stark ist oder eine möglichst starke Expression in meristematischem Gewebe ermöglicht. Alternativ könnte auch ein induzierbarer Promotor verwendet werden, um gezielt nur für einen bestimm-

ten Zeitraum eine starke Expression zuzulassen. Die unterschiedlichen Aktivitäten der TALEN- und CRISPR/Cas Linien können daher hier nicht eindeutig geklärt werden. Eine Kombination aus den unterschiedlichen Systemen zur Ansteuerung der DNA (Protein bei TALEN und sgRNA bei CRISPR/Cas), als auch die Komplexität der T-DNA (hoch-repetitive Bereiche bei den TALEN) und eine Auswirkung der leicht unterschiedlichen Promotor-Sequenzen scheinen jedoch möglich.

Die hier verwendete Methode zum Nachweis der induzierten Mutationen mittels PCR-Amplifikation mit markierten Primern und Auftrennung auf Polyacrylamid-Gelen erlaubt die schnelle und Basenpaar-genaue Detektion von Insertionen und Deletionen in der Wildtyp-Sequenz. Auch wenn der Austausch einzelner Basen nicht nachgewiesen werden kann, so führen diese in den seltensten Fällen zu einem Knock-out von Genen (bei Änderungen die zu Stop-Kodons führen) sondern eher zu Aminosäureaustauschen. Des Weiteren können unterschiedliche Mutationen gleicher Länge nicht von einander unterschieden werden. Trotzdem ist diese Methode aufgrund der einfachen und schnellen Durchführung sowie der hohen Sensitivität im Bereich einzelner Basenpaare sehr gut geeignet, um Mutationen in Genome Editing Projekten zu identifizieren. Eine ganz ähnliche Methode zur Detektion von Mutationen nutzt die Auftrennung markierter PCR-Produkte mittels Kapillar-Elektrophorese. Auch hier ist die Auflösung auf einzelne Basenpaare genau, so dass Deletionen und Insertionen in der Zielsequenz schnell und einfach detektiert werden können (Andersson et al. 2017, Ramlee et al. 2015). Andere Methoden nutzen das Vorhandensein von Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme in der Zielsequenz. PCR amplifizierte Sequenzen werden mit den passenden Enzymen verdaut und der Verdau mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Nicht verdaute Fragmente deuten somit auf den Verlust der Erkennungsstelle durch induzierte Mutationen hin (Butler et al. 2015, Cermak et al. 2011, Holme et al. 2017, Zhang et al. 2017). Diese Methode ist allerdings nicht sehr sensitiv und kann keine genauen Informationen über das Ausmaß gesetzter Insertionen oder Deletionen geben. Zudem schränkt das nötige Vorhandensein der Erkennungsstelle für Restriktionsenzyme die Auswahl an Zielsequenzen stark ein. Eine Alternative dazu ist der Verdau mittels T7 Endonuklease. Hierfür werden PCR-Produkte der Zielregion denaturiert und bei Raumtemperatur renaturiert. Anschließend werden die Produkte mittels T7 Endonuklease verdaut, welche bei Fehlpaarungen in der DNA schneidet. Diese liegen vor, wenn mutierte Sequenzen im Pool vorliegen und daher die Zusammenlagerungen der Einzelstränge verschiedenen Ursprungs zu Fehlpaarungen führen. Im Anschluss erfolgt die Detektion des Verdaus über Agarosegelelektrophorese (Kim et al. 2017b, Li et al. 2017b, Yang et al. 2017). In der Regel werden bei beiden Systemen mutierte Sequenzen kloniert und einzelne

Klone mittels Sanger sequenziert. Aber auch ohne die Vorselektion durch Restriktionsverdau können PCR-Amplikons von transgenen Linien zur Sequenzierung nach Sanger eingesetzt werden (Clasen et al. 2016, Li et al. 2017d, Nicolai et al. 2015). Diese Methode stellt aber insbesondere bei polyploiden Pflanzen und dem Auftreten von Mosaiken einen hohen Proben-, Arbeits- und Zeitaufwand dar. In Kombination mit der kaskadenartigen Vermehrung transgener Linien ist die Analyse der Bindungsstellen durch PAA-Gelelektrophorese eine effektive, einfache, schnelle und kostengünstige Methode, um Linien mit hohen Mutationsfrequenzen zu detektieren.

### 4.3.3 Amplikon-Sequenzierung ausgewählter Proben

Von ausgewählten Proben der Kaskaden wurden die Ziel-Regionen mittels PCR amplifiziert und sequenziert, um ein genaueres Bild der gesetzten Mutationen durch die TALENs und CRISPR/Cas in den Zielsequenzen zu erhalten. Ferner kann mit dieser Methode die Mutationsfrequenz der Linien bestimmt werden. Die Analyse der Amplikons erlaubt auch eine Bewertung der Aussagekraft und Sensitivität der Detektionsmethode von Mutationen mittels PAA-Gelelektrophorese. Es wurden daher jeweils Proben zu Beginn und zum Ende einer Kaskade ausgewählt. Bei den CRISPR/Cas Kaskaden wurden jeweils Proben von einer Kaskade von CCMlo2 und CCMlo3/4 ausgewählt und sequenziert. Zusätzlich wurde jeweils eine Probe von einer anderen Linien, in der Mutationen detektiert wurden, sequenziert. Mit dem Konstrukt CCMlo1 wurde mangels detektierter Mutationen nur eine Probe zum Ende der Kaskade ausgewählt. Auch die Analyse der Amplikons konnte bei dieser Probe keine Mutationen in der Zielsequenz detektieren. Der Grenzwert zur Detektion von Varianten wurde auf 1 % gesetzt, daher kann nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass seltene Mutationen aufgrund sehr schwacher Nuklease-Aktivität unterhalb dieser Nachweisgrenze lagen. Allerdings erlauben Mutationen unterhalb dieser Nachweisgrenze nicht die Unterscheidung zwischen gezielten Mutationen und Fehlern durch PCR- und Sequenzierreaktionen.

In allen Proben der drei TALEN Linien wurden ausschließlich Deletionen von 2 bis 11 Basenpaaren detektiert, weder Insertionen noch Punktmutationen kamen vor. In den beiden Proben von T3/4A zu Beginn und am Ende der Kaskade konnte im Bild der PAA-Gelelektrophorese nur eine Bande unterhalb der Wildtyp-Sequenz detektiert werden. Diese konnte durch die Amplikon-Sequenzierung auf insgesamt drei unterschiedliche 4 bp Deletionen zurückgeführt werden. Diese änderten sich über die Kaskade nicht, nur die Verteilung der Frequenz der einzelnen Deletionsvarianten variierte leicht. Insgesamt verminderte sich die Frequenz der Mutationen von zu Beginn 51,7 % auf 46,2 %. Das Ausbleiben weiterer Mutationen und die Ver-

minderung der Mutationsfrequenz lassen darauf schließen, dass die TALENs keine neuen Doppelstrangbrüche und somit Mutationen induziert haben. Die Änderung in der Gesamtfrequenz und der Frequenz der einzelnen Mutationen lässt eine Entmischung der Mutationen über die vegetative Vermehrung der Kaskade vermuten. Die Proben von T3/4C und T3/4D wiesen hingegen eine Erhöhung der Mutationsfrequenz von 41,4 % auf 52,4 % (T3/4C) und von 62 % auf 89,4 % (T3/4D) auf. Auch hier waren die detektierten Mutationen recht konstant und änderten sich über die Kaskade größtenteils nicht. In T3/4D, wo ein Zuwachs der Mutationsfrequenz von rund 27 % verzeichnet werden konnte, gingen jedoch über die Kaskade zwei Mutationen verloren, beziehungsweise konnten bei einem Grenzwert von 1 % nicht mehr detektiert werden. Auch in diesen beiden Proben weist das Ausbleiben des Auftretens neuer Mutationen über die Kaskade auf eine zumindest stark reduzierte Nuklease-Aktivität hin. Allerdings zeigt die Erhöhung der Mutationsfrequenz, dass eine Anreicherung an Mutationen durch vegetative Vermehrung möglich ist und dies mit knapp 90 % mutierten Sequenzen in einer Probe (T3/4D) sogar recht erfolgreich. Aufgrund der kurzen Fragmente der Amplikons, konnten die einzelnen Allele von *RhMLO3* und *RhMLO4* nicht unterschieden werden. Die Mutationsfrequenz in T3/4D von knapp 90 % lässt jedoch darauf schließen, dass zumindest sieben der acht Allele beider Gene für die TALENs zugänglich waren. Mit hoher Wahrscheinlichkeit waren alle acht zugänglich, da sonst die sieben betroffenen Allele zu 100 % mutiert vorliegen müssten. Die Lage der gesetzten Mutationen befand sich, wie erwartet, in der Spacer Region zwischen den beiden TALEN-Armen. Nur in wenigen Fällen reichten die deletierten Bereiche bis in die 5'-Erkennungssequenz hinein. Da aber die Spacer-Region essentiell für die Funktionalität der FokI Nuklease ist, kann davon ausgegangen werden, dass Deletionen die weitere Induktion von Doppelstrangbrüchen durch TALENs unterbinden. Sobald die Spacer-Region kleiner als 10 bp ist, ist die Effektivität zur Induktion von Doppelsträngen drastisch reduziert (Li et al. 2011b, Miller et al. 2011). Dies war hier schon bei Deletionen von 2 bp der Fall.

Das vorwiegende Auftreten von Deletionen nach der Induktion von Doppelstrangbrüchen durch TALENs ist nicht ungewöhnlich und mehrfach beschrieben worden. So konnten Nicolai et al. (2015) durch den Einsatz von TALENs gegen das *ALS* Gen in Kartoffeln ausschließlich Deletionen von 1 bis 13 Basenpaaren und einzelnen Basenaustausche, jedoch keine Insertionen detektieren. Wang et al. (2014) stellten in ihren Untersuchungen zum Knock-out des *TaMLO1* Gens durch TALENs in Weizen fest, dass Mutationen hauptsächlich in Form von kleinen Deletionen (1 bis 10 bp) vorkamen. Auch Li et al. (2012a) detektierten in der T0 von TALEN transformierter Reis-Pflanzen hauptsächlich kleine Deletionen. In tran-

sienten Analysen zur TALEN-Funktionalität in Tabak mittels Co-Infiltration eines Stop-Kodons enthaltenden *GUS* Gens konnten in 50 sequenzierten Amplikons lediglich eine 1 bp Insertion, jedoch 44 Deletionen von 2 bis 15 bp festgestellt werden (Forsyth et al. 2016). Im Gegensatz zu diesen Berichten konnten Lor et al. (2014) in den durch TALENs induzierten Mutationen des *PROCERA* Gens in Tomate sowohl Deletionen als auch Insertionen von 2 bis zu 168 Basenpaaren detektieren. Vorherrschende Typen an durch TALENs induzierten Mutationen scheinen aber kleine Deletionen zu sein. Doppelstrangbrüche werden in Zellen häufig durch den fehlerbehafteten Mechanismus NHEJ repariert. Bei der Micro-Homologie-basierten Alternative der Reparatur durch NHEJ werden 5' Enden der DNA abgeschnitten, bis ein 3' Überhang mit Homologie vorliegt. Der DNA Strang kann dann an der komplementären Region binden und nicht-homologe Bereiche werden weggeschnitten, wodurch typischerweise Deletionen entstehen (zusammengefasst von Malzahn et al. 2017). Der Abgleich der Mutationen aus der Amplikon-Sequenzierung mit dem Bandenmuster der PAA-Gele ergab hohe Übereinstimmungen. Mutationen, die mit einer Frequenz von über 4 % im Pool der Amplikons auftraten, konnten als diskrete Bande auf den PAA-Gele nachgewiesen werden. Damit können die PAA-Gele für diese Fälle als äußerst verlässliche Methode zur Bestimmung von Mutationen herangezogen werden, was die effektive Vorselektion von Proben vor einer Sequenzierung ermöglicht.

Das Mapping der Amplikons der CRISPR/Cas Linien erwies sich als deutlich schwieriger, insbesondere bei den Proben von CCMlo2. Hier lag ein sehr diverses Muster an Deletionen und Insertionen vor, was im Mapping zur Wildtyp-Sequenz zu Problemen führte. Daher wurden bei diesen Proben die Pools in Sub-Pools mit Sequenzen kleinerer, größerer und gleicher Länge zur Wildtyp-Sequenz aufgeteilt und einzeln für das Mapping verwendet. In der Probe von CC2C konnten 12 verschiedene Deletionen von 5 bis 26 bp Länge und 23 Insertionen von 1 bis 18 bp Länge detektiert werden. Nur wenige dieser Mutationen lagen im Gesamtpool mit über 1,0 % vor. Zum Ende der Kaskade konnten nur noch 9 Deletionen (3 bis 17 bp) und 12 Insertionen (1 bis 20 bp), von denen nur noch eine 3 bp Deletion mit über 1,0 % im Gesamtpool vorlag, detektiert werden. Außerdem verringerte sich die Mutationsfrequenz von 15,3 % auf 9,8 %. Das Muster an Insertionen und Deletionen zwischen den Proben zu Beginn und Ende der Kaskade war im Vergleich zu den TALEN Linien recht dynamisch, indem neue hinzukamen und andere nicht mehr detektiert werden konnten. Die Dynamik der Mutationen zwischen den Proben zusammen mit der Reduktion der Mutationsfrequenz lässt darauf schließen, dass hier neben der Entmischung der Mutationen durch die vegetative Vermehrung auch noch eine Nuklease-Aktivität vorlag, die zu neuen Mutationen in der Zielsequenz führte. Dies

wird noch deutlicher in der Kaskade der CCMlo3/4 Linie CC3/4A. In der Probe zu Beginn der Kaskade konnten nur vier Insertionen von 5 bis 25 bp detektiert werden. Hingegen wurden in der Probe zum Ende der Kaskade vier Insertionen von 20 bis 36 bp und zwei Deletionen (2 und 12 bp) detektiert. Des Weiteren hat sich die Mutationsfrequenz von 9,6 % auf 36,3 %, also um 26,7 % erhöht. Hier ist noch zu erwähnen, dass bei der Linie CC2C nur vier Allele von *RhMLO2* als Zielsequenz dienten, bei der Linie CC3/4A hingegen insgesamt acht Allele von *RhMLO3* und *RhMLO4*. Diese starke Zunahme in der Mutationsfrequenz in Verbindung mit dem veränderten Muster an Insertionen, das sich insbesondere zu längeren Insertionen hin entwickelte, lässt auf eine fortschreitende Nuklease-Aktivität der Linie schließen. Yang et al. (2017) konnten eine fortschreitende Nuklease-Aktivität in heterozygoten oder chimären Linien von *Brassica napus* nachweisen und in *A. thaliana* gelang es sogar die Nuklease-Aktivität durch neu induzierte Mutationen in Wildtyp-Sequenzen des Ziel-Gens noch in nachfolgenden Generationen zu beobachten (Feng et al. 2014). Die Tendenz zu größeren Insertionen lässt sich damit erklären, dass die Cas9n Nukleasen nicht, wie die FokI, als Dimer schneiden und somit kein spezifischer Abstand zwischen beiden nötig ist. Solange die Erkennungssequenzen der sgRNAs nicht mutiert sind, können also weiterhin Doppelstrangbrüche induziert werden. Bei einer Insertion zwischen beiden Erkennungsstellen, die diese intakt lässt, kann es also weiterhin zu Mutationen in den bereits mutierten Sequenzen kommen. Deletionen führen in diesem Fall eher zum Verlust einer oder beider Erkennungsstellen. Diese Ergebnisse der Kaskade von CC3/4A zeigen, dass die kaskadenartige Vermehrung auch in den CRISPR/Cas Linien eine effektive Methode sein kann, durch Nuklease-Aktivität und Entmischung, Linien mit erhöhter Mutationsfrequenz zu detektieren.

Neben den Proben aus den beiden Kaskaden wurde von CCMlo2 und CCMlo3/4 jeweils eine weitere Linie sequenziert. Die Linie CC2G wurde aufgrund ihrer schwachen Wildtyp-Bande in der PAA-Gelanalyse ausgewählt. Die Sequenzierung der Amplikons ergab für diese Linie mit 58,6 % eine deutlich höhere Mutationsfrequenz der vier Allele von *RhMLO2* als in den anderen analysierten CRISPR/Cas Linien nachgewiesen werden konnte. Mit insgesamt 18 Deletionen von 1 bis 33 bp und 16 Insertionen von 2 bis 33 bp wies sie weiterhin ein stark ausgeprägtes Mosaik-Muster auf. Die Linie CC3/4E wurde aufgrund ihres diversen Bandenmusters an größeren Insertionen ausgewählt. Mit einer Mutationsfrequenz von 15,9 % konnten hier neben einer 1 bp Deletion 14 verschiedene Insertionen von 5 bis 47 bp detektiert werden. Der Umstand dass in keiner der Proben der CRISPR/Cas Linien Punktmutationen detektiert werden konnten, kann an den Schwierigkeiten beim Mapping der Linien gelegen haben. Hier wurden in manchen Sub-Pools kleinerer oder längerer Sequenzen zum Teil SNPs detektiert.

Diese rührten aber bei genauerer Betrachtung von Fehlern im Mapping her und wurden daher ausgeschlossen. In den betroffenen Reads war das Alignment der InDels – insbesondere an den Übergängen – fehlerhaft, was zur Wertung von zusätzlichen SNPs führte. In den Sub-Pools mit Sequenzen gleicher Länge zur Wildtyp-Sequenz konnten keine SNPs oberhalb der 1 % Grenze festgestellt werden. Wären SNPs durch die Doppelstrangbrüche induziert worden, hätte man hier jedoch eine Detektion vermuten können. Es ist indes zu erwähnen, dass die überwiegende Anzahl, der in den Sub-Pools detektierten Mutationen, unterhalb der 1,0 % Grenze lagen. Es ist folglich nicht auszuschließen, dass in den Sub-Pools gleicher Länge (die in der Regel die meisten Amplikons der Proben enthielten), seltene Punktmutationen unterhalb der Detektionsgrenze vorlagen.

Bei der Analyse der Sequenzen der Linien von CCMlo3/4 konnte im Intron-Bereich der Wildtyp-Sequenz eine Deletion festgestellt werden, die aus vorherigen Analysen von *RhMLO3* und *RhMLO4* nicht bekannt war. Diese 11 bp Deletion konnten in allen Proben in den Pools von *RhMLO3/4* mit Frequenzen von ca. 10 bis 16 % festgestellt werden. Dies lässt drauf schließen, dass es sich hierbei um ein Allel von *RhMLO3* oder *RhMLO4* handelt, da ein einzelnes Allel rechnerisch mit 12,5 % in den Reads vertreten war. Des Weiteren konnten in den Wildtyp-Sequenzen noch eine 2 und 8 bp Insertion festgestellt werden. Beide kamen mit Frequenzen von circa 1,0 bis 1,5 % in den Reads vor. Dies liegt nur knapp über dem Schwellenwert von 1,0 %, der zum Ausschluss von durch die Sequenzier-Reaktion oder die vorangegangene PCR induzierten Fehlern festgelegt wurde. Die niedrigen Frequenzen der beiden Insertionen lassen zu dem Schluss kommen, dass es sich hierbei um Fehler handelt, die nicht durch den Schwellenwert ausgeschlossen werden konnten. Das Auftreten dieser beiden fehlerhaften Varianten in allen Proben von *RhMLO3/4* lässt auf einen strukturellen Ursprung schließen, der entweder zu Fehlern in der PCR-Reaktion oder der Sequenzierung führte.

Die Bandbreite der Mutationsfrequenzen von *RhMLO2* und *RhMLO3/4* der CRISPR/Cas Linien reicht von 9,6 % bis 58,6 %. In der Literatur wurde beim Einsatz von CRISPR/Cas9 an polyploiden Arten eine große Variation an Mutationsfrequenzen beschrieben. In Raps wurden Mutationsfrequenzen von 27,6 % bis 96,6 % identifiziert, in Baumwolle für zwei Gene von 47,6 % bis 81,8 %, in *Citrus* von 11,5 % bis 64,7 %, in tetraploider Rutenhirse an unterschiedlichen Ziel-Genen von 11 %, 13,7 % und 95,6 % und bei tetraploiden Kartoffeln lagen die Mutationsfrequenzen an einem Gen im Schnitt bei 61,8 % und bei einem Multiplex Ansatz zum simultanen Knock-out von sechs Genen konnten Frequenzen von 0,0 %, 6,8 %, 9,1 %, 46,6 %, 50,0 % und 56,82 % nachgewiesen werden (Chen et al. 2017, Li et al. 2017d, Liu et al. 2017, Peng et al. 2017, Yang et al. 2017). Auch wenn diese Ergebnisse mit natürlicher

Cas9 durch Induktion von Doppelstrangbrüchen erzielt wurden, zeigen sie, dass sich die in dieser Studie erzielten Mutationsfrequenzen im Bereich anderer Untersuchungen an polyploiden Arten bewegen. Auch weisen die Ergebnisse zu multiplex Ansätzen darauf hin, dass die Auswahl des Gens und die verwendete sgRNA einen entscheidenden Einfluss auf die Mutationsfrequenz haben. So konnten Li et al. (2017d) neben Frequenzen von 56,82 % an einem Gen, für ein anderes nur 0 % verzeichnen. Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, wonach für *RhMLO1* eine Mutationsrate von 0 % verzeichnet wurde.

Die induzierten Mutationen in den Linien zeichnen sich durch ein diverses Muster an Insertionen und Deletionen von 1 bis 47 bp aus, wobei hauptsächlich solche um die 10 Basenpaare oder kleiner vorkommen. Dieses Muster an Mutationen wurde vielfach in der Literatur beschrieben. Yang et al. (2017) konnten in T0 Linien von mit CRISPR/Cas9 transformiertem Raps diverse Mutationen in Form von Insertionen, Deletionen und Basen-Austauschen detektieren. Dabei kamen hauptsächlich kurze Mutationen vor, aber auch große von einem Umfang bis zu 270 Basenpaaren. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in Pappeln und Kartoffeln gemacht werden (Butler et al. 2015, Fan et al. 2015).

Yang et al. (2017) stellten in den induzierten Mutationen an Raps fest, dass in bestimmten Genen, bestimmte Mutationen wie Insertionen dominieren. Dieses Ziel-Gen spezifische Muster konnte auch bei Rosen festgestellt werden: Während bei den durch *CCMlo2* induzierten Mutationen in *RhMLO2* sowohl Insertionen und Deletionen gleichermaßen vorkamen, überwogen bei den Mutationen in *RhMLO3/4* Insertionen. Auch Jiang et al. (2017) konnten in CRISPR/Cas9 transformierten Linien von *Camelina sativa* eine stark ausgeprägte Präferenz von Insertionen im Ziel-Gen feststellen, während in Baumwolle eine Präferenz für Deletionen beschrieben wurde (Chen et al. 2017). In Rutenhirse konnten hingegen für alle drei untersuchten Gene ausschließlich Deletionen von 1 bis 128 bp detektiert werden (Liu et al. 2017).

Andersson et al. (2017) berichteten bei CRISPR/Cas9 Linien von Kartoffeln, dass in 10 % der Fälle Insertionen von Vektor-Sequenzen festgestellt wurden. Die Integration von Vektorsequenzen in das Genom stellt bei der rechtlichen Bewertung der Produkte einen entscheidenden Faktor dar. Hierbei handelt es sich um Fremd-DNA, was die betreffende Linie, auch ohne die stabile Übertragung von CRISPR/Cas9 oder dessen spätere Auskreuzung, als genetisch veränderten Organismus (GVO) klassifiziert. Bei der Betrachtung der Insertionen der CRISPR/Cas Linien von Rosen konnten ausschließlich Micro-Duplikationen von endogenen Sequenzen rund um die Schnittstellen der Cas9n festgestellt werden. Bei größeren Insertionen der Linie CC3/4E konnten multiple Micro-Duplikationen hintereinander festgestellt werden,

bei denen bestimmte Sequenzabschnitte in unterschiedlichen Längen mehrfach hintereinander integriert wurden. Dies lässt vermuten, dass die betroffenen Bereiche mehrfach mutiert wurden und jeweils eine Micro-Duplikation hinzugefügt wurde. Auch in *A. thaliana* wurden durch Nickase-Konstrukte integrierte Insertionen in Form von Duplikationen der Sequenzbereiche direkt um die Schnittstellen in verschiedenen Größen nachgewiesen (Schiml et al. 2014). Diese Redundanz in den Sequenzen erklärt zum Teil die beobachteten Schwierigkeiten beim Mapping.

Durch den Einsatz zweier Cas9n, die jeweils am Plus- und Minus-Strang der DNA schneiden, und der diversen Insertionen und Deletionen der Linien, lassen sich die Positionen der mutierten Bereiche in *RhMLO2* und *RhMLO3/4* nicht eindeutig bestimmen. Betrachtet man die Mutationen vom 5'-Ende her, scheint eine Tendenz der Mutationen zu dieser Richtung vorzuliegen. Cas9 Nukleasen setzen den Schnitt in der Regel 3 bis 4 Basenpaare vor der PAM-Sequenz (Jinek et al. 2012, Pan et al. 2016). Die Streuung der Startpunkte der Mutationen zwischen den beiden sgRNAs der Cas9n lässt sich durch den versetzten Doppelstrangbruch und das diverse Muster an InDels unterschiedlicher Länge erklären. Auch Schiml et al. (2014) konnten durch den Einsatz von Nickase-Konstrukten an *A. thaliana* das Auftreten der Mutationen im Bereich zwischen den beiden PAM-Sequenzen nachweisen.

Die meisten der detektierten Mutationen führten durch InDels sowohl in den TALEN als auch CRISPR/Cas Linien zu einer Veränderung des Leserasters (mit Ausnahme der ersten Probe der Kaskade von CC3/4A) und somit zu einem Knock-out des jeweiligen Gens. Mutationen, die nicht zu einer Änderung des Leserasters führen (zum Beispiel 3 oder 6 Basenpaar InDels) können zwar durch veränderte Aminosäure-Zusammensetzung zu einer Beeinträchtigung der Proteinfunktion führen, garantieren jedoch keinen Funktionsverlust. Die Deletionen in den TALEN Linien lagen in der zweiten Transmembrandomäne von *RhMLO3/4* (Kaufmann et al. 2012). Ein Verlust weniger Aminosäuren (die TALEN Linien wiesen Deletionen von 1 bis 5 Aminosäuren auf) in diesem Bereich könnte zu einer Destabilisierung der Proteinstruktur und somit zu einer verminderten oder auch unterbundenen Funktion führen. Die InDels in den Linien von *CCMlo2* befinden sich im ersten extrazellulären Loop von *RhMLO2* zwischen zwei konservierten Cysteinen (Devoto et al. 1999, Kaufmann et al. 2012). Die Bindestelle des 3'-Bereiches von *CCMlo2* liegt mit den letzten drei Basenpaaren direkt auf einem dieser Cysteine. Allerdings ist der 3'-Bereich der Bindestelle seltener von Mutationen betroffen und lediglich eine größere Deletion von 33 bp in der Probe CC2G 8x konnte detektiert werden, bei der die 3'-Bindestelle komplett deletiert war und somit auch das Cystein. Das andere konservierte Cystein befindet sich zu weit von der CRISPR/Cas-Bindestelle entfernt, als dass es dir-

ekt durch eine Mutation betroffen sein könnte. Abgesehen von den Cysteinen ist der Bereich der CCMlo2 Bindestellen weder besonders konserviert noch als essentiell für die Proteinfunktion beschrieben (Devoto et al. 1999, Reinstädler et al. 2010). Daher kann nur in seltenen Fällen mit einem Funktionsverlust von RhMLO2 durch eine Deletion, die nicht zur Änderung des Leserasters führt, ausgegangen werden. Insertionen und kleinere Deletionen führen folglich vermutlich auch nicht zu einem kompletten Verlust der Proteinfunktion, vielleicht aber zumindest zu einer Reduktion durch eine Beeinträchtigung der Ligand-Bindung (Devoto et al. 2003). Die InDels der Linien des CCMlo3/4 Konstrukts befinden sich im Bereich von RhMLO3/4 am Übergang der fünften Transmembrandomäne zum dritten cytoplasmatischen Loop. Hier befindet sich ein stark konserviertes Motiv (KLEMII), dessen Vorkommen bislang jedoch noch nicht als essentiell für die Proteinfunktion nachgewiesen wurde (Devoto et al. 1999, Kaufmann et al. 2012, Reinstädler et al. 2010). Die Konservierung des Motivs über die Gattungsgrenzen von *A. thaliana*, Gerste, Weizen und Rose hinweg lässt allerdings eine funktionale Bedeutung vermuten. Daher kann es durchaus sein, dass InDels in diesem Bereich auch ohne eine Änderung des Leserasters zu einem Funktionsverlust oder zumindest zu einer Beeinträchtigung der Funktion von RhMLO3/4 führen. Die Auswahl der Binderegionen der TALEN und CRISPR/CasKonstrukte erlaubt einen hohen Grad an Flexibilität. Anforderungen an die PAM-Sequenz bei CRISPR/Cas, das Thymin bei TALENs, die *Spacer*-Regionen zwischen den Nukleasen und Anforderungen an die Sequenz zur optimalen Bindung der sgRNA und TALENs, schränken die Wahl indes ein. Daher ist die Lage in einem für die Protein-Funktion essentiellen Bereich nicht immer möglich. Sowohl TALENs als auch CRISPR/Cas können folglich aber effektiv für die Erzeugung von Knock-out Mutanten von *MLO* Genen in Rosen eingesetzt werden. Allerdings sollten für einen effektiven und stabilen Knock-out die Mutationen durch Inaktivierung der Bindungsstelle fixiert sein. Eine fortschreitende Nuklease-Aktivität könnte sonst durch weitere Mutationen (InDels) das Leseraster wieder korrigieren.

Die Analyse der Mutationen mittels Amplikon-Sequenzierung hat sich hier als besonders effektiv erwiesen, auch wenn diverse Muster an Insertionen und Deletionen, insbesondere bei den Proben von CCMlo2, zu Komplikationen im Mapping geführt haben und bei den Proben von CCMlo3/4 zwei Fehler oberhalb des 1,0 % Schwellenwertes detektiert wurden. Die Hoch-Durchsatz-Sequenzierung mittels NGS Methoden (*next generation sequencing*) wurde schon anderswo erfolgreich zur Analyse Genome Editing induzierter Mutationen eingesetzt (Fauser et al. 2014, Jacobs et al. 2015, Jiang et al. 2017, Schiml et al. 2014, Zhou et al. 2015). Beim Vergleich der mittels Amplikon-Sequenzierung detektierten Mutationen mit dem Ban-

denmuster der PAA-Gelanalysen fiel auf, dass, im Gegensatz zu den TALEN Linien, die Übereinstimmungen beziehungsweise die Aussagekraft der PAA-Gele in den CRISPR/Cas Linien nicht so stark ausgeprägt war. Dies lag daran, dass die Proben zum Teil ein sehr diverses Muster unterschiedlichster Insertionen und Deletionen, mit zum Teil nur sehr geringen Frequenzen (von unter 1,0 % im Gesamtpool der Reads), aufwiesen. Die Ergebnisse der TALEN Linien ergaben, dass Mutationsfrequenzen von rund 4 % nötig sind, um einzelne Mutationen im PAA-Gel klar erkennen zu können, auch wenn bei den CRISPR/Cas Proben dies zum Teil auch mit niedrigeren Frequenzen möglich war. Des Weiteren scheint die, im Gegensatz zu der eher moderaten Mosaiken-Bildung der TALEN Linien, starke Ausprägung der Mosaiken-Bildung den Nachweis mittels PAA-Gelelektrophorese zu erschweren, da dies auch dazu führt, dass einzelnen Mutationen in geringeren Frequenzen vorliegen. Insgesamt war die Aussagekraft der PAA-Gele jedoch sehr hoch und ermöglichte eine schnelle und effektive Selektion von vielversprechenden Linien. Die Analyse der komplexen Muster an Mutationen in Form von Insertionen und Deletionen erwies sich auch bei der Auswertung der Sequenzdaten der Proben der CRISPR/Cas Linien, als nicht trivial. Fehler im Mapping der Varianten können daher nicht ausgeschlossen werden. Durch eine Vorselektion mittels PAA-Gelelektrophorese könnten daher Proben aus der kaskadenartigen Vermehrung ausgewählt werden, die besonders hohe (im Idealfall 100 %) Mutationsraten und dazu eine möglichst geringe Mosaiken-Bildung aufweisen, um die Sequenzierung und anschließende Analyse der Amplikons zu optimieren.

#### 4.3.4 Off-target Effekte

Bedenken bezüglich der Anwendbarkeit von Genome Editing betreffen die Möglichkeit von off-target Effekten, also nicht beabsichtigten Mutationen an anderen Stellen im Genom (Bortesi und Fischer 2015, Schiml et al. 2014). Auch wenn dies bei Anwendungen in der Medizin oder der Tierzucht wesentlich weitreichendere Folgen hat als in der Pflanzenzüchtung, würde es auch hier einen entscheidenden Nachteil darstellen. In Untersuchungen zur Funktion von Genen könnten Mutationen an anderen Stellen den Effekt verschleiern und zu falschen Schlussfolgerungen führen. Zudem müssten sich negativ auswirkende Mutationen beim Einsatz in der Züchtung aufwendig herausgekreuzt werden. Insbesondere beim Einsatz von CRISPR/Cas9 gibt es Berichte über das Auftreten von off-target Effekten (siehe Bortesi und Fischer 2015). In Pflanzen wurden, wenn auch in geringem Umfang, off-target Mutationen durch den Einsatz von CRISPR/Cas9 an Reis und Sojabohne nachgewiesen (Shan et al. 2013, Sun et al. 2015, Xie und Yang 2013, Zhang et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit

wurden die nah-verwandten *RhMLO* Gene aus der Klade V mittels Amplikon-Sequenzierung auf off-target Mutationen hin untersucht. In keiner der Proben der TALEN und CRISPR/Cas Linien konnten, bei einem Grenzwert von 1,0 % in der Detektion von Varianten, Mutationen in der Wildtyp-Sequenz festgestellt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass seltene Mutationen unterhalb dieses Grenzwertes vorlagen. Diese würden dann allerdings unterhalb der Fehlerrate der PCR- und Sequenzierreaktion liegen und somit nur schwer als off-target Effekte zu identifizieren sein. Des Weiteren sollte auch nicht vernachlässigt werden, dass die lange vegetative Vermehrung und die vorangegangenen Kallusphasen auch zu Mutationen durch somaklonale Variation geführt haben könnten. Viele neuere Analysen zu off-target Mutationen durch CRISPR/Cas9 an diversen Pflanzen (u.a. Raps, Weizen, Baumwolle, Kartoffel, Tomaten, Wein, Leindotter) konnten keine solche nachweisen (Andersson et al. 2017, Braatz et al. 2017, Chen et al. 2017, Jiang et al. 2017, Li et al. 2017d, Liang et al. 2017, Nakajima et al. 2017, Pan et al. 2016, Sánchez-León et al. 2017, Yang et al. 2017). Entscheidend für die Spezifität und damit Vermeidung von off-target Mutationen ist die sorgfältige Wahl der sgRNA (Bortesi und Fischer 2015). Hier sind insbesondere die 12 Nukleotide der *seed* Sequenz für die spezifische Erkennung und Bindung essentiell, während der Bereich zum 5'-Ende einige Fehlpaarungen zulässt (Cong et al. 2013, Hsu et al. 2013, Jinek et al. 2012, Pattanayak et al. 2013). Bei der Wahl der hier verwendeten sgRNAs wurde darauf geachtet, dass keine 100 %-igen Homologien in den *seed* Regionen der nah-verwandten *RhMLOs* vorlagen, sondern diese sich durch mehrere Fehlpaarungen unterschieden. Nach den Berichten von off-target Effekten in früheren Untersuchungen scheint die sorgfältige Wahl der sgRNA unter Berücksichtigung nah-verwandter Gene mit hohen Homologien, zu einer sehr spezifischen Anwendung von CRISPR/Cas9 in diversen Systemen geführt zu haben.

Off-target Effekte können auch durch eine hohe und konstitutive Expression der Cas9 begünstigt werden (Hsu et al. 2013, Pattanayak et al. 2013). Die hier eingesetzten Nickasen (Cas9n) standen unter Kontrolle des 35S Promotors. Dies und die lange vegetative Vermehrung der transgenen Rosen hätten die Induktion von off-target Effekten stark begünstigen können. Die Verwendung von Nickase-Konstrukten kann die off-target Rate indes reduzieren, da die doppelte Länge an Sequenz-Homologien vorliegen muss, um einen Doppelstrangbruch zu induzieren (Cho et al. 2014, Mikami et al. 2016, Ran et al. 2013a).

Berichte zu durch TALENs induzierte off-target Effekten sind wesentlich seltener und wurden hauptsächlich in humanen oder tierischen Systemen veröffentlicht (Hockemeyer et al. 2011, Mussolino et al. 2011, Tesson et al. 2011). Dies liegt auch daran, dass TALENs durch die Dimerisierung der FokI immer in Paaren eingesetzt werden und somit längere Bereiche an Se-

quenzhomologien aufweisen, als natürliche CRISPR/Cas9 Systeme. Bei Nickase-Konstrukten ist zwar eine ähnlich lange Sequenzhomologie für die Induktion von Doppelstrangbrüchen nötig, die Cas9 kann jedoch im Gegensatz zu TALENs allein (ohne das zweite Nickase-Gegenstück) Einzelstrangbrüche induzieren, die sehr selten fehlerhaft repariert werden, aber trotzdem zu Mutationen führen können (Fauser et al. 2014). Bei der Wahl der Ziel-Sequenz von TALENs ist folglich auch eine hohe Sorgfalt zur Vermeidung von off-target Effekten ratsam (Grau et al. 2013).

Die effiziente Unterdrückung der off-target Effekte ist in bei der Anwendung an Rosen von hoher Bedeutung, da durch die vegetative Vermehrung die Konstrukte über lange Zeit in den Pflanzen aktiv sind. Zudem müssten mögliche negative off-target Effekte herausgekreuzt werden, was in Rosen aufgrund ihrer Genetik äußerst langwierig ist und zum Verlust der Sorte führen würde.

## 5 Fazit und Ausblick

Die Analyse der Funktion der vier untersuchten *RhMLO* Gene (*RhMLO1*, *RhMLO2*, *RhMLO3*, *RhMLO4*) mittels RNAi konnte für alle vier eine Beteiligung in der Vermittlung der Mehltau-Anfälligkeit nachweisen. Auch wenn der hier verwendete Vektor p9U10-RNAi vermutlich nicht optimal für die Regulierung niedrig exprimierter Gene war, ist insbesondere der transiente RNAi-Ansatz gut geeignet, um schnelle Aussagen über die Funktion der Gene zu erhalten. Das hier verwendete transiente System in Petalen von Rosen lässt schnelle Aussagen über die Funktionalität der Konstrukte sowie in Kombination mit quantitativen Inokulationsversuchen auch über die Funktion der regulierten Gene zu. Die Erzeugung stabil transgener Linien zur Analyse der Genfunktion mittels RNAi ist aufgrund des Zeitfaktors bis zur Analyse der Pflanzen und der nicht vollständigen und zum Teil unzureichenden Reduktion der Genexpression, insbesondere bei den niedrig exprimierten *MLO* Genen, als weniger effektiv zu bewerten. Nach den grundlegenden Funktionsanalysen stellen Genome Editing Ansätze für die Erzeugung meltauressistenter Knock-out Pflanzen die bessere Wahl dar, da die Reduktion der Genexpression mittels RNAi nur unvollständig wäre. Hierfür kann das in dieser Arbeit verwendete, optimierte Transformationprotokoll eine effektive Methode zur schnellen und effizienten Erzeugung transgener Pflanzen darstellen. Durch die Anwendung von Genome Editing Methoden ist des Weiteren die Erzeugung nicht-transgener Knock-out Pflanzen durch Auskreuzung der T-DNA oder transiente Ansätze möglich.

Genome Editing Ansätze durch Einsatz von TALENs oder CRISPR/Cas in der tetraploiden Rosensorte 'Pariser Charme' sind effektiv und bei sorgfältiger Wahl des Systems und der Zielsequenz sehr spezifisch. Allerdings stellen der tetraploide und heterozygote Charakter von Rosen wie auch die vegetative Vermehrung zum Erhalt der Sorte, Hürden für einen erfolgreichen Einsatz dar. Hier ist die Optimierung durch Untersuchungen zu einem geeigneten Promotor nötig, um die Mosaiken-Bildung zu reduzieren und möglichst homozygote Knock-out Linien in der T0 zu erlangen. Multiple vegetative Vermehrungsschritte in Form eines kaskadenartigen Versuchsdesigns können effektiv zur Anreicherung der Mutationen beitragen, um durch Selektion und voranschreitender Nuklease-Aktivität Knock-out Linien zu erhalten. Die Analyse der Mutationen durch PAA-Gelelektrophorese erlaubt die schnelle und sehr genaue Bewertung der Linien und somit die Auswahl potentieller Kandidaten für weiterführende Analysen. Die Hoch-Durchsatz-Sequenzierung der Bindestellen (Amplikon-Sequenzierung)

ermöglicht die genaue Untersuchung der Mutationen und die Bewertung möglicher off-target Effekte.

Für zukünftige Genome Editing Ansätze in Rosen stellt das CRISPR/Cas9 System aufgrund seiner einfachen und kostengünstigen Anwendung die bessere Alternative dar. Durch die einfache Klonierung der sgRNA in die Konstrukte ist es möglich, schnell und günstig mehrere sgRNAs hinsichtlich ihrer Effektivität in einem transienten System zu testen. Die Konstruktion von TALENs ist hingegen sehr aufwendig und kann von den meisten Laboren nicht selbst übernommen werden, was die Anwendung deutlich kostenintensiver macht. Die Verwendung von Nickase-Konstrukten ist insbesondere bei der vegetativen Vermehrung von Rosen empfehlenswert, um die Möglichkeit von off-target Effekten zu minimieren. Die Initiative zur vollständigen Genom-Sequenzierung von *R. hybrida* verspricht in Zukunft noch weitere interessante Ziel-Gene für die Funktionsanalyse und Mutationszüchtung zur Verfügung zu stellen. Des Weiteren ermöglicht ein vollständiges Genom die effektive Suche nach Homologien zu sgRNAs und somit zur Vermeidung von off-target Mutationen.

Da in Rosen vier *RhMLO* Gene an der Vermittlung der Mehltau-Anfälligkeit beteiligt sind, ist höchstwahrscheinlich der simultane Knock-out aller Allele der vier Gene nötig, um vollständig resistente Pflanzen zu erhalten. Dies kann durch die Kreuzung verschiedener, editierter Kreuzungseltern erreicht werden. Neben der Selektion von homozygoten Knock-out Nachkommen, ermöglicht dies auch die Selektion von Linien, die kein Transgen tragen. Auch können durch Kreuzungen die Nachkommen unvollständig mutierter Genotypen auf homozygote Knock-out Nachkommen, die zusätzlich transgenfrei sind, selektiert werden. Auf diese Weise könnten auch mögliche natürliche Mutationen in *MLO* Genen mit durch Genome Editing erzeugten Mutationen kombiniert werden, um vollständig resistente Pflanzen zu erhalten.

Eine Alternative zur Kombination durch Kreuzungen stellt der Multiplex-Ansatz mit CRISPR/Cas9 dar. Hierzu werden mehrere sgRNAs oder eine, die spezifisch für mehrere Loci ist, in ein Konstrukt kloniert. Die erfolgreiche Anwendung von Multiplex-CRISPR/Cas9 Ansätzen zum simultanen Knock-out mehrerer Gene wurde bereits in *A. thaliana*, Tomate und Raps nachgewiesen (Braatz et al. 2017, Li et al. 2017d, Peterson et al. 2016, Xing et al. 2014, Yang et al. 2017). Durch die Verwendung verschiedener Genotypen könnten durch anschließende Kreuzungen das Transgen herausgekreuzt werden, um resistente und transgenfreie Rosen zu erhalten. Mehlttauresistente Rosen wären von hohem wirtschaftlichem, aber auch ökologischem Wert. Zwar werden gentechnisch veränderte Schnittblumen von der Öffentlichkeit als weniger problematisch wahrgenommen, doch insbesondere in der EU ist der Zulassungsprozess extrem zeit- und kostenintensiv. Das Auskreuzen der CRISPR/Cas T-DNA, wie es

zum Beispiel von Nekrasov et al. (2017) bei der *mlo*-resistenten Tomate berichtet wurde, würde allerdings zum Verlust der Sorte führen und zusätzliche Zeit und Kosten verursachen. Systeme, die durch Transfektion von Protoplasten CRISPR/Cas9 induzierte Mutationen ohne die stabile Integration der T-DNA ermöglichen, würden hier die optimale Lösung darstellen. In Kartoffeln konnten mittels Transfektion von Protoplasten bereits in der T0 homozygote Knock-out Linien des *GBSS* Gens ohne die Integration von T-DNA beschrieben werden (Andersson et al. 2017). Protokolle zur Etablierung und Regeneration von Protoplasten an Rosen bestehen, müssten zunächst jedoch an die jeweilige Sorte angepasst werden (Kim et al. 2003, Matthews et al. 1991, Pati et al. 2004, Squirrell et al. 2005). Auch die Effektivität der Transfektion und Induktion von Mutationen durch optimale Promotor-Wahl bedarf noch intensiver Optimierung. Weitere Möglichkeiten zur Erzeugung nicht-transgener Knock-out Pflanzen bestehen zum Beispiel durch die Transfektion von Protoplasten mit vorassemblierten Komplexen aus sgRNA und Cas9. Woo et al. (2015) konnten so gezielte Mutationen in *A. thaliana*, Tabak, Salat und Reis nachweisen. Die regenerierten Pflanzen trugen Mutationen in der Ziel-Region, ohne dass rekombinante Nukleinsäure bei deren Erzeugung zum Einsatz kam. Dies ist in Hinblick auf eine mögliche Regulierung der Pflanzen von großer Bedeutung. Allerdings stellt dieses System wesentlich komplexere Anforderungen an seine Durchführung.

Es ist daher noch ein weiter Weg, bis mehlttauresistente und nicht-transgene Knock-out Linien von Rosen vorliegen können. Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis zur Funktionalität der *RhMLO* Gene und die beschriebenen Methoden zur transienten Analyse in Petalen, Anreicherung der durch Genome Editing Methoden induzierten Mutationen über kaskadenartige Vermehrung sowie Analyse der Mutationen mittels PAA-Gelelektrophorese und Amplikon-Sequenzierung bieten jedoch wichtige Erkenntnisse und effektive Werkzeuge für zukünftige Arbeiten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Acevedo-Garcia J, Kusch S, Panstruga R (2014) Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytol.* 204:273–281
- Acevedo-Garcia J, Spencer D, Thieron H, Reinstädler A, Hammond-Kosack K, Phillips AL, Panstruga R (2017) *mlo*-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. *Plant Biotechnol J* 15:367–378
- Agrios GN (1997) *Plant Pathology*, 4th edn. Academic Press, San Diego, USA. ISBN 0-12-044564-6
- Andersson M, Turesson H, Nicolia A, Fält A-S, Samuelsson M, Hofvander P (2017) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Reports* 36:117–128
- Antony G, Zhou J, Huang S, Li T, Liu B, White F, Yang B (2010) Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*. *Plant Cell* 22:3864–3876
- Appiano M, Pavan S, Catalano D, Zheng Z, Bracuto V, Lotti C, Visser, Richard G F, Ricciardi L, Bai Y (2015) Identification of candidate *MLO* powdery mildew susceptibility genes in cultivated Solanaceae and functional characterization of tobacco *NtMLO1*. *Transgenic Res.* doi: 10.1007/s11248-015-9878-4
- Arene L, Pellegrino C, Gudin S (1993) A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* L. cv Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues. *Euphytica* 71:83–90
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415:977–983
- Ashby AM, Watson MD, Shaw CH (1987) A Ti-plasmid determined function is responsible for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards the plant wound product acetosyringone. *FEMS Microbiol Lett* 41:189–192
- Assaad FF, Qiu J-L, Youngs H, Ehrhardt D, Zimmerli L, Kalde M, Wanner G, Peck SC, Edwards H, Ramonell K, Somerville CR, Thordal-Christensen H (2004) The PEN1 Syntaxin Defines a Novel Cellular Compartment upon Fungal Attack and Is Required for the Timely Assembly of Papillae. *Mol Biol Cell* 15:5118–5129
- Bai Y, Pavan S, Zheng Z, Zappel NF, Reinstädler A, Lotti C, Giovanni C de, Ricciardi L, Lindhout P, Visser R, Theres K, Panstruga R (2008) Naturally Occurring Broad-Spectrum Powdery Mildew Resistance in a Central American Tomato Accession Is Caused by Loss of *Mlo* Function. *Mol Plant Microbe Interact* 21:30–39
- Baker SJ, Newton AC, Crabb D, Guy DC, Jefferies RA, Mackerron D, Thomas WTB, Gurr SJ (1998) Temporary partial breakdown of *mlo*-resistance in spring barley by sudden relief of soil water-stress under field conditions: the effects of genetic backgrounds and *mlo* allele. *Plant Pathol* 47:401–410

- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 315:1709–1712
- Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, Baulcombe DC (2000) *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J* 21:73–81
- Benfey PN, Chua N-H (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science* 250:959–966
- Bent AF, Mackey D (2007) Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annu Rev Phytopathol* 45:399–436
- Beranová M, Rakouský S, Vávrová Z, Skalický T (2008) Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 94:253–259
- Berg JA, Appiano M, Santillán Martínez M, Hermans FWK, Vriezen WH, Visser RGF, Bai Y, Schouten HJ (2015) A transposable element insertion in the susceptibility gene *CsaMLO8* results in hypocotyl resistance to powdery mildew in cucumber. *BMC Plant Biol* 15:243. doi: 10.1186/s12870-015-0635-x
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001a) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363–366
- Bernstein E, Denli AM, Hannon GJ (2001b) The rest is silence. *RNA* 7:1509–1521
- Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3135–3140
- Biber A, Kaufmann H, Linde M, Spiller M, Terefe D, Debener T (2010) Molecular markers from a BAC contig spanning the *Rdr1* locus: a tool for marker-assisted selection in roses. *Theor Appl Genet* 120:765–773
- Bidzinski P, Noir S, Shahi S, Reinstädler A, Gratkowska DM, Panstruga R (2014) Physiological characterization and genetic modifiers of aberrant root thigmomorphogenesis in mutants of *Arabidopsis thaliana* *MILDEW LOCUS O* genes. *Plant Cell Environ* 37:2738–2753
- Bittel P, Robatzek S (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 10:335–341
- Blaszczyk J, Tropea JE, Bubunenko M, Routzahn KM, Waugh DS, Court DL, Ji X (2001) Crystallographic and Modeling Studies of RNase III Suggest a Mechanism for Double-Stranded RNA Cleavage. *Structure* 9:1225–1236
- Boch J, Bonas U (2010) *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* 48:419–436
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U (2009) Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* 326:1509–1512
- Bogdanove AJ, Voytas DF (2011) TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. *Science* 333:1843–1846

- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiol* 151:2551–2561
- Bortesi L, Fischer R (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv* 33:41–52
- Bourke PM, Arens P, Voorrips RE, Esselink GD, Koning-Boucoiran CFS, Van't Westende WPC, Santos Leonardo T, Wissink P, Zheng C, van Geest G, Visser RGF, Krens FA, Smulders MJM, Maliepaard C (2017) Partial preferential chromosome pairing is genotype dependent in tetraploid rose. *Plant J* 90:330–343
- Braatz J, Harloff H-J, Mascher M, Stein N, Himmelbach A, Jung C (2017) CRISPR-Cas9 Targeted Mutagenesis Leads to Simultaneous Modification of Different Homoeologous Gene Copies in Polyploid Oilseed Rape (*Brassica napus*). *Plant Physiol* 174:935–942
- Brodersen P, Voinnet O (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 22:268–280
- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, Daelen R, Lee T, Diergaarde P, Groenedijk J, Töpsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P (1997) The Barley *Mlo* Gene: A Novel Control Element of Plant Pathogen Resistance. *Cell* 88:695–705
- Butler NM, Douches DS (2016) Sequence-Specific Nucleases for Genetic Improvement of Potato. *Am J Potato Res* 93:303–320
- Butler NM, Atkins PA, Voytas DF, Douches DS (2015) Generation and Inheritance of Targeted Mutations in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using the CRISPR/Cas System. *PLoS One* 10:e0144591. doi: 10.1371/journal.pone.0144591
- Butt DJ (1978) Epidemiology of Powdery Mildews. In: Spencer DM (ed) *The Powdery Mildews*. Academic Press, London, New York. ISBN: 0-12-656850-2, pp 51–81
- Cangelosi GA, Ankenbauer RG, Nester EW (1990) Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6708–6712
- Carvalho DRA, Koning-Boucoiran CFS, Fanourakis D, Vasconcelos MW, Carvalho SMP, Heuvelink E, Krens FA, Maliepaard C (2015) QTL analysis for stomatal functioning in tetraploid *Rosa × hybrida* grown at high relative air humidity and its implications on postharvest longevity. *Mol Breed* 35:490
- 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 Res* 39:e82. doi: 10.1093/nar/gkr218
- Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 47:497–510
- Chen Z, Hartmann HA, Wu M-J, Friedman EJ, Chen J-G, Pulley M, Schulze-Lefert P, Panstruga R, Jones AM (2006) Expression analysis of the *AtMLO* Gene Family Encoding Plant-Specific Seven-Transmembrane Domain Proteins. *Plant Mol Biol* 60:583–597
- Chen Z, Noir S, Kwaaitaal M, Hartmann HA, Wu M-J, Mudgil Y, Sukumar P, Muday G, Panstruga R, Jones AM (2009) Two Seven-Transmembrane Domain MILDEW

- RESISTANCE LOCUS O Proteins Cofunction in *Arabidopsis* Root Thigmomorphogenesis. *Plant Cell* 21:1972–1991
- Chen X, Lu X, Shu N, Wang S, Wang J, Wang D, Guo L, Ye W (2017) Targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 7:44304. doi: 10.1038/srep44304
- Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim J-S (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genom Res* 24:132–141
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF (2010) Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* 186:757–761
- Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S, Demorest ZL, Li J, Cedrone F, Tibebu R, Davison S, Ray EE, Daulhac A, Coffman A, Yabandith A, Retterath A, Haun W, Baltes NJ, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2016) Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J* 14:169–176
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169–196
- Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qiu J-L, Hückelhoven R, Stein M, Freialdenhoven A, Somerville SC, Schulze-Lefert P (2003) SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 425:973–977
- Cong L, Zhou R, Kuo Y-C, Cunniff M, Zhang F (2012) Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nat Commun* 3:968. doi: 10.1038/ncomms1962
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339:819–823
- Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA, Livaja M, Durner J, Westphal L, Vogel J, Lipka V, Kemmerling B, Schulze-Lefert P, Somerville SC, Panstruga R (2006) Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat Genet* 38:716–720
- Cutter AD, Payseur BA, Salcedo T, Estes AM, Good JM, Wood E, Hartl T, Maughan H, Stempel J, Wang B, Bryan AC, Dellos M (2003) Molecular correlates of genes exhibiting RNAi phenotypes in *Caenorhabditis elegans*. *Genom Res* 13:2651–2657
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826–833
- Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996) Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell* 8:1793–1807
- Debener T (1999) Genetic Analysis of Horticulturally Important Morphological and Physiological Characters in Diploid Roses. *Gartenbauwissenschaft* 64:14–20
- Debener T, Linde M (2009) Exploring Complex Ornamental Genomes: The Rose as a Model Plant. *Crit Rev Plant Sci* 28:267–280

- Debener T, Mattiesch L (1999) Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 99:981–899
- Debener T, Hibrand-Saint Oyant L (2009) Genetic Engineering and Tissue Culture of Roses. In: Folta KM, Gardiner SE (eds) *Genetics and Genomics of Rosaceae*, 6th edn. Springer, New York, ISBN: 978-0-387-77491-6, pp 393–409
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E (2011) CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471:602–607
- Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu J-K, Shi Y, Yan N (2012) Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science* 355:720–723
- Deshmukh R, Singh VK, Singh BD (2014) Comparative phylogenetic analysis of genome-wide *Mlo* gene family members from *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 289:345–359
- Devoto A, Piffanelli P, Nilsson I, Wallin E, Panstruga R, Heijne G von, Schulze-Lefert P (1999) Topology, Subcellular Localization, and Sequence Diversity of the Mlo Family in Plants. *J Biol Chem* 274:34993–35004
- Devoto A, Hartmann HA, Piffanelli P, Elliott C, Simmons C, Taramino G, Goh C-S, Cohen FE, Emerson BC, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2003) Molecular Phylogeny and Evolution of the Plant-Specific Seven-Transmembrane MLO Family. *J Mol Evol* 56:77–88
- Dewitte A, Leus L, Huylenbroeck J van, Bockstaele E van, Höfte, M (2007) Characterization of Reactions to Powdery Mildew (*Podosphaera pannosa*) in Resistant and Susceptible Rose Genotypes. *J Phytopathol* 155:264–272
- Dohm A, Ludwig C, Nehring K, Debener T (2001) Somatic Embryogenesis in Roses. *Acta Hort* 547:341–347
- Dohm A, Ludwig C, Schilling D, Debener T (2002) Transformation of roses with genes for antifungal proteins to reduce their susceptibility to fungal diseases. *Acta Hort* 572:105–111
- Dong J-Z, McHughen A (1993) Transgenic flax plants from *Agrobacterium* mediated transformation: incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants. *Plant Sci*. 91:139–148
- Dugo ML, Satovic Z, Millán T, Cubero JI, Rubiales D, Cabrera A, Torres AM (2005) Genetic mapping of QTLs controlling horticultural traits in diploid roses. *Theor Appl Genet* 111:511–520
- Dunoyer P, Schott G, Himber C, Meyer D, Takeda A, Carrington JC, Voinnet O (2010) Small RNA Duplexes Function as Mobile Silencing Signals Between Plant Cells. *Science* 328:912–916
- Eden E, Geva-Zatorsky N, Issaeva I, Cohen A, Dekel E, Danon T, Cohen L, Mayo A, Alon U (2011) Proteome Half-Life Dynamics in Living Human Cells. *Science* 331:764–768
- Eichmann R, Hüchelhoven R (2008) Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. *J Plant Physiol* 165:5–18
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschel T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188–200

- Elliott C, Müller J, Miklis M, Bhat RA, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2005) Conserved extracellular cysteine residues and cytoplasmic loop–loop interplay are required for functionality of the heptahelical MLO protein. *Biochem J* 385:243–254
- Endo A, Masafumi M, Kaya H, Toki S (2016) Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using CpfI from *Francisella novicida*. *Sci Rep* 6:38169. doi: 10.1038/srep38169
- Fan D, Liu T, Li C, Jiao B, Li S, Hou Y, Luo K (2015) Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in *Populus* in the First Generation. *Sci Rep* 5:12217. doi: 10.1038/srep12217
- Fausser F, Schiml S, Puchta H (2014) Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 79:348–359
- Feechan A, Jermakow AM, Torregrosa L, Panstruga R, Dry IB (2008) Identification of grapevine *MLO* gene candidates involved in susceptibility to powdery mildew. *Funct Plant Biol* 35:1255–1266
- Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang D-L, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu X, Zhu J-K (2014) Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:4632–4637
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811
- Firoozabady E, Moy Y, Courtney-Gutterson N, Robinson K (1994) Regeneration of Transgenic *Rosa (Rosa hybrida)* Plants from Embryogenic Tissue. *Nat Biotechnol* 12:609–613
- Flor HH (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu Rev Phytopathol* 9:275–296
- Forsyth A, Weeks T, Richael C, Duan H (2016) Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)-Mediated Targeted DNA Insertion in Potato Plants. *Front Plant Sci* 7:1572. doi: 10.3389/fpls.2016.01572
- Freialdenhoven A, Peterhänsel C, Kurth J, Kreuzaler F, Schulze-Lefert P (1996) Identification of Genes Required for the Function of Non-Race-Specific *mlo* Resistance to Powdery Mildew in Barley. *Plant Cell* 8:5–14
- Frinking HD, Verweij R (1989) Colonization of rose by *Sphaerotheca pannosa* (Wallr.) Lév. var. *rosae* Wor. *Neth J Pl Path* 95:63–72
- Gacheri C, Kigen T, Sigsgaard L (2015) Hot-spot application of biocontrol agents to replace pesticides in large scale commercial rose farms in Kenya. *BioControl* 60:795–803
- Gar O, Sargent DJ, Tsai C-J, Pleban T, Shalev G, Byrne DH, Zamir D (2011) An autotetraploid linkage map of rose (*Rosa hybrida*) validated using the strawberry (*Fragaria vesca*) genome sequence. *PLoS One* 6:e20463. doi: 10.1371/journal.pone.0020463
- Gameau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S (2010) The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468:67–71

- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:E2579-86. doi: 10.1073/pnas.1208507109
- Geike J, Kaufmann H, Schürmann F, Debener T (2015) Targeted Mutagenesis of *MLO*-Homologous Genes in the Rose Genome. In: ISHS Acta Horticulturae (ed) XXV International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals: Crossing Borders, vol 1087, Melle, Belgium, pp 507–513
- Gelvin SB (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:223–256
- George EF, Hall MA, Klerk G-JD (eds) (2007) *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*. Chapter 6: Plant Growth Regulators II: Cytokinin, their Analogues and Antagonists, 3rd edn. Springer, Dordrecht. ISBN: 978-1-4020-5005-3
- Gitonga VW, Stolker R, Koning-Boucoiran CFS, Aelaei M, Visser RGF, Maliepaard C, Krens FA (2016) Inheritance and QTL analysis of the determinants of flower color in tetraploid cut roses. *Mol Breed* 36:143
- Glawe DA (2008) The Powdery Mildews: A Review of the World's Most Familiar (Yet Poorly Known) Plant Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 46:27–51
- Gorbunova V (1997) Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucleic Acids Res* 25:4650–4657
- Grau J, Boch J, Posch S (2013) TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction. *Bioinformatics* 29:2931–2932
- Grove GG (1998) Meteorological Factors Affecting Airborne Conidia Concentrations and the Latent Period of *Podosphaera clandestina* on Sweet Cherry. *Plant Dis* 82:741–746
- Guan X, Zhao H, Xu Y, Wang Y (2011) Transient expression of glyoxal oxidase from the Chinese wild grape *Vitis pseudoreticulata* can suppress powdery mildew in a susceptible genotype. *Protoplasma* 248:415–423
- Gudin S (2000) Rose: Genetics and Breeding. In: Janick J (ed) *Plant Breeding Reviews: Volume 17*. John Wiley & Sons, Inc., New York. ISBN: 0-471-33373-5, pp 159–189
- Gudin S (2003) Breeding. In: Roberts AV, Debener T, Gudin S (eds) *Encyclopedia of Rose Science*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, Boston. ISBN: 0-12-227620-5, pp 25–30
- Guo S, Kemphues KJ (1995) *par-1*, a Gene Required for Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos, Encodes a Putative Ser/Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed. *Cell* 81:611–620
- Hajlaoui MR, Benhamou N, Bélanger RR (1991) Cytochemical aspects of fungal penetration, haustorium formation and interfacial material in rose leaves infected by *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*. *Physiol Mol Plant Pathol* 39:341–355
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293–296

- Hammond-Kosack KE, Parker JE (2003) Deciphering plant–pathogen communication: Fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol* 14:177–193
- Han Y, Griffiths A, Li H, Grierson D (2004) The effect of endogenous mRNA levels on co-suppression in tomato. *FEBS Lett* 563:123–128
- Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418:244–251
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099–1103
- He P, Shan L, Lin N-C, Martin GB, Kemmerling B, Nürnberger T, Sheen J (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* 125:563–575
- Hellens R, Mullineaux P, Klee H (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 5:446–451
- Henz A, Debener T, Linde M (2015) Identification of major stable QTLs for flower color in roses. *Mol Breed* 35:958. doi: 10.1007/s11032-015-0382-6
- Hijwegen T, Verhaar MA, Zadoks JC (1996) Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in rose induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Pathol* 45:631–635
- Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R (2011) Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol* 29:731–734
- Holme IB, Wendt T, Gil-Humanes J, Deleuran LC, Starker CG, Voytas DF, Brinch-Pedersen H (2017) Evaluation of the mature grain phytase candidate *HvPAPhy\_a* gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9 and TALENs. *Plant Mol Biol* 95:111–121
- Horst RK, Cloyd RA (2007) Compendium of Rose Diseases and Pests, 2nd edn. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. ISBN: 978-0-89054-355-9
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31:827–832
- Hückelhoven R (2005) Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiol Lett* 245:9–17
- Hückelhoven R, Panstruga R (2011) Cell biology of the plant–powdery mildew interaction. *Curr Opin Plant Biol* 14:738–746
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel K-H (1999) Hypersensitive Cell Death and Papilla Formation in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus Are Associated with Hydrogen Peroxide but Not with Salicylic Acid Accumulation. *Plant Physiol* 119:1251–1260
- Hückelhoven R, Trujillo M, Kogel K-H (2000) Mutations in *Ror1* and *Ror2* genes cause modification of hydrogen peroxide accumulation in *mlo*-barley under attack from the powdery mildew fungus. *Mol Plant Pathol* 1:287–292

- Humara JM, López M, Ordás RJ (1999) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. *Plant Cell Reports* 19:51–58
- Humphry M, Bednarek P, Kemmerling B, Koh S, Stein M, Gobel U, Stuber K, Pislewska-Bednarek M, Loraine A, Schulze-Lefert P, Somerville S, Panstruga R (2010) A regulon conserved in monocot and dicot plants defines a functional module in antifungal plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21896–21901
- Humphry M, Reinstädler A, Ivanov S, Bisseling T, Panstruga R (2011) Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea *er1* plants is conferred by natural loss-of-function mutations in *PsMLO1*. *Mol Plant Pathol* 12:866–878
- Iovieno P, Andolfo G, Schiavulli A, Catalano D, Ricciardi L, Frusciante L, Ercolano MR, Pavan S (2015) Structure, evolution and functional inference on the *Mildew Locus O* (*MLO*) gene family in three cultivated *Cucurbitaceae* spp. *BMC Genomics* 16:1112. doi: 10.1186/s12864-015-2325-3
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product. *J Bacteriol* 169:5429–5433
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21:635–637
- Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS (2006) Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12:1179–1187
- Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz RJ, Parrott WA (2015) Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol* 15:16. doi: 10.1186/s12896-015-0131-2
- Jarosch B, Kogel K-H, Schaffrath U (1999) The Ambivalence of the Barley *Mlo* Locus: Mutations Conferring Resistance Against Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) Enhance Susceptibility to the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* 12:508–514
- Jia H, Wang N (2014) Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One* 9:e93806. doi: 10.1371/journal.pone.0093806
- Jiang P, Chen Y, Wilde HD (2016) Reduction of *MLO1* expression in petunia increases resistance to powdery mildew. *Scientia Horticulturae* 201:225–229
- Jiang WZ, Henry IM, Lynagh PG, Comai L, Cahoon EB, Weeks DP (2017) Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnol J* 15:648–657
- Jinek M, Doudna JA (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457:405–412
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337:816–821

- Jiwan D, Roalson EH, Main D, Dhingra A (2013) Antisense expression of peach mildew resistance locus O (*PpMlo1*) gene confers cross-species resistance to powdery mildew in *Fragaria x ananassa*. *Transgenic Res.* doi: 10.1007/s11248-013-9715-6
- Johansen LK, Carrington JC (2001) Silencing on the Spot. Induction and Suppression of RNA Silencing in the *Agrobacterium*-Mediated Transient Expression System. *Plant Physiol* 126:930–938
- Johnson RA, Gurevich V, Levy AA (2013) A rapid assay to quantify the cleavage efficiency of custom-designed nucleases *in planta*. *Plant Mol Biol* 82:207–221
- Jordan MC, McHughen A (1988) Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots. *Plant Cell Reports* 7:285–287
- Jorgensen JH (1992) Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63:141–152
- Kamo K, Jones B, Castillon J, Bolar J, Smith F (2004) Dispersal and size fractionation of embryogenic callus increases the frequency of embryo maturation and conversion in hybrid tea roses. *Plant Cell Reports* 22:787–792
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Tao G-Q, Nehra NS, Lu C-Y, Dyson BK, Tsuda S, Ashikari T, Kusumi T, Mason JG, Tanaka Y (2007) Engineering of the Rose Flavonoid Biosynthetic Pathway Successfully Generated Blue-Hued Flowers Accumulating Delphinidin. *Plant Cell Physiol* 48:1589–1600
- Kaufmann H, Mattiesch L, Lörz H, Debener T (2003) Construction of a BAC library of *Rosa rugosa* Thunb. and assembly of a contig spanning *Rdr1*, a gene that confers resistance to blackspot. *Mol Gen Genet* 268:666–674
- Kaufmann H, Qiu X, Wehmeyer J, Debener T (2012) Isolation, Molecular Characterization, and Mapping of Four Rose *MLO* Orthologs. *Front Plant Sci* 3. doi: 10.3389/fpls.2012.00244
- Kawamura K, Hibrand-Saint Oyant L, Thouroude T, Jeauffre J, Foucher F (2015) Inheritance of garden rose architecture and its association with flowering behaviour. *Tree Genet Genomes* 11. doi: 10.1007/s11295-015-0844-3
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U (2007) A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science* 318:648–651
- Kessler SA, Shimosato-Asano H, Keinath NF, Wuest SE, Ingram G, Panstruga R, Grossniklaus U (2010) Conserved Molecular Components for Pollen Tube Reception and Fungal Invasion. *Science* 330:968–971
- Kim H, Um E, Cho S-R, Jung C, Kim H, Kim J-S (2011) Surrogate reporters for enrichment of cells with nuclease-induced mutations. *Nat Meth* 8:941–943
- Kim O-H, Cho H-J, Han E, Hong TI, Ariyasiri K, Choi J-H, Hwang K-S, Jeong Y-M, Yang S-Y, Yu K, Park D-S, Oh H-W, Davis EE, Schwartz CE, Lee J-S, Kim H-G, Kim C-H (2017a) Zebrafish knockout of Down syndrome gene, *DYRK1A*, shows social impairments relevant to autism. *Mol Autism* 8:50. doi: 10.1186/s13229-017-0168-2
- Kim GA, Lee EM, Jin J-X, Lee S, Taweechaipaisankul A, Hwang JI, Alam Z, Ahn C, Lee BC (2017b) Generation of *CMAHKO/GTKO/shTNFR1-Fc/HO-1* quadruple gene modified pigs. *Transgenic Res* 26:435–445

- Kim MC, Panstruga R, Elliott C, Müller J, Devoto A, Yoon HW, Park HC, Cho M, Schulze-Lefert P (2002) Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416:447–450
- Kim CK, Chung JD, Park SH, Burrell AM, Kamo KK, Byrne DH (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of *Rosa hybrida* using the Green Fluorescent Protein (GFP) Gene. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 78:107–111
- Kim SW, Oh SC, In DS, Liu JR (2003) Plant regeneration of rose (*Rosa hybridia*) from embryogenic cell-derived protoplasts. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 73:15–19
- Klie M (2011) Validierung von Referenzgenen für die Real-Time quantitative PCR bei Rosen: „Vertrauen ist gut, Kontrolle ist besser“. M. Sc. Arbeit, Leibniz Universität Hannover
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533:420–424
- Koning-Boucoiran CFS, Gitonga VW, Yan Z, Dolstra O, van der Linden CG, van der Schoot J, Uenk GE, Verlinden K, Smulders MJM, Krens FA, Maliepaard C (2012) The mode of inheritance in tetraploid cut roses. *Theor Appl Genet* 125:591–607
- Koopman WJM, Wissemann V, Cock K de, van Huylenbroeck J, Riek J de, Sabatino GJH, Visser D, Vosman B, Ritz CM, Maes B, Werlemark G, Nybom H, Debener T, Linde M, Smulders MJM (2008) AFLP markers as a tool to reconstruct complex relationships: A case study in *Rosa* (Rosaceae). *Amer J Bot* 95:353–366
- Koscianska E, Kalantidis K, Wypijewski K, Sadowski J, Tabler M (2005) Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol* 59:647–661
- Kuhn H, Kwaaitaal M, Kusch S, Acevedo-Garcia J, Wu H, Panstruga R (2016) Biotrophy at Its Best: Novel Findings and Unsolved Mysteries of the Arabidopsis-Powdery Mildew Pathosystem. *The Arabidopsis Book* 14:e0184. doi: 10.1199/tab.0184
- Kumar J, Hüchelhoven R, Beckhove U, Nagarajan S, Kogel K-H (2001) A Compromised Mlo Pathway Affects the Response of Barley to the Necrotrophic Fungus *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and Its Toxins. *Phytopathology* 91:127–133
- Kusch S, Pesch L, Panstruga R (2016) Comprehensive Phylogenetic Analysis Sheds Light on the Diversity and Origin of the MLO Family of Integral Membrane Proteins. *Genome Biol Evol* 8:878–895
- Kwon C, Neu C, Pajonk S, Yun HS, Lipka U, Humphry M, Bau S, Straus M, Kwaaitaal M, Rampelt H, Kasmi FE, Jürgens G, Parker J, Panstruga R, Lipka V, Schulze-Lefert P (2008) Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature* 451:835–840
- Lalonde S, Sero A, Pratelli R, Pilot G, Chen J, Sardi MI, Parsa SA, Kim D-Y, Acharya BR, Stein EV, Hu H-C, Villiers F, Takeda K, Yang Y, Han YS, Schwacke R, Chiang W, Kato N, Loqué D, Assmann SM, Kwak JM, Schroeder JI, Rhee SY, Frommer WB (2010) A membrane protein/signaling protein interaction network for *Arabidopsis* version AMPv2. *Front Physiol* 1:24. doi: 10.3389/fphys.2010.00024
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60:197–214
- Lenth RV (2016) Least-Squares Means: The R Package lsmeans. *J Stat Softw* 69:1–33

- Leus L, Dewitte A, Huylenbroeck J van, Vanhoutte N, Bockstaele E van, Höfte M (2006) *Podosphaera pannosa* (syn. *Sphaerotheca pannosa*) on *Rosa* and *Prunus* spp.: Characterization of Pathotypes by Differential Plant Reactions and ITS Sequences. *J Phytopathol* 154:23–28
- Li X, Krasnyanski SF, Korban SS (2002) Optimization of the *uidA* gene transfer into somatic embryos of rose via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol Biochem* 40:453–459
- Li X, Gasic K, Cammue B, Broekaert W, Korban SS (2003) Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, *Ace-AMPI*, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*). *Planta* 218:226–232
- Li T, Huang S, Zhao X, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2011a) Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 39:6315–6325
- Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2011b) TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res* 39:359–372
- Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012a) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* 30:390–392
- Li L, Piatek MJ, Atef A, Piatek A, Wibowo A, Fang X, Sabir JSM, Zhu J-K, Mahfouz MM (2012b) Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification. *Plant Mol Biol* 78:407–416
- Li H, Wang G, Hao Z, Zhang G, Qing Y, Liu S, Qing L, Pan W, Chen L, Liu G, Zhao R, Jia B, Zeng L, Guo J, Zhao L, Zhao H, Lv C, Xu K, Cheng W, Li H, Zhao H-Y, Wang W, Wei H-J (2016) Generation of biallelic knock-out sheep via gene-editing and somatic cell nuclear transfer. *Sci Rep* 6:33675. doi: 10.1038/srep33675
- Li C, Unver T, Zhang B (2017a) A high-efficiency CRISPR/Cas9 system for targeted mutagenesis in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Sci Rep* 7:43902. doi: 10.1038/srep43902
- Li B, Yang H, Wang X, Zhan Y, Sheng W, Cai H, Xin H, Liang Q, Zhou P, Lu C, Qian R, Chen S, Yang P, Zhang J, Shou W, Huang G, Liang P, Sun N (2017b) Engineering human ventricular heart muscles based on a highly efficient system for purification of human pluripotent stem cell-derived ventricular cardiomyocytes. *Stem Cell Res Ther* 8:202. doi: 10.1186/s13287-017-0651-x
- Li J, Sun Y, Du J, Zhao Y, Xia L (2017c) Generation of Targeted Point Mutations in Rice by a Modified CRISPR/Cas9 System. *Mol Plant* 10:526–529
- Li R, Li R, Li X, Fu D, Zhu B, Tian H, Luo Y, Zhu H (2017d) Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of  $\gamma$ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotech J*. doi: 10.1111/pbi.12781
- Liang D, White RG, Waterhouse PM (2012) Gene silencing in Arabidopsis spreads from the root to the shoot, through a gating barrier, by template-dependent, nonvascular, cell-to-cell movement. *Plant Physiol* 159:984–1000
- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C (2017) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 8:14261. doi: 10.1038/ncomms14261

- Linde M, Debener T (2003) Isolation and identification of eight races of powdery mildew of roses (*Podosphaera pannosa*) (Wallr.: Fr.) de Bary and the genetic analysis of the resistance gene *Rpp1*. *Theor Appl Genet* 107:256–262
- Linde M, Shishkoff N (2003) Powdery Mildew. In: Roberts AV, Debener T, Gudin S (eds) *Encyclopedia of Rose Science*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, Boston. ISBN: 0-12-227620-5, pp 158–165
- Linde M, Mattiesch L, Debener T (2004) *Rpp1*, a dominant gene providing race-specific resistance to rose powdery mildew (*Podosphaera pannosa*): molecular mapping, SCAR development and confirmation of disease resistance data. *Theor Appl Genet* 109:1261–1266
- Linde M, Hattendorf A, Kaufmann H, Debener T (2006) Powdery mildew resistance in roses: QTL mapping in different environments using selective genotyping. *Theor Appl Genet* 113:1081–1092
- Liu Y, Merrick P, Zhang Z, Ji C, Yang B, Fei S-Z (2017) Targeted mutagenesis in tetraploid switchgrass (*Panicum virgatum* L.) using CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J*. doi: 10.1111/pbi.12778
- Lor VS, Starker CG, Voytas DF, Weiss D, Olszewski NE (2014) Targeted mutagenesis of the tomato *PROCERA* gene using transcription activator-like effector nucleases. *Plant Physiol* 166:1288–1291
- Lorek J, Griebel T, Jones AM, Kuhn H, Panstruga R (2013) The Role of *Arabidopsis* Heterotrimeric G-Protein Subunits in MLO2 Function and MAMP-Triggered Immunity. *Mol Plant Microbe Interact* 26:991–1003
- Lorek JA (2012) Molecular characterization of *mlo*-based powdery mildew resistance and the role of heterotrimeric G-protein signaling in *Arabidopsis* defense. Dissertation, Universität zu Köln
- Lottspeich F, Zorbas H (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin. ISBN: 3-8274-0041-4
- Lucas JA (1998) *Plant Pathology and Plant Pathogens*, 3rd edn. Blackwell Science, Oxford, Malden. ISBN: 0-632-03046-1
- Maheshwari R (2012) *Fungi: Experimental Methods in Biology*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton. ISBN: 978-1-4398-3903-4
- Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu J-K (2011) De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2623–2628
- Mak AN-S, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL (2012) The Crystal Structure of TAL Effector PthXo1 Bound to Its DNA Target. *Science* 335:716–719
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost, John, Koonin EV (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 9:467–477
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost, John, Backofen R, Koonin EV (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 13:722–736

- Makarova KS, Zhang F, Koonin EV (2017) SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Cell* 168. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.038
- Malek B von, Debener T (1998) Genetic analysis of resistance to blackspot (*Diplocarpon rosae*) in tetraploid roses. *Theor Appl Genet* 96:228–231
- Malek B von, Weber WE, Debener T (2000) Identification of molecular markers linked to *Rdr1*, a gene conferring resistance to blackspot in rose. *Theor Appl Genet* 101:977–983
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM (2013) RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* 339:823–826
- Malzahn A, Lowder L, Qi Y (2017) Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell Biosci* 7. doi: 10.1186/s13578-017-0148-4
- Marchant R, Power JB, Lucas JA, Davey MR (1998a) Biolistic Transformation of Rose (*Rosa hybrida* L.). *Ann Bot* 81:109–114
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Lamb CJ, Dixon RA, Power JB (1998b) Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). *Mol Breed* 4:187–194
- Marraffini LA, Sontheimer EJ (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science* 322:1843–1845
- Matthews D, Mottley J, Horan I, Roberts AV (1991) A protoplast to plant system in roses. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 24:173–180
- McDonald BA, Linde C (2002) The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124:163–180
- McGrann GRD, Stavrinides A, Russell J, Corbitt MM, Booth A, Chartrain L, Thomas, William T B, Brown, James K M (2014) A trade off between *mlo* resistance to powdery mildew and increased susceptibility of barley to a newly important disease, Ramularia leaf spot. *J Exp Bot* 65:1025–1037
- Melchers LS, Regensburg-Tuink AJG, Schilperoort RA, Hooykaas PJJ (1989) Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. *Mol Microbiol* 3:969–977
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 19:5194–5201
- Mikami M, Toki S, Endo M (2015) Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice. *Plant Cell Rep* 34:1807–1815
- Mikami M, Toki S, Endo M (2016) Precision Targeted Mutagenesis via Cas9 Paired Nickases in Rice. *Plant Cell Physiol* 57:1058–1068
- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29:143–148

- Mirzaei K, Bahramnejad B, Shamsifard MH, Zamani W (2014) *In silico* identification, phylogenetic and bioinformatic analysis of argonaute genes in plants. *Int J Genomics*. doi: 10.1155/2014/967461
- Moghaddam HH, Leus L, Riek J de, Huylenbroeck J van, Bockstaele E van (2012) Construction of a genetic linkage map with SSR, AFLP and morphological markers to locate QTLs controlling pathotype-specific powdery mildew resistance in diploid roses. *Euphytica* 184:413–427
- Moghaddam HH, Dewitte A, van Bockstaele E, van Huylenbroeck J, Leus L (2013) Roses Exhibit Pathotype-specific Resistance Responses to Powdery Mildew. *J Phytopathol*. doi: 10.1111/jph.12159
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60:174–182
- Morbitzer R, Elsaesser J, Hausner J, Lahaye T (2011) Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. *Nucleic Acids Res* 39:5790–5799
- Morineau C, Bellec Y, Tellier F, Gissot L, Kelemen Z, Nogué F, Faure J-D (2017) Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. *Plant Biotechnol J* 15:729–739
- Moscou MJ, Bogdanove AJ (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326:1501
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* 59:501–520
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Mussolino C, Morbitzer R, Lutge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T (2011) A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res* 39:9283–9293
- Mysore KS, Ryu C-M (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci* 9:97–104
- Nakai Y, Nakajima K, Robert J, Yaoita Y (2016) Ouro proteins are not essential to tail regression during *Xenopus tropicalis* metamorphosis. *Genes Cells* 21:275–286
- Nakajima I, Ban Y, Azuma A, Onoue N, Moriguchi T, Yamamoto T, Toki S, Endo M (2017) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *PLoS One* 12. doi: 10.1371/journal.pone.0177966
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *in trans*. *Plant Cell* 2:279–289
- Narayanasamy P (2008) *Molecular Biology in Plant Pathogeneses and Disease Management: Disease Management: Volume 3*. Springer, Dordrecht. ISBN: 978-1-4020-8246-7

- Nekrasov V, Wang C, Win J, Lanz C, Weigel D, Kamoun S (2017) Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep* 7. doi: 10.1038/s41598-017-00578-x
- Nelson D, Cox M (2009) *Lehninger Biochemie*. Springer, Heidelberg, Berlin
- Newton AC, Young IM (1996) Temporary partial breakdown of Mlo-resistance in spring barley by the sudden relief of soil water stress. *Plant Pathol* 45:973–977
- Nicholas KB, Nicholas HB (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author
- Nicolia A, Proux-Wéra E, Åhman I, Onkokesung N, Andersson M, Andreasson E, Zhu L-H (2015) Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *Biotechnol J* 204:17–24
- Noack R (2003) Selection Strategies for Disease and Pest Resistance. In: Roberts AV, Debener T, Gudin S (eds) *Encyclopedia of Rose Science*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, Boston. ISBN: 0-12-227620-5, pp 49–55
- Nürnberger T, Lipka V (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol* 6:335–345
- Nybom H (2009) Introduction to Rosa. In: Folta KM, Gardiner SE (eds) *Genetics and Genomics of Rosaceae*. Springer, New York, pp 339–351
- Oliveira MLP de, Febres VJ, Costa MGC, Moore GA, Otoni WC (2009) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports* 28:387–395
- Opalski KS, Schultheiss H, Kogel K-H, Hückelhoven R (2005) The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *Plant J* 41:291–303
- Osborn MJ, Webber BR, Knipping F, Lonetree C-I, Tennis N, DeFeo AP, McElroy AN, Starker CG, Lee C, Merkel S, Lund TC, Kelly-Spratt KS, Jensen MC, Voytas DF, Kalle C von, Schmidt M, Gabriel R, Hippen KL, Miller JS, Scharenberg AM, Tolar J, Blazar BR (2016) Evaluation of TCR Gene Editing Achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL Nucleases. *Mol Ther* 24:570–581
- Paces J, Nic M, Novotny T, Svoboda P (2017) Literature review of baseline information to support the risk assessment of RNAi-based GM plants. EFSA Supporting Publications EN-1246. doi: 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1246
- Page A, Angell S (2002) Transient expression of reporter proteins can alter plant gene expression. *Plant Sci*. 163:431–437
- Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, Vaucheret H (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 16:4738–4745
- Pan C, Ye L, Qin L, Liu X, He Y, Wang J, Chen L, Lu G (2016) CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Sci Rep* 6. doi: 10.1038/srep24765

- Panstruga R (2005a) Discovery of Novel Conserved Peptide Domains by Ortholog Comparison within Plant Multi-Protein Families. *Plant Mol Biol* 59:485–500
- Panstruga R (2005b) Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi. *Biochem Soc Trans* 33:389–392
- Park SH, Lee B-M, Salas MG, Srivatanakul M, Smith RH (2000) Shorter T-DNA or additional virulence genes improve *Agrobacterium*-mediated transformation. *Theor Appl Genet* 101:1015–1020
- Parlevliet JE (2002) Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124:147–156
- Pati PK, Sharma M, Ahuja PS (2004) Isolation of microspore protoplasts in *Rosa* L. *Curr Sci* 87:23–24
- Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR (2013) High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol* 31:839–843
- Pavan S, Jacobsen E, Visser RGF, Bai Y (2010) Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Mol Breed* 25:1–12
- Pavan S, Schiavulli A, Appiano M, Marcotrigiano AR, Cillo F, Visser RGF, Bai Y, Lotti C, Ricciardi L (2011) Pea powdery mildew *erl* resistance is associated to loss-of-function mutations at a *MLO* homologous locus. *Theor Appl Genet* 123:1425–1431
- Pemberton HB (2003) Overview of Roses and Culture. In: Roberts AV, Debener T, Gudin S (eds) *Encyclopedia of Rose Science*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, Boston. ISBN: 0-12-227620-5, pp 570–573
- Peng A, Chen S, Lei T, Xu L, He Y, Wu L, Yao L, Zou X (2017) Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnol J*. doi: 10.1111/pbi.12733
- Pessina S, Pavan S, Catalano D, Gallotta A, Visser RGF, Bai Y, Malnoy M, Schouten HJ (2014) Characterization of the *MLO* gene family in *Rosaceae* and gene expression analysis in *Malus domestica*. *BMC Genomics* 15:618. doi: 10.1186/1471-2164-15-618
- Pessina S, Lenzi L, Perazzolli M, Campa M, Dalla Costa L, Urso S, Vale G, Salamini F, Velasco R, Malnoy M (2016a) Knockdown of *MLO* genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine. *Hort Res* 3. doi: 10.1038/hortres.2016.16
- Pessina S, Angeli D, Martens S, Visser RGF, Bai Y, Salamini F, Velasco R, Schouten HJ, Malnoy M (2016b) The knock-down of the expression of *MdMLO19* reduces susceptibility to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple (*Malus domestica*). *Plant Biotech J* 14:2033–2044
- Pessina S, Palmieri L, Bianco L, Gassmann J, van de Weg E, Visser RGF, Magnago P, Schouten HJ, Bai Y, Riccardo Velasco R, Malnoy M (2017) Frequency of a natural truncated allele of *MdMLO19* in the germplasm of *Malus domestica*. *Mol Breed* 37:7. doi: 10.1007/s11032-016-0610-8
- Peterhänsel C, Freialdenhoven A, Kurth J, Kolsch R, Schulze-Lefert P (1997) Interaction Analyses of Genes Required for Resistance Responses to Powdery Mildew in Barley Reveal Distinct Pathways Leading to Leaf Cell Death. *Plant Cell* 9:1397–1409

- Peterson BA, Haak DC, Nishimura MT, Teixeira PJPL, James SR, Dangl JL, Nimchuk ZL (2016) Genome-Wide Assessment of Efficiency and Specificity in CRISPR/Cas9 Mediated Multiple Site Targeting in Arabidopsis. PLoS One 11:e0162169. doi: 10.1371/journal.pone.0162169
- Phillips R, Rix M (1988) Roses, 1st edn. Random House, New York. ISBN: 0-394-75867-6
- Piffanelli P, Zhou F, Casais C, Orme J, Jarosch B, Schaffrath U, Collins NC, Panstruga R, Schulze-Lefert P (2002) The Barley MLO Modulator of Defense and Cell Death Is Responsive to Biotic and Abiotic Stress Stimuli. Plant Physiol 129:1076–1085
- Piffanelli P, Ramsay L, Waugh R, Benabdelmouna A, D'Hont A, Hollricher K, Jorgensen JH, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2004) A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew. Nature 430:887–891
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ (2009) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. Trends Plant Sci 14:21–29
- Qiu X, Wang Q, Zhang H, Jian H, Zhou N, Ji C, Yan H, Bao M, Tang K (2015a) Antisense *RhMLO1* Gene Transformation Enhances Resistance to the Powdery Mildew Pathogen in *Rosa multiflora*. Plant Mol Biol Rep 33:1659–1665
- Qiu X, Jian H, Wang Q, Tang K, Bao M (2015b) Expression Pattern Analysis of Four *Mlo* Genes from Rose. J Am Soc Hortic Sci 140:333–338
- Quambusch M (2016) Characterization and utilization of bacterial endophytes during in vitro culture of wild cherry (*Prunus avium* L.): Improved in vitro rooting of *Prunus avium* microshoots by a dark treatment and an auxin pulse. Dissertation, Leibniz Universität Hannover
- R Core Team (2016) R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci Lett 339:62–66
- Ramlee MK, Yan T, Cheung AMS, Chuah CTH, Li S (2015) High-throughput genotyping of CRISPR/Cas9-mediated mutants using fluorescent PCR-capillary gel electrophoresis. Sci Rep 5:15587. doi: 10.1038/srep15587
- Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F (2013a) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell 154:1380–1389
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013b) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc 8:2281–2308
- Rayapuram C, Jensen MK, Maiser F, Shanir JV, Hornshøj H, Rung JH, Gregersen PL, Schweizer P, Collinge DB, Lyngkjær MF (2012) Regulation of basal resistance by a powdery mildew-induced cysteine-rich receptor-like protein kinase in barley. Mol Plant Pathol 13:135–147
- Reinstädler A, Müller J, Czembor JH, Piffanelli P, Panstruga R (2010) Novel induced *mlo* mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionally important domains in the heptahelical barley Mlo protein. BMC Plant Biol 10:1–13
- Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK (2012) FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nat Biotechnol 30:460–465

- Roman H, Rapicault M, Miclot AS, Larenaudie M, Kawamura K, Thouroude T, Chastellier A, Lemarquand A, Dupuis F, Foucher F, Loustau S, Hibrand-Saint Oyant L (2015) Genetic analysis of the flowering date and number of petals in rose. *Tree Genet Genomes* 11:1052. doi: 10.1007/s11295-015-0906-6
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauß T, Bonas U, Lahaye T (2007) Plant Pathogen Recognition Mediated by Promoter Activation of the Pepper *Bs3* Resistance Gene. *Science* 318:645–648
- Römer P, Recht S, Lahaye T (2009) A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:20526–20531
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37:e45. doi: 10.1093/nar/gkp045
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10:937–946
- Sachs T, Thimann KV (1967) The Role of Auxins and Cytokinins in the Release of Buds From Dominance. *Amer J Bot* 54:136–144
- Salomon S, Puchta H (1998) Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J* 17:6086–6095
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. ISBN: 0879695773
- Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F (2017) Low-gluten, non-transgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J*. doi: 10.1111/pbi.12837
- Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F (2012) A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc* 7:171–192
- Santarém ER, Trick HN, Essig JS, Finer JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Reports* 17:752–759
- Santos-Rosa M, Poutaraud A, Merdinoglu D, Mestre P (2008) Development of a transient expression system in grapevine via agro-infiltration. *Plant Cell Rep* 27:1053–1063
- Schiml S, Fauser F, Puchta H (2014) The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for *in planta* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J* 80:1139–1150
- Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, Höning K, Hornung V (2012) A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol* 31:76–81
- Schmidt N, Merker M, Becker D (2012) Novel high-throughput RNAi vectors for plant biotechnology. *Plant Breeding* 131:453–456
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233–234

- Schulze-Lefert P (2004) Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 7:377–383
- Schürmann F (2015) RNAi "gene-silencing" von *Mlo* Genen in Rosen: phänotypische und molekularbiologische Untersuchungen potentiell transgener Pflanzen. M. Sc. Arbeit, Heinrich Heine Universität Düsseldorf
- Seifi A, Gao D, Zheng Z, Pavan S, Faino L, Visser RGF, Wolters A-MA, Bai Y (2014) Genetics and molecular mechanisms of resistance to powdery mildews in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. *Eur J Plant Pathol* 138:641–665
- Senthil-Kumar M, Hema R, Anand A, Kang L, Udayakumar M, Mysore KS (2007) A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytol.* 176:782–791
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu J-L, Gao C (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31:686–688
- Shirasu K, Schulze-Lefert P (2000) Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol Biol* 44:371–385
- Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV (2015) Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell* 60:385–397
- Song J-J, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2004) Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science* 305:1434–1437
- Souq F, Coutos-Thevenot P, Yean H, Delbard G, Maziere Y, Barbe JP, Boulay M (1996) Genetic transformation of roses, 2 examples: one on morphogenesis, the other on anthocyanin biosynthetic pathway. *Acta Hort* 424:381–388
- Spiller M, Linde M, Hibrand-Saint Oyant L, Tsai C-J, Byrne DH, Smulders MJM, Foucher F, Debener T (2011) Towards a unified genetic map for diploid roses. *Theor Appl Genet* 122:489–500
- Squirrell J, Mandegaran Z, Yokoya K, Roberts AV, Mottley J (2005) Cell lines and plants obtained after protoplast fusions of *Rosa+Rosa*, *Rosa+Prunus* and *Rosa+Rubus*. *Euphytica* 146:223–231
- Stachel SE, Nester EW, Zambryski PC (1986) A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:379–383
- Statistisches Bundesamt (2015) 122,5 Millionen Rosen im Februar 2014 importiert, Wiesbaden. [https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/zdw/2015/PD15\\_007\\_p002.html](https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/zdw/2015/PD15_007_p002.html). Zugriff: 19.09.2017
- Statistisches Bundesamt (2017a) Destatis. Statistisches Bundesamt. [www.destatis.de](http://www.destatis.de) Zugriff: 19.09.2017
- Statistisches Bundesamt (2017b) Fast 1 Milliarde Rosen aus den Niederlanden importiert, Wiesbaden. [https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/zdw/2017/PD17\\_007\\_p002.html](https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/zdw/2017/PD17_007_p002.html) Zugriff: 19.09.2017

- Steinert J, Schiml S, Puchta H (2016) Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants. *Plant Cell Rep* 35:1429–1438
- Strange RN (2003) *Introduction to Plant Pathology*. Wiley, New York. ISBN: 0-470-84973-8
- Streubel J, Blücher C, Landgraf A, Boch J (2012) TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nat Biotechnol* 30:593–595
- Sugi T, Sakuma T, Ohtani Y, Yamamoto T (2014) Versatile strategy for isolating transcription activator-like effector nuclease-mediated knockout mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Growth Differ* 56:78–85
- Sun X, Hu Z, Chen R, Jiang Q, Song G, Zhang H, Xi Y (2015) Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep* 5:10342. doi: 10.1038/srep10342
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC (1999) The *rde-1* Gene, RNA Interference, and Transposon Silencing in *C. elegans*. *Cell* 99:123–132
- Takamatsu S (2004) Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (Erysiphales, Ascomycota) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycoscience* 45:147–157
- Tang X, Frederick RD, Zhou J, Halterman DA, Jia Y, Martin GB (1996) Initiation of Plant Disease Resistance by Physical Interaction of AvrPto and Pto Kinase. *Science* 274:2060–2062
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17:49–63
- Tang X, Lowder LG, Zhang T, Malzahn AA, Zheng X, Voytas DF, Zhong Z, Chen Y, Ren Q, Li Q, Kirkland ER, Zhang Y, Qi Y (2017) A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nat Plants* 3:17018. doi: 10.1038/nplants.2017.18
- Temmerman W, Vereecke D, Dreesen R, van Montagu M, Holsters M, Goethals K (2000) Leafy Gall Formation Is Controlled by *fasR*, an AraC-Type Regulatory Gene in *Rhodococcus fascians*. *J Bacteriol* 182:5832–5840
- Terefe-Ayana D, Yasmin A, Le TL, Kaufmann H, Biber A, Kühr A, Linde M, Debener T (2011) Mining Disease-Resistance Genes in Roses: Functional and Molecular Characterization of the *Rdr1* Locus. *Front Plant Sci* 2. doi: 10.3389/fpls.2011.00035
- Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, Santiago Y, Vincent AI, Meng X, Zhang L, Gregory PD, Anegón I, Cost GJ (2011) Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* 29:695–696
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* 11:1187–1194
- Thordal-Christensen H (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol* 6:351–357

- 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
- Trick HN, Finer JJ (1997) SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Res* 6:329–336
- Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, Goodwin MJ, Aryee MJ, Joung JK (2014) Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 32:569–576
- Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC (2002) Spreading of RNA Targeting and DNA Methylation in RNA Silencing Requires Transcription of the Target Gene and a Putative RNA-Dependent RNA Polymerase. *Plant Cell* 14:857–867
- van der Salm TPM, van der Toorn CJG, Bouwer R, Hänisch ten Cate CH, Dons HJM (1997) Production of *ROL* gene transformed plants of *Rosa hybrida* L. and characterization of their rooting ability. *Mol Breed* 3:39–47
- van Engelen FA, Molthoff JW, Conner AJ, Nap J-P, Pereira A, Stiekema WJ (1995) pBINPLUS: An improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Res* 4:288–290
- Vergne P, Maene M, Gabant G, Chauvet A, Debener T, Bendahmane M (2010) Somatic embryogenesis and transformation of the diploid *Rosa chinensis* cv Old Blush. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100:73–81
- Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95:177–187
- Voytas DF (2013) Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu Rev Plant Biol* 64:327–350
- Vukosavljev M, Arens P, Voorrips RE, van 't Westende WP, Esselink GD, Bourke PM, Cox P, van de Weg WE, Visser RG, Maliapaard C, Smulders MJ (2016) High-density SNP-based genetic maps for the parents of an outcrossed and a selfed tetraploid garden rose cross, inferred from admixed progeny using the 68k rose SNP array. *Hort Res* 3:16052. doi: 10.1038/hortres.2016.52
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J-L (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 32:947–951
- Wang X, Yamada S, LaRiviere WB, Ye H, Bakeberg JL, Irazabal MV, Chebib FT, van Deursen J, Harris PC, Sussman CR, Behfar A, Ward CJ, Torres VE (2017) Generation and phenotypic characterization of *Pdela* mutant mice. *PLoS One* 12:e0181087. doi: 10.1371/journal.pone.0181087
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994) RNA-Directed De Novo Methylation of Genomic Sequences in Plants. *Cell* 76:567–576
- Waterhouse PM, Helliwell CA (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* 4:29–38. doi: 10.1038/nrg982
- Waterworth WM, Drury GE, Bray CM, West CE (2011) Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *New Phytol* 192:805–822

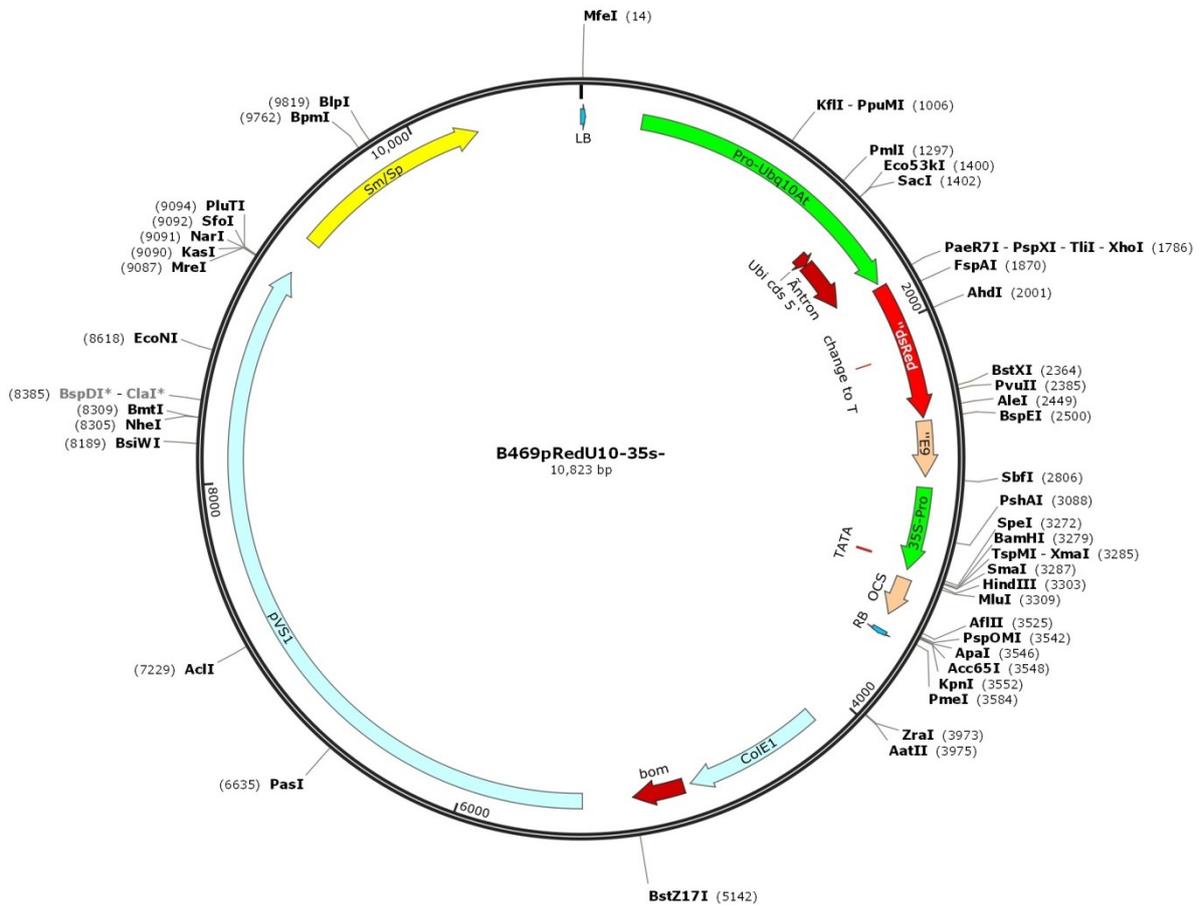
- Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S (2011) A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. PLoS One 6:e16765. doi: 10.1371/journal.pone.0016765.g001
- Wehmeyer J (2012) Molekulare Charakterisierung von *Mlo* orthologen Genen aus Rosen. M. Sc. Arbeit, Leibniz Universität Hannover
- Weigl K, Flachowsky H, Peil A, Hanke M-V (2015) Heat mediated silencing of *MdTFL1* genes in apple (*Malus × domestica*). Plant Cell Tiss Organ Cult 123:511–521
- Wheeler BEJ (1978) Powdery Mildews of Ornamentals. In: Spencer DM (ed) The Powdery Mildews. Academic Press, London, New York. ISBN: 0-12-656850-2, pp 411–445
- Wickham H (2009) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, 1st edn. Springer-Verlag, New York. ISBN: 978-3319242750
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature 482:331–338
- Wise AA, Liu Z, Binns AN (2006a) Culture and Maintenance of *Agrobacterium* Strains. In: Wang K (ed) *Agrobacterium* Protocols, 2nd edn. Humana Press, Totowa, NJ. ISBN: 1-58829-536-2, pp 3–13
- Wise AA, Liu Z, Binns AN (2006b) Three Methods for the Introduction of Foreign DNA into *Agrobacterium*. In: Wang K (ed) *Agrobacterium* Protocols, 2nd edn. Humana Press, Totowa, NJ. ISBN: 1-58829-536-2, pp 43–53
- Wissemann V, Ritz CM (2005) The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and *atpB-rbcL* intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. Bot J Linean Soc 147:275–290
- Wolfe MS, McDermott JM (1994) Population Genetics of Plant Pathogen Interactions: The Example of the *Erysiphe Graminis-Hordeum vulgare* Pathosystem. Annu Rev Phytopathol 32:89–113
- Wolter M, Hollricher K, Salamini F, Schulze-Lefert P (1993) The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. Mol Gen Genet 239:122–128
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim S-G, Kim S-T, Choe S, Kim J-S (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nat Biotechnol 33:1162–1164
- Wright AV, Nuñez JK, Doudna JA (2016) Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. Cell 164:29–44
- Wyman C, Kanaar R (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. Annu Rev Genet 40:363–383
- Xie K, Yang Y (2013) RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. Mol Plant 6:1975–1983
- Xing H-L, Dong L, Wang Z-P, Zhang H-Y, Han C-Y, Liu B, Wang X-C, Chen Q-J (2014) A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biol 14:327. doi: 10.1186/s12870-014-0327-y

- Xu X-M (1999) Effects of temperature on the latent period of the rose powdery mildew pathogen, *Sphaerotheca pannosa*. *Plant Pathol* 48:662–667
- Xu P, Zhang Y, Kang L, Roossinck MJ, Mysore KS (2006) Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol* 142:429–440
- Yan Z (2005) Towards efficient improvement of greenhouse grown roses: genetic analysis of vigour and powdery mildew resistance. Dissertation, Universität Wageningen
- Yan Z, Denneboom C, Hattendorf A, Dolstra O, Debener T, Stam P, Visser PB (2005) Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers. *Theor Appl Genet* 110:766–777
- Yan Z, Dolstra O, Prins TW, Stam P, Visser PB (2006) Assessment of partial resistance to powdery mildew (*Podosphaera pannosa*) in a tetraploid rose population using a spore-suspension inoculation method. *Eur J Plant Pathol* 114:301–308
- Yang H, Wu J-J, Tang T, Liu K-D, Dai C (2017) CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiently creates specific mutations at multiple loci using one sgRNA in *Brassica napus*. *Sci Rep* 7:7489. doi: 10.1038/s41598-017-07871-9
- Yasmin A, Debener T (2010) Transient gene expression in rose petals via *Agrobacterium* infiltration. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102:245–250
- Yin X, Biswal AK, Dionora J, Perdigon KM, Balahadia CP, Mazumdar S, Chater C, Lin H-C, Coe RA, Kretschmar T, Gray JE, Quick PW, Bandyopadhyay A (2017) CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cpf1 mediated targeting of a stomatal developmental gene *EPFL9* in rice. *Plant Cell Rep* 36:745–757
- Yokoya K, Roberts AV, Mottley J, Lewis R., Brandham PE (2000) Nuclear DNA Amounts in Roses. *Ann Bot* 85:557–561
- Young ND (1996) QTL Mapping and Quantitative Disease Resistance in Plants. *Annu Rev Phytopathol* 34:479–501
- Yu C, Le Luo, Pan H, Guo X, Wan H, Zhang Q (2014a) Filling gaps with construction of a genetic linkage map in tetraploid roses. *Front Plant Sci* 5:796. doi: 10.3389/fpls.2014.00796
- Yu Z, Chen H, Liu J, Zhang H, Yan Y, Zhu N, Guo Y, Yang B, Chang Y, Dai F, Liang X, Chen Y, Shen Y, Deng W-M, Chen J, Zhang B, Li C, Jiao R (2014b) Various applications of TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination to modify the *Drosophila* genome. *Biol Open* 3:271–280
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000) RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell* 101:25–33
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost, John, Regev A, Koonin EV, Zhang F (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 163:759–771
- Zhang Z, Henderson C, Perfect E, Carver TLW, Thomas BJ, Skamnioti P, Gurr SJ (2005) Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. *Mol Plant Pathol* 6:561–575

- Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N, Zhu J-K (2014) The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotech J* 12:797–807
- Zhang H, Xia R, Meyers BC, Walbot V (2015) Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Curr Opin Plant Biol* 27:84–90
- Zhang Y, Bai Y, Wu G, Zou S, Chen Y, Gao C, Tang D (2017) Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDRI* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J* 91:714–724
- Zheng Z, Appiano M, Pavan S, Bracuto V, Ricciardi L, Visser RGF, Wolters A-MA, Bai Y (2016) Genome-Wide Study of the Tomato *SIMLO* Gene Family and Its Functional Characterization in Response to the Powdery Mildew Fungus *Oidium neolycopersici*. *Front Plant Sci* 7:380. doi: 10.3389/fpls.2016.00380
- Zhou X, Jacobs TB, Xue L-J, Harding SA, Tsai C-J (2015) Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate:CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytol* 208:298–301
- Zhou SJ, Jing Z, Shi JL (2013) Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the *MLO* gene family in *Cucumis sativus*. *Genet Mol Res* 12:6565–6578
- Zlesak DC (2007) Rose: *Rosa x hybrida*. In: Anderson NO (ed) *Flower Breeding and Genetics: Issues, challenges and opportunities for the 21st century*. Springer, Dordrecht. ISBN: 978-1-4020-6569-9, pp 695–738
- Zong Y, Wang Y, Li C, Zhang R, Chen K, Ran Y, Qiu J-L, Wang D, Gao C (2017) Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol* 35:438–440

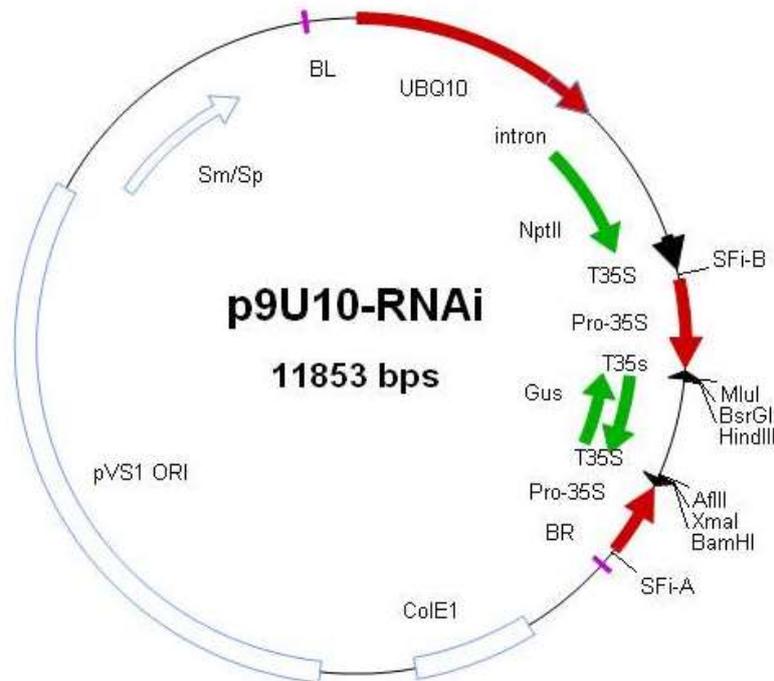
## 7 Anhang

### A.1. Vektoren



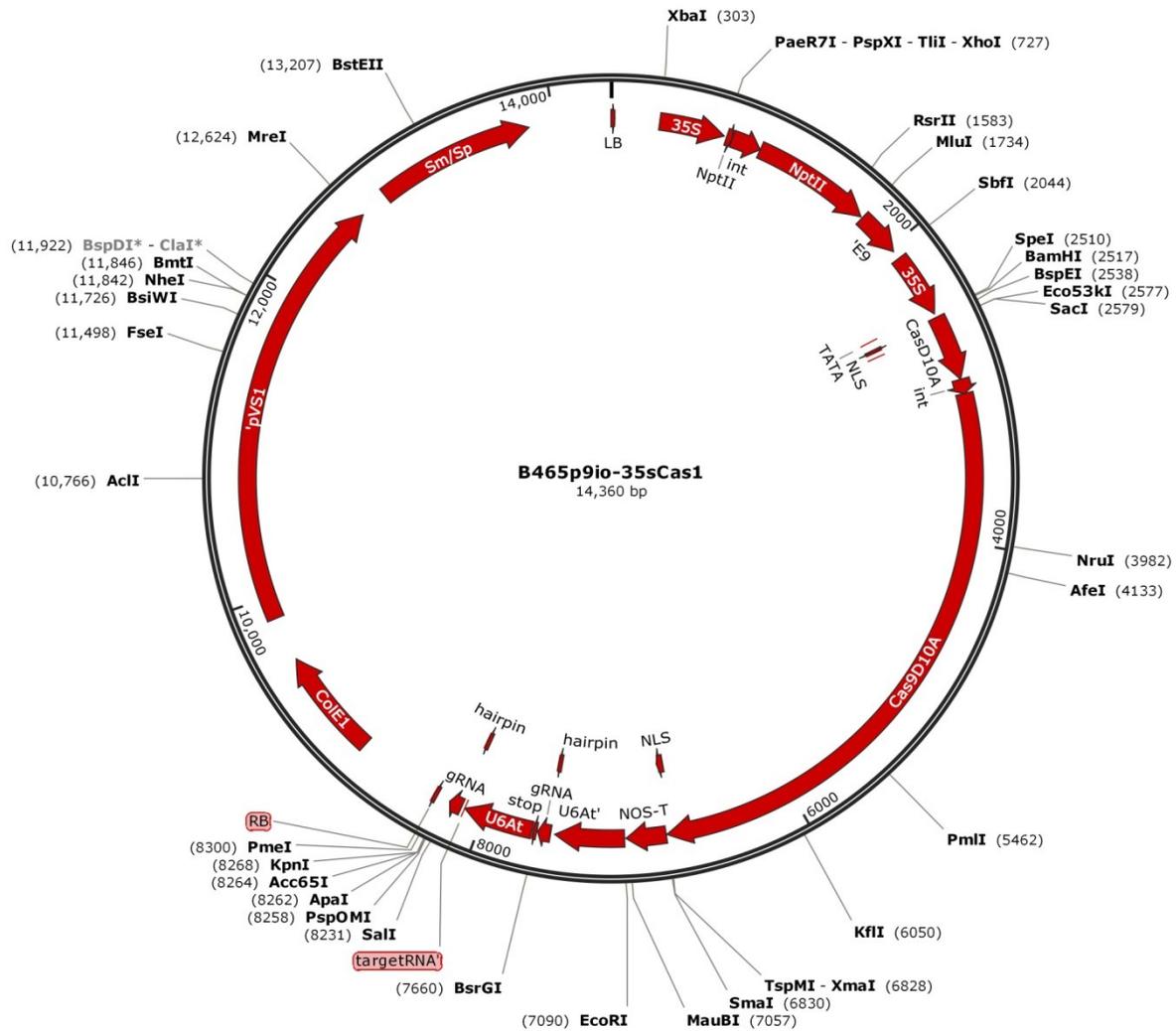
**Abbildung A.1.1: Vektorkarte pRedU10-35s.**

Zwischen der *left* und *right* border des Plasmids befindet sich das *dsRed* Gen unter Kontrolle des Pro-Ubiquitin Promotors aus *A. thaliana* (mit Intron) und des E9 Terminators aus Erbse sowie eine *multiple cloning site* (MCS) zwischen dem 35S Promotor aus CaMV und dem OCS Terminator aus *A. tumefaciens*. Neben den Replikationsursprüngen (ColE1, pVS1) besitzt der Plasmid den bakteriellen Selektionsmarker gegen Spectinomycin und Streptomycin (Sm/Sp). Quelle: DNA Cloning Service (Hamburg, Deutschland), die Karte wurde mit der Software SnapGene View erstellt.



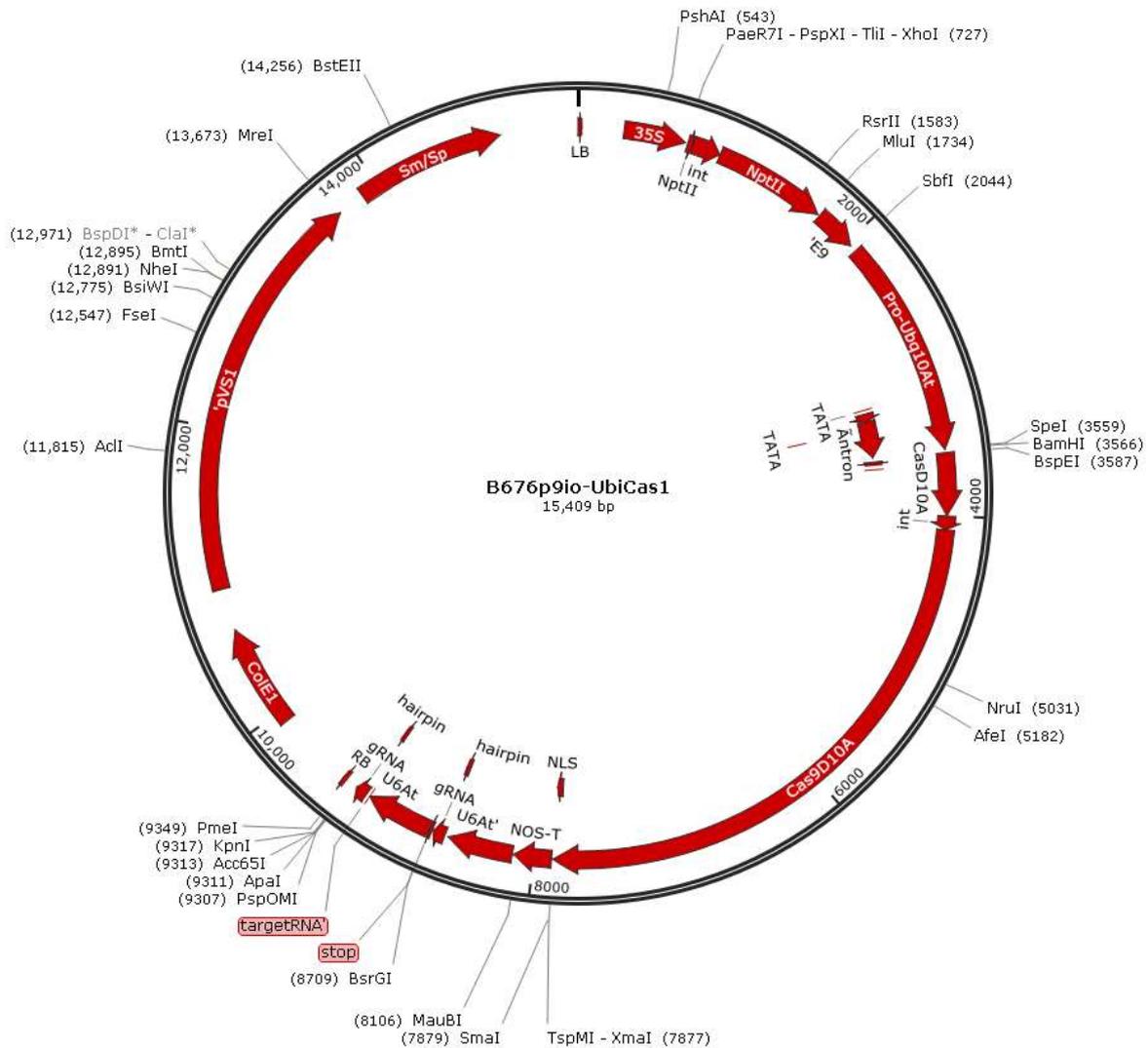
**Abbildung A.1.2: Vektorkarte p9U10-RNAi.**

Zwischen der *left* und *right border* (BL und BR) des Plasmids befindet sich das *NPTII* Gen für die Kanamycin-Resistenz (mit Intron) unter Kontrolle des Ubiquitin10 Promotors aus *A. thaliana* und des 35S Terminators aus CaMV. Downstream davon ist ein Fragment des *GUS* Gens unter Kontrolle zweier flankierender 35S Promotoren und Terminatoren aus CaMV lokalisiert. Das Fragment des *GUS* Gens befindet sich zwischen Sequenzen mit multiplen Restriktionsenzymen (u.a. HindIII und BamHI), welches das Ausschneiden des Fragments und die Klonierung eines Fragments beliebiger Größe ermöglicht. Die flankierenden 35S Promotoren verursachen die Transkription des Plus- und Minus-Strangs und somit das Vorliegen von dsRNA zum Auslösen des RNAi Mechanismus in der Zelle. Neben den Replikationsursprüngen (ColE1, pVS1) besitzt der Plasmid den bakteriellen Selektionsmarker gegen Spectinomycin und Streptomycin (Sm/Sp). Quelle: DNA Cloning Service (Hamburg, Deutschland).



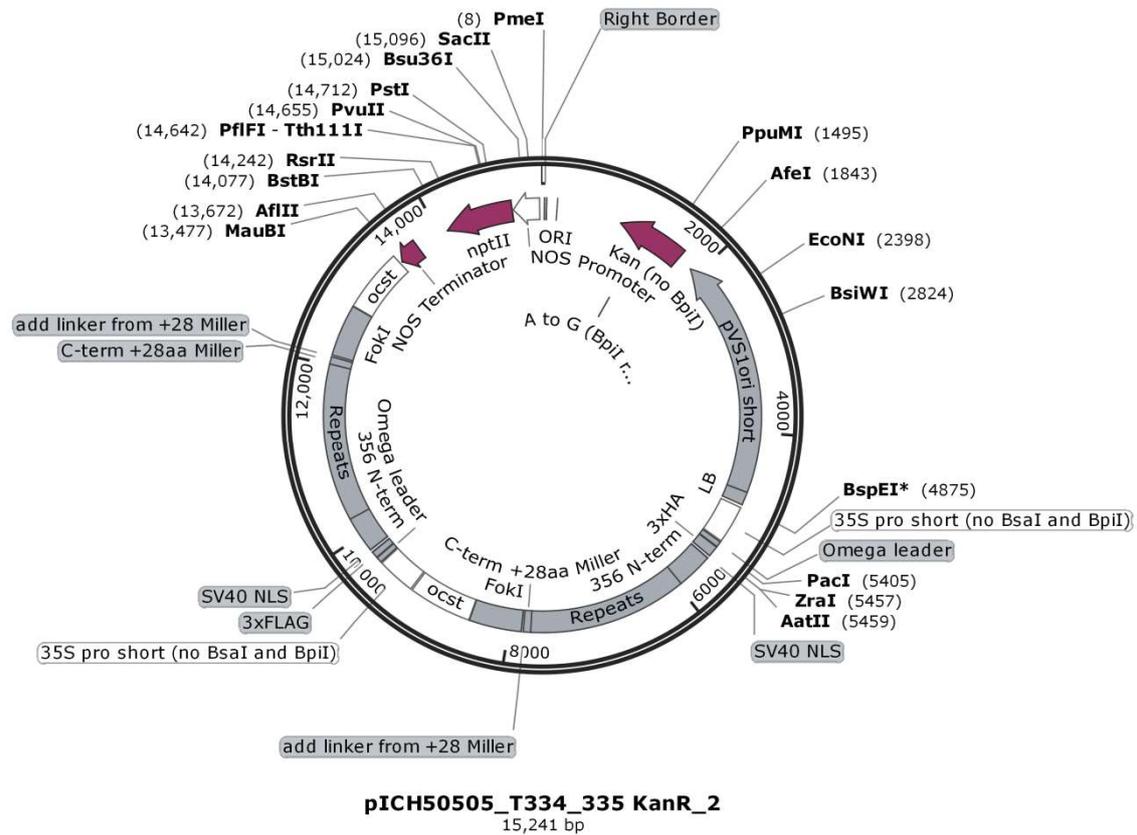
**Abbildung A.1.3: Vektorkarte p9io-35sCas10.**

Zwischen der *left* und *right border* des Plasmids befindet sich das *NPTII* Gen für die Kanamycin-Resistenz (mit Intron) unter Kontrolle des 35S Promotors aus CaMV und des E9 Terminators aus Erbse. Downstream davon ist die CRISPR/Cas Kassetten lokalisiert: Unter Kontrolle des 35S Promotors aus CaMV und des NOS Terminators aus *A. tumefaciens* befindet sich die Sequenz der CasD10A (mit Intron). Diese hat einen Aminosäureaustausch an 10. Position (D zu A), was dazu führt, dass die Nuklease einen Einzelstrangbruch anstelle eines Doppelstrangbruchs bewirkt. Downstream der CasD10A sind die beiden sgRNAs lokalisiert. Neben den Replikationsursprüngen (ColE1, pVS1) besitzt der Plasmid den bakteriellen Selektionsmarker gegen Spectinomycin und Streptomycin (Sm/Sp). Dieser Vektor wurde zur Erstellung der Konstrukte der ersten Generation verwendet. Quelle: DNA Cloning Service (Hamburg, Deutschland), die Karte wurde mit der Software SnapGene Viewer erstellt.



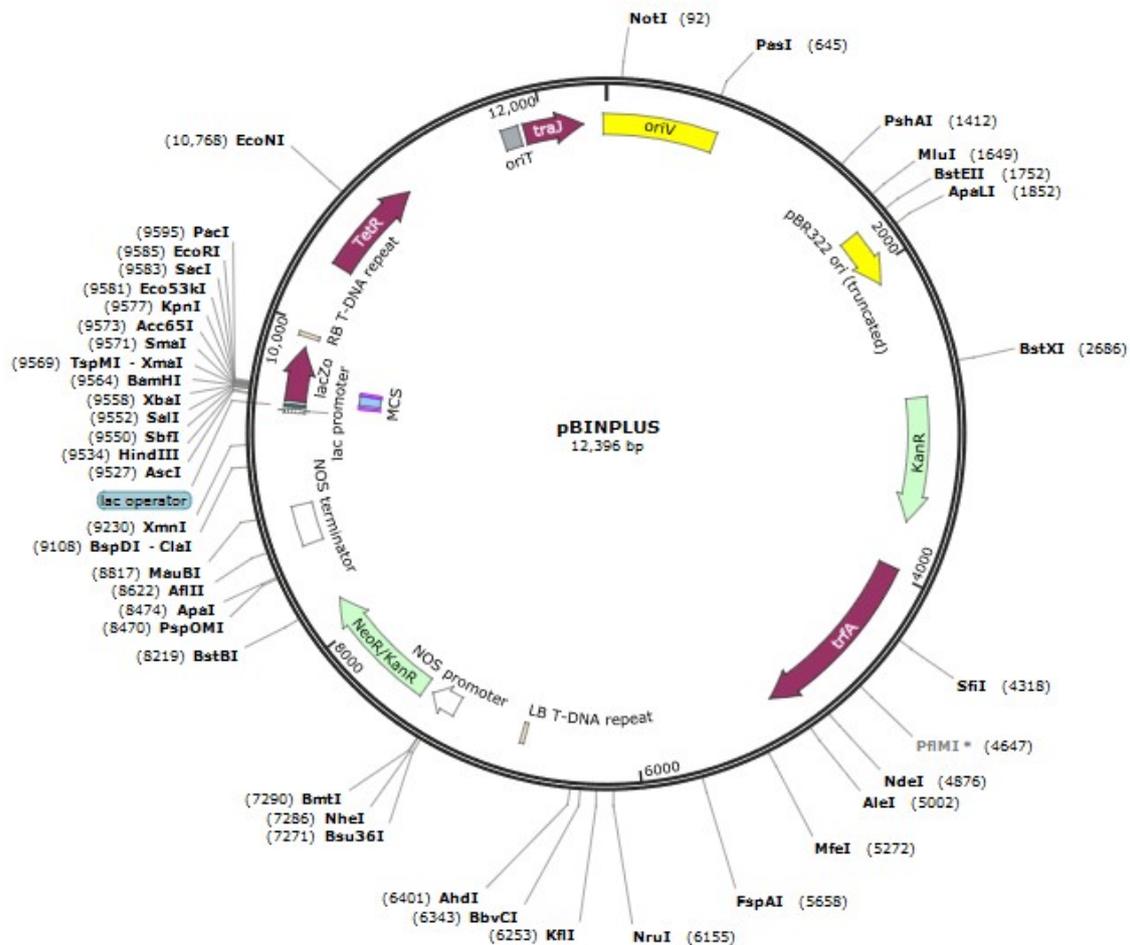
**Abbildung A.1.4: Vektorkarte p9io-UbiCas10.**

Zwischen der *left* und *right* border des Plasmids befindet sich das *NPTII* Gen für die Kanamycin-Resistenz (mit Intron) unter Kontrolle des 35S Promotors aus CaMV und des E9 Terminators aus Erbse. Downstream davon ist die CRISPR/Cas Kasette lokalisiert: Unter Kontrolle des Pro-Ubiquitin Promotors aus *A. thaliana* und des NOS Terminators aus *A. tumefaciens* befindet sich die Sequenz der CasD10A (mit Intron). Diese hat einen Aminosäureaustausch an 10. Position (D zu A), was dazu führt, dass die Nuklease einen Einzelstrangbruch anstelle eines Doppelstrangbruchs bewirkt. Downstream der CasD10A sind die beiden sgRNAs lokalisiert. Neben den Replikationsursprüngen (ColE1, pVS1) besitzt der Plasmid den bakteriellen Selektionsmarker gegen Spectinomycin und Streptomycin (Sm/Sp). Dieser Vektor wurde zur Erstellung der Konstrukte der zweiten Generation verwendet. Quelle: DNA Cloning Service (Hamburg, Deutschland), die Karte wurde erstellt mit der Software SnapGene Viewer.



#### Abbildung A.1.5: Vektorkarte pICH50505.

Bei der Vektorkarte von pICH50505\_T334\_335\_KanR handelt es sich um das Konstrukt TMlo3/4-1, welches hier stellvertretend für die TALEN Konstrukte der ersten Generation (im originären Vektor-Hintergrund) abgebildet ist. Zwischen der *left* und *right border* des Plasmids befindet sich das *NPTII* Gen für die Kanamycin-Resistenz unter Kontrolle des NOS Promotors und NOS Terminators (*nopaline synthase*) aus *A. tumefaciens*. Die TALEN Repeats der beiden TALEN Arme befinden sich jeweils Upstream der FokI Nuklease (durch linker getrennt) unter der Kontrolle des 35S Promotors von CaMV und *ocs* Terminators (*octopine synthase*) aus *A. tumefaciens*. Vor den TALEN Repeats sind jeweils noch Tags (3xFLAG, 3xHA) sowie eine *Omega leader* Sequenz aus TMV und ein NLS (*nuclear localization signal*) lokalisiert. Neben dem Replikationsursprung (pVS1ori short) besitzt der Plasmid den bakteriellen Selektionsmarker gegen Kanamycin (*NPTII*). Quelle: Bereitgestellt der von Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Lahaye, Universität Tübingen, Deutschland, Weber et al. 2011. Die Karte wurde mit der Software SnapGene Viewer erstellt.



**Abbildung A.1.6: Vektorkarte pBinPlus.**

Der Plasmid pBinPlus (van Engelen et al. 1995) wurde für die Herstellung der TALEN Konstrukte zweiter Generation verwendet, in dem die TALEN-Kassette in die MCS des Plasmids kloniert wurde (Arbeiten durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Lahaye, Universität Tübingen). Zwischen der *left* und *right border* des Plasmids befindet sich neben der MCS unter Kontrolle des lac Promotors (welche innerhalb des *lacZα* Gens liegt), das *NPTII* Gen für die Kanamycin-Resistenz unter Kontrolle des NOS Promotors und Terminators aus *A. tumefaciens*. Neben den Replikationsursprüngen (*oriT*, *oriV*) besitzt der Plasmid den bakteriellen Selektionsmarker gegen Kanamycin (KanR) und Tetracyclin (TetR) sowie das *trfA* Gen für die Plasmid-Replikation und das *traJ* Gen für die Replikation der T-DNA. Quelle Vektorkarte: SnapGene Viewer (snapgene.com).

## A.2. Kulturmedien und Puffer

### Medien der In-Vitro-Kultur von *R. hybrida* 'Pariser Charme'

Die verwendeten Medien basieren auf dem MS Medium nach Murashige und Skoog (1962) und den Veröffentlichungen von Dohm et al. 2001 und Dohm et al. 2002. In der nachfolgenden Tabelle sind die Zusammensetzung und der Anwendungsbereich des jeweiligen Mediums aufgeführt.

**Tabelle A.2.1: Medien der In-Vitro-Kultur von *R. hybrida***

Name	Anwendung	Zusammensetzung	PGRs
<b>89.66</b>	Vermehrung von Sprossen	1 x MS FeEDDHA (0,1 g/l) statt FeNaEDTA 8,5 g/l Plantagar pH-Wert: 5,8	0,5 mg/l BAP 0,1 mg/l GA <sub>3</sub>
<b>86.04</b>	Bewurzelung von Sprossen (ersten 5 Tage im Dunkeln)	½ MS 10 mM Riboflavin 8,5 g/l Plantagar pH-Wert: 5,8	0,2 mg/l IBA
<b>2.31</b>	Induktion von somatisch-embryogenem Kallus	½ MS 1xCaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O 0,25 g/l Vitamine <u>mit</u> Pepton 30 g/l Saccharose 2 g/l Glucose 4,3 g/l Gelrite pH-Wert: 5,5-5,6	0,4 mg/l 2-iP 1 mg/l 2,4-D
<b>87.13D</b>	Induktion von somatischen Embryonen	1 x MS 4,3 g/l Gelrite pH-Wert: 5,8	2 mg/l TDZ
<b>87.13E</b>	Erhaltung und Vermehrung von somatischen Embryonen	1 x MS 4,3 g/l Gelrite pH-Wert: 5,8	0,5 mg/l TDZ
<b>87.51</b>	Sprossinduktion/ Regeneration	1 x MS 4,3 g/l Gelrite pH-Wert: 5,8	0,01 mg/l IBA 2 mg/l BAP 0,1 mg/l GA <sub>3</sub>

**Tabelle A.2.2: Eingesetzte Antibiotika in der In-Vitro-Kultur von *R. hybrida***

Antibiotikum	Anwendung	Eingesetzte Konzentration
<b>Kanamycin</b>	Selektion auf <i>NPTII</i> Expression der transgenen Linien	100 - 150 mg/l
<b>Ticarcillin</b>	Selektion gegen persistierende Agrobakterien	150 mg/l
<b>Cefotaxime</b>	Selektion gegen Agrobakterien	500 mg/l

**Medien der Kultur von *E. coli* und *A. tumefaciens***

Die nachfolgende Tabelle A.2.3 listet die in dieser Arbeit verwendeten Medien zur Kultur von *E. coli* und *A. tumefaciens* mit den Angaben zur Zusammensetzung auf.

**Tabelle A.2.3: Medien der Kultur von *E. coli* und *A. tumefaciens***

Medium	Zusammensetzung	pH-Wert
<b>LB-Medium</b>	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl (15 g/l Bacto Agar)	7,0
<b>SOB-Medium</b>	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mM KCl	7,0
<b>SOC-Medium</b>	SOB-Medium + 20 mM Glucose, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> (jeweils steril zugeben)	
<b>FB-Medium</b>	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 0,5 g/l tri-NaCitrat dihydrat, 6,3 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,09 g/l MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,9 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 55 g/l Glycerin	7,0
<b>YEP-Medium</b>	10 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl (10 g/l Bacto Agar)	7,5

**Tabelle A.2.4: Eingesetzte Antibiotika in der Kultur von *E. coli* und *A. tumefaciens***

Antibiotikum	Eingesetzte Konzentration
<b>Kanamycin</b>	50 µg/ml
<b>Spectinomycin</b>	50 µg/ml
<b>Rifampicin</b>	50 µg/ml
<b>Carbenicillin</b>	25 µg/ml

**Verwendete Medien für die Transformation von *R. hybrida* 'Pariser Charme'**

Für die transiente Infiltration von Petalen wurde der Infiltrationspuffer mit folgender Zusammensetzung verwendet: 2,13 g/l MES, 2,03 g/l MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, pH-Wert: 5,6. Für die stabile Transformation somatischer Embryonen wurden die Agrobakterien in Minimal A Medium (nach Temmerman et al. 2000) mit 100 µM Acetosyringon versetzt aufgenommen. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen des Minimal A Mediums ist der nachfolgenden Tabelle A.2.5 zu entnehmen. Diese wurden jeweils am Tag der Transformation frisch zusammengefügt (steril).

**Tabelle A.2.5: Zusammensetzung des Minimal A Mediums für die Transformation somatischer Embryonen von *R. hybrida***

200 ml Lösung A	5 ml Lösung B	1 ml Lösung C	0,5 ml Lösung D
52,5 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	400 g/l Glucose	100 g/l MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 g/l Thiamin
22,5 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			
5,0 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			
2,5 g/l tri-Sodiumcitrat Dihydrat			

## Verwendete Puffer der molekularbiologischen Methoden

Die für die molekularbiologischen Methoden verwendeten Puffer sind in der nachfolgenden Tabelle A.2.6 mit ihren Zusammensetzungen aufgeführt.

**Tabelle A.2.6: Puffer der molekularbiologischen Methoden**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Ladepuffer der PAA-Gelelektrophorese	49 mL Formamid (98 %), 0,5 mL EDTA (pH 8,0), 25 mg Pararosanilin (0,05 %)
Ladepuffer der Agarose-Gelelektrophorese	0,25 % (w/v) Orange G, 30,00 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, pH 8,0
1x TAE-Puffer	40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0
1x TBE-Puffer	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 3 mM EDTA (pH 8,0)
10x PBS Puffer	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,3 (einzustellen mit KOH)
10x Williams Puffer	100 mM Tris (pH 8,3), 500 mM KCl, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,01% Gelatine

### A.3. Primer und Tags

In den nachfolgenden Tabellen sind die in dieser Studie verwendeten Primer und Tags für PCR-, RT-PCR und q-RT-PCR-Analysen, als auch die für Sequenzierungen aufgeführt.

**Tabelle A.3.1: Sequenzen und Spezifika der verwendeten Primer**

Name	Sequenz	T <sub>A</sub>	Fragmentgröße	Anwendung
NPTII_fw NPTII_rev	GAGGCTATTCGGCTATGACTG ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	56°C	700 bp	Überprüfung auf <i>NPTII</i>
p9U10RNAi_Fw p9U10RNAi_Rev	GTCGACTGAGCTCGTTTTAGG CGCCGTTTTAGGAAAATGTG	61°C	variabel	Kolonie-PCR, p9U10-RNAi Insert-Sequenzierung
Spec305_F Spec305_R	AGGTAGTTGGCGTCATCG GTCATTGCGCTGCCATTC	56°C	~305 bp	Kolonie-PCR (Spectinomycin)
GAPDH_Fw GAPDH_Rev	TATGACCAGATCAAGGCTGCT ACCAATGAAGTCGGTTGACAC	60°C	cDNA ~100 bp gDNA ~200bp	Überprüfung auf Integrität der Nukleinsäure
Agro_Fw Agro_Rev	ATGCGGATGAGGCTCGTCTTCGAG GACGCAACGCATCCTCGATCAGCT	63°C	~600 bp	Überprüfung auf Kontamination/Persistenz von Agrobakterien
FokI_F FokI_R	TCGCAAGAAATTCAACTCAGG TTCCTCAAGTGTCAATGTACCA	56°C	~460 bp	Überprüfung der Expression der FokI Nuklease
Cas9_F Cas9_R	TTGAGGAAGCAGCGTACCTT AGCTGCTTCACGGTGACTTT	60°C	~500 bp	Überprüfung der Cas9D10A Nuklease
dsRed_F dsRed_R	GAAGCTGAAGGTGACCAAGG TGGTGTAGTCCTCGTTGTGG	60°C	~500 bp	Kolonie-PCR pRedU10-35s
AmpTALEN3/4-1_Fw* AmpTALEN3/4-1_Rev	GCAGTTGCTGTGGTCTGTTTT CAAAAACCAATTGATCAAGCA	57°C	~ 100 bp	Amplifikation der TALEN- Erkennungsstelle von TMlo3/4-1
AmpTALEN3/4-2_Fw* AmpTALEN3/4-2_Rev	AAGAGCTTATGCTGTTGGGATT GCCGAAACTGAAGACAGAA	57°C	~ 200 bp	Amplifikation rund um die TALEN- Erkennungsstelle von TMlo3/4-2
AmpCC1_F AmpCC1_R**	GGTGGTAGTGGGAATCAGGTT TGCCCAAAGAAATTCAAGG	58°C	435 bp	Amplifikation der CRISPR/Cas- Erkennungsstelle von CCML01

## Fortsetzung Tabelle A.3.1

AmpCC2_F	TGTTATTGGGGTTCCTCTCG	59°C	297 bp	Amplifikation der CRISPR/Cas-Erkennungsstelle von CCMLO2
AmpCC2_R**	CCGTAGCAACAAGCAGAACA			
AmpCC3/4_F	TCTGGCTGCCATTTATCTCC	59°C	270 bp	Amplifikation der CRISPR/Cas-Erkennungsstelle von CCMLO3/4
AmpCC3/4_R**	GGCGTCCAAACCAGAAGTAG			
M13-Tail_Fw	GTAAAACGACGGCCAGT	-	-	M13-Sequenz zum Anfügen an Primersequenzen
M13-Tail_Rev	CAGGAAACAGCTATGAC			
35S_PlusUp2_Fw	ACAAATACAAACGCGTCTGTAC	59°C	200 - 250 bp	Amplifikation der RNAi Kasette der RhMLO-RNAi Linien zur Überprüfung auf Expression
Test_Plus_MLO1_Rev	TCTTCTCGGTGATGTGTGGA			
Test_Plus_MLO2_Rev	TCTTCTCCTGACCCTGGTT			
Test_Plus_MLO34_Rev	TCACTGCGGTTGTTGACATT			

\* Primer mit IRD700 Markierung, \*\* Primer mir M13-Tail

Tabelle A.3.2: Primer der Fragmente für die Klonierung der RNAi Konstrukte

Name	Sequenz	T <sub>A</sub>	Fragmentgröße	Anwendung
InFusion_Mlo1_Fw	GTCTGTACATAAGCTTTCTACGCAACTGGCATCACA	55°C	283 bp	In-Fusion Cloning RhMLO1-RNAi
InFusion_Mlo1_Rev	CAAATACAAAGGATCCATGTTCCATGTTCCCTACTTC			
InFusion_Mlo2_Fw	GTCTGTACATAAGCTTGCATGTCCCCTGTTCATCTT	55°C	291 bp	In-Fusion Cloning RhMLO2-RNAi
InFusion_Mlo2_Rev	CAAATACAAAGGATCCCTGGTCGGCTAGCATTITTC			
InFusion_Mlo3-4_Fw	GTCTGTACATAAGCTTGCAGTGAAAAGTTGGCATCA	55°C	311 bp	In-Fusion Cloning RhMLO3/4-RNAi
InFusion_Mlo3-4_Rev	CAAATACAAAGGATCCGCTGGAGGCTCATGAATTTG			

Tabelle A.3.3: Sequenzen und Spezifika der verwendeten Primer für die q-RT-PCR Analysen

Name	Sequenz	T <sub>A</sub>	Fragmentgröße	Anwendung
MLO1a_qPCR_F*	TCACCAACACCAAGTCGAAG	60°C	~ 100 bp	Expressionsanalysen <i>RhMLO1</i>
MLO1a_qPCR_R*	TCGATTGCGAACCTCTAACG			
MLO2d_qPCR_F*	TCCAAATTCACACAAGGGATT	59°C	~ 100 bp	Expressionsanalysen <i>RhMLO2</i>
MLO2d_qPCR_R*	TCTCCATTGCAAAGCTTATT			
qPCR_MLO3a_F*	GTACATCAAGAAAGTGAAAG	64°C	~ 100 bp	Expressionsanalysen <i>RhMLO3</i>
qPCR_MLO3a_R*	GCCATGTTTCTGCAAATGCT			
MLO3/4b_qPCR_R*	TGAACATTGTATATCCTAACCA	59°C	~ 100 bp	Expressionsanalysen <i>RhMLO4</i>
MLO4b_qPCR_F*	GTAAATAAAGGTGAAAGAGTTGA			
UBC_F**	GCCAGAGATTGCCCATATGTA	59°C	~ 100 bp	Referenzen der Expressionsanalyse

Fortsetzung Tabelle A.3.3

UBC_R**	TCACAGAGTCCTAGCAGCACA			
SAND_F**	GTGTTGAGGAGTTGCCTCTTG			Referenzgen der Expressionsanalyse
SAND_R**	AACCTGTCGGGAGAATCTGTT	59°C	~ 100 bp	

\*Primer entwickelt und getestet von Schürmann 2015. \*\*Primer aus der Arbeit von Klie 2011.

**Tabelle A.3.4: Sequenzen und Spezifika der Primer für die Amplikonsequenzierungen**

Name	Sequenz	Fragmentgröße	Anwendung
T3/4-2_Mlo3/4_fw	ACCATTAATTTGTTTGTCTATG	216	TMlo3/4-2 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO3/4</i>
T3/4-2_Mlo3/4_rev	ATTTGCGCCGGAAACTGAAGAC		
t3/4-2_Mlo1_fw	TCAGGTACAGCACAACCCTTT	224	TMlo3/4-2 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO1</i>
t3/4-2_Mlo1_rev	CCACGATCTTATCCTCCTGCT		
t3/4-2_Mlo2_fw	CCAAGTGTTTGTATTTTGGTCTGA	210	TMlo3/4-2 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO2</i>
t3/4-2_Mlo2_rev	CTCTCCATCCTCCTCTGCAT		
CC1_RhMLO1_fw	TGACAACATCTTTGTTCTTCACC	237	CCMlo1 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO1</i>
CC1_RhMLO1_rev	TCAAGGAGTACTCGGTCAAAAA		
cc1_RhMLO2_fw	TCAAAAGATCTTGCATTATTTTCA	199	CCMlo1 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO2</i>
cc1_RhMLO2_rev	ACAGAGCAGCAGATTACGAAG		
cc1_RhMLO3/4_fw	GGCTCTTTGGTTAGATAATTGTGC	229	CCMlo1 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO3/4</i>
cc1_RhMLO3/4_rev	CCATCCTATTCAAAAGACAAAACA		
CC2_RhMLO2_fw	ACGGTCTATGCAGAGGAGGA	191	CCMlo2 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO2</i>
CC2_RhMLO2_rev	TCTAAATCCGTAGCAACAAGC		
cc2_RhMLO1_fw	AAACACGTGGCATCCGTGTA	300	CCMlo2 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO1</i>
cc2_RhMLO1_rev	AGGAATTATTTGCTTTTTGTTCAT		
cc2_RhMLO3/4_fw	ATGTATACCGAAGAGCGTTG	195	CCMlo2 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO3/4</i>
cc2_RhMLO3/4_rev	GGTATGAATGATGGAAACAGC		
CC3/4_RhMLO3/4_fw	GGCATGCTGCTTTTTACTATGG	208	CCMlo3/4 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO3/4</i>
CC3/4_RhMLO3/4_rev	GGCGTCCAAACCAGAAGTAG		
cc3/4_RhMLO1_fw	CTCTAATTGAGTTCACAAAATTGC	216	CCMlo3/4 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO1</i>
cc3/4_RhMLO1_rev	AGGGCGGTAAACCAGAAGA		
cc3/4_RhMLO2_fw	GCACCATCTAATTCATTTTCTTTG	215	CCMlo3/4 Erkennungsstelle auf <i>RhMLO2</i>
cc3/4_RhMLO2_rev	TGGGTTGTTGAACCAGAAGAG		

Alle Primer wurden für das Anfügen der Tags mit einem M13-Tail versehen (siehe Tabelle A.3.1).

**Tabelle A.3.5: Sequenzen der verwendeten Tags für die Amplikonssequenzierung**

Index	Tag
1	ACAACCAGTT
2	AACAACCTGCT
3	ACAGTTAGCT
4	AAGTCTTCGT
5	ACATGAGGTT
6	AAGCTCACTT
7	ACGATACGTT
8	AATGCGCTAT

Die Tags wurden für das Anfügen an die genspezifischen Primer mit einem M13-Tail versehen (siehe oben).

#### A.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien

In den nachfolgenden Tabellen sind die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien samt Herstellerangaben aufgelistet und eine Übersicht über die Hersteller der verwendeten Geräte und Utensilien/Chemikalien aufgeführt.

**Tabelle A.4.1: Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Hersteller
Autoklaven (A275Tischautoklav)	Zirbus
CCD-Kamera (zur Agarose-Geldokumentation)	IntasGDS
Elektrophoresekammern	Kisker Biotech
Elektroporator MicroPulser™	BioRad
Elektroporationsküvetten (0,1 cm, 0,2 cm)	PeqLab
Feinwaage: Mettler AE 260Delta Range	Mettler Toledo
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG
LED-Handlampe: FastGene® Blue/Green LED Flashlight	Nippon Genetics Europe
Kunststoffverbrauchsmaterial (Reaktionsgefäße, Schraubdeckelbecher, Zentrifugationsröhrchen, MT-Platten)	Sarstedt
Omnifix®-F Spritzen	B. Braun
Magnetrührer	Ikamag
Mikroskop: Axio Scope A (inkl. Filterset 38 [493nm/520nm])	Zeiss
Multipipetten	Mettler Toledo
NanoDrop 2000c Spektrometer	PeqLab
Petrischalen, Kulturbecher	nerbe plus
pH-Meter: pH 211	Hanna Instruments
Photometer: Safas monaco	Deelux
Pipetten	Mettler Toledo
Pipettenspitzen	Mettler Toledo
qPCR-Cycler: StepOnePlus™	Applied Biosystems
qPCR MT-Platten	Nippon Genetics Europe
qPCR Klebefolie	Sarstedt
Sequencer 4200 oder 4300	Licor
Sterilbank	Heraeus
Schwingmühle TissueLyser II	Qiagen
Thermocycler:TGradient	Biometra
Thermocycler: Primus 96 advanced	PeqLab

*Fortsetzung Tabelle A.4.1*

Tischzentrifuge: Centrifuge 5415D	Eppendorf
Tischzentrifuge: Mikro 200	Hettich
Ultraschallbad: Bandelin Sonorex RK	Bandelin electronic GmbH
UV-Tisch: Gel Jet Imager Version 2004	Intas
Vortexer: 444-1372	VWR International
Waage: Universal	Sartorius

**Tabelle A.4.2: Liste der Hersteller von Geräten und Verbrauchsmaterialien**

<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>
Ambion (Life Technologies)	Carlsbad, USA
Applied Biosystems	Forster City, USA
Avegene (DCS)	Hamburg, Deutschland
Bandelin electronic GmbH	Berlin, Deutschland
B. Braun	Melsungen, Deutschland
Bioline	Luckenwalde, Deutschland
Biometra	Göttingen, Deutschland
BioRad	München, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Deelux	Gödenstorf, Deutschland
Duchefa	Amsterdam, Niederlande
DNA Cloning Service	Hamburg, Deutschland
Eurofins	Luxemburg, Luxemburg
Eurogentec	Seraing, Belgien
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
GATC	Köln, Deutschland
Hanna Instruments	Kehl am Rhein, Deutschland
Heraeus	Extertal, Deutschland
Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Ikamag	Staufen, Deutschland
Intas	Göttingen, Deutschland
Invitrogen	Carlsbad, USA
Kisker Biotech	Steinfurt, Deutschland
LGC Genomics	Berlin, Deutschland
Li-Cor	Lincoln, USA
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Mettler Toledo	Gießen, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Mycrosynth	Balgach, Schweiz
nerbe plus	Winsen, Deutschland
New England Biolabs Inc.	Ipswich, USA
Nippon Genetics Europe GmbH	Düren, Deutschland
PeqLab	Erlangen, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Retsch	Haan, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Rovalab	Teltow, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius	Aubagne Cedex, Frankreich

---

 Fortsetzung Tabelle A.4.2
 

---

Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
TAKARA Bio Inc. (USA)	Kusatsu, Japan (Mountain View, USA)
ThermoFisher Scientific	Waltham, USA
VWR International	Darmstadt, Deutschland
Zeiss	Jena, Deutschland
Zirbus	Bad Grund, Deutschland

---

## A.5. Programme und Online Tools

Die nachfolgenden Tabellen listen die verwendeten Programme (installiert, freeware und lizenziert) und Online Tools auf.

**Tabelle A.5.1: Verwendete Programme**

Software	Version	Hersteller/Referenz
BioEdit	7.2.5	Hall (1999)
CLC Genomics Workbench	9.5.2	Qiagen, Hilden, Deutschland
ClustalX Programms	2.0.11	Thompson et al. (1994)
GeneDoc	2.7	Nicholas und Nicholas (1997)
INTAS GDS-System	-	Intas, Göttingen, Deutschland
LinRegPCR Software	2016.1	Ramakers et al. (2003), Ruijter et al. (2009)
R Studio	3.2.4	R Core Team 2016
SnapGene Viewer	4.0.5	GSL Biotech LLC (snapgene.com)
StepOnePlus™ Software	2.3	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

---

**Tabelle A.5.2: Verwendete Online Tools**

Tool	Web-Adresse
Primer3web	<a href="http://primer3.ut.ee/">http://primer3.ut.ee/</a> (Zugriff: 14.09.2017)
Online gRNA Designers von DNA2.0	<a href="http://www.dna20.com">www.dna20.com</a> , jetzt Atum <a href="http://www.atum.bio">www.atum.bio</a> (Zugriff: 14.09.2017)

---

## A.6. Bioinformatik q-RT-PCR Analysen

### A.6.1. Statistische Analysen der *RhMLO*-Expression der transienten Infiltrationen

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Vorversuche zur Unterdrückung der Expression von *RhMLO3* mit dem *RhMLO3/4*-RNAi Konstrukt aufgeführt. Diese ergaben eine Reduktion der Expression von *RhMLO3*, die jedoch nicht als statistisch signifikant bestätigt werden konnte.

**Tabelle A.6.1.1: Gesamteffekte der Expression von *RhMLO3* der transienten Infiltrations-Versuche.**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
wdh	1	0,03833	0,03833	0,0787	0,7973
Sample.Name	3	2,88683	0,96228	1,9747	0,2952
Residuals	3	1,46189	0,48730		

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

Sample.Name: Beschreibt den Einfluss aller analysierten Proben auf die Expression.

**Tabelle A.6.1.2: Ergebnisse der statistischen Analysen zur Expression von *RhMLO3* der transienten Infiltrations-Versuche im Vergleich zur Kontrolle.**

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MLO1-RNAi - GUS-RNAi	-0,03817722	0,6980654	3	-0,055	0,9989
MLO2-RNAi - GUS-RNAi	-0,58091994	0,6980654	3	-0,832	0,7574
MLO3/4-RNAi - GUS-RNAi	-1,48816054	0,6980654	3	-2,132	0,2619

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

In der Spalte der estimate und p-value kann eine Reduktion der Expression von *RhMLO3* festgestellt werden, die jedoch nicht statistisch signifikant ist (Tabelle A.6.1.2). Wie schon in den Analysen von *RhMLO4* können keine off-target Effekte des *RhMLO3/4-RNAi* Konstrukts auf *RhMLO1* und *RhMLO2* festgestellt werden. Die Wiederholung (Tabelle A.6.1.1) zeigt auf, dass die Wiederholung (wdh) keinen Einfluss auf den Effekt hatte.

Die tabellarischen Ergebnisse der statistischen Auswertung der Expression von *RhMLO1*, *RhMLO2* und *RhMLO4* können den nachfolgenden Tabellen entnommen werden. Diese wurden schon in dem entsprechenden Kapitel erläutert, weshalb hier nicht weiter darauf eingegangen wird.

**Tabelle A.6.1.3: Gesamteffekte der Expression von *RhMLO1* der transienten Infiltrations-Versuche.**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
wdh	1	0,52438	0,52438	5,4025	0,04027*
Sample.Name	3	2,83598	0,94533	9,7394	0,00198**
Residuals	11	1,06768	0,09706		

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

Sample.Name: Beschreibt den Einfluss aller analysierten Proben auf die Expression.

**Tabelle A.6.1.4: Ergebnisse der statistischen Analysen zur Expression von *RhMLO1* der transienten Infiltrations-Versuche im Vergleich zur Kontrolle.**

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MLO1-RNAi - GUS-RNAi	-0,8039788	0,2202975	11	-3,650	0,0104*
MLO2-RNAi - GUS-RNAi	0,2401785	0,2202975	11	1,090	0,5780
MLO3/4-RNAi - GUS-RNAi	0,1965757	0,2202975	11	0,892	0,6955

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

**Tabelle A.6.1.5: Gesamteffekte der Expression von *RhMLO2* der transienten Infiltrations-Versuche.**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
wdh	1	1,60329	0,53443	4,6261	0,03197*
Sample.Name	3	0,46124	0,15375	1,3308	0,32411
Residuals	9	1,03973	0,11553		

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

Sample.Name: Beschreibt den Einfluss aller analysierten Proben auf die Expression.

**Tabelle A.6.1.6: Ergebnisse der statistischen Analysen zur Expression von *RhMLO2* der transienten Infiltrations-Versuche im Vergleich zur Kontrolle.**

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MLO1-RNAi - GUS-RNAi	-0,0070149481	0,2403391	9	-0,029	0,9997
MLO2-RNAi - GUS-RNAi	-0,3945127461	0,2403391	9	-1,641	0,3034
MLO3/4-RNAi - GUS-RNAi	-0,0003659028	0,2403391	9	-0,002	1,0000

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

**Tabelle A.6.1.7: Gesamteffekte der Expression von *RhMLO4* der transienten Infiltrations-Versuche.**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
wdh	3	0,37816	0,12605	1,4001	0,305010
Sample.Name	3	2,55124	0,85041	9,4457	0,003841**
Residuals	9	0,81028	0,09003		

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

Sample.Name: Beschreibt den Einfluss aller analysierten Proben auf die Expression.

**Tabelle A.6.1.8: Ergebnisse der statistischen Analysen zur Expression von *RhMLO4* der transienten Infiltrations-Versuche im Vergleich zur Kontrolle.**

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MLO1-RNAi - GUS-RNAi	0,01140388	0,2121691	9	0,054	0,9989
MLO2-RNAi - GUS-RNAi	0,21351624	0,2121691	9	1,006	0,6320
MLO3/4-RNAi - GUS-RNAi	-0,82610221	0,2121691	9	-3,894	0,0098**

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

Im Folgenden ist exemplarisch der Code der statistischen Analysen der Expression von *RhMLO1* in der transienten Transformation aufgeführt. Die Ergebnisse sind bereits im dazugehörigen Kapitel aufgeführt und auf die Zwischenergebnisse der Analysen wurde aus Platzgründen verzichtet.

```
> getwd()
> setwd("NA")
> dat1 <- read.csv2("NA\\qPCR_Results_Inf-Inok_1.csv")
> dat2 <- read.csv2("NA\\qPCR_Results_Inf-Inok_2.csv")
> dat3 <- read.csv2("NA\\qPCR_Results_Inf-Inok_3.csv")
> dat4 <- read.csv2("E NA\\qPCR_Results_Inf-Inok_4.csv")
> head(dat1)
> str(dat1)
```

```

> d1 <- na.omit(subset(dat1, select=c("Sample.Name", "Target.Name", "RQ")))
> d2 <- na.omit(subset(dat2, select=c("Sample.Name", "Target.Name", "RQ")))
> d3 <- na.omit(subset(dat3, select=c("Sample.Name", "Target.Name", "RQ")))
> d4 <- na.omit(subset(dat4, select=c("Sample.Name", "Target.Name", "RQ")))
> d1$wdh <- 1
> d2$wdh <- 2
> d3$wdh <- 3
> d4$wdh <- 4
> datn <- rbind(d1, d2, d3, d4)
> str(datn)
> head(datn)
> datn
> install.packages("ggplot2")
> library(ggplot2)
> ggplot(datn, aes(x=Sample.Name, y=RQ))+
+   geom_point(aes(color=Sample.Name), position=position_jitter(width=0.2, height=0))+
+   facet_grid(Target.Name~wdh)+
+   theme(axis.text.x = element_text(angle=90, vjust=0.5))
> ggsave("geike_übersicht_target2.png", width=20, height=18, units="cm", dpi=800)
> install.packages("plyr")
> library("plyr", lib.loc="~/R/win-library/3.2")
> mw <- droplevels(ddply(datn, .(Sample.Name, wdh, Target.Name), summarize, Mean=mean(RQ,
na.rm = TRUE)))
> mw
> str(mw)
> ggplot(mw, aes(x=Sample.Name, y=Mean))+
+   geom_hline(yintercept=1, color="grey", linetype="dotted")+
+   geom_point(aes(shape=Sample.Name))+
+   facet_grid(Target.Name~wdh)+
+   theme_bw()+
+   theme(axis.text.x = element_text(angle=90, vjust=0.5))+
+   ylab("RG-value")+
+   xlab("Sample name")
> ggsave("NA.png", width=20, height=18, units="cm", dpi=800)
> mw$Sample.Name <- relevel(mw$Sample.Name, ref="GUS-RNAi")
> levels(mw$Sample.Name)
> head(mw)
> mlo1 <- droplevels(subset(mw, Target.Name=="MLO1"))
> str(mlo1)
> levels(mlo1$Sample.Name)
> fitMlo1 <- lm(log(Mean) ~ wdh + Sample.Name, mlo1)
> anova(fitMlo1)
> library(lsmeans)
> comp <- lsmeans(fitMlo1, specs="Sample.Name", contr="trt.vs.ctrl")
> comp
> comp$lsmeans
> comp$contrasts
> plot(confint(comp$lsmeans) ,
+   ylab="Transient Transformation",
+   xlab="Confidence interval [log RQ]")
> png(filename="Konfidenzintervalle_NA.png", width=850, height=850, units="px")

> mlo1Rnai <- droplevels(subset(mw, Sample.Name=="MLO1-RNAi"))
> mlo1Rnai
> mlo1Rnai$Target.Name <- relevel(mlo1Rnai$Target.Name, ref="MLO1")

```

```

> levels(mlo1Rnai$Target.Name)
> ggplot(mlo1Rnai, aes(x=Target.Name, y=Mean))+
+   geom_boxplot()+
+   geom_point(aes(shape=wdh))+
+   theme_bw()+
+   ylab("RQ-value")+
+   xlab("Target Gene")+
+   labs(title="Effekt von MLO1-RNAi auf die MLO-Gene")
> ggsave("NA.png", width=20, height=18, units="cm", dpi=800)
> fitMlo1Rnai <- lm(log(Mean) ~ wdh + Target.Name, mlo1Rnai)
> summary(fitMlo1Rnai)
> anova(fitMlo1Rnai)
> compMlo1Rnai <- lsmeans(fitMlo1Rnai, specs="Target.Name", contr="trt.vs.ctrl")
> compMlo1Rnai
> plot(confint(compMlo1Rnai$lsmeans),
+   ylab="Target Gene",
+   xlab="Confidence interval [log RQ]")
> png(filename="Konfidenzintervalle_compMlo1Rnai_dt.png", width=850, height=850, units="px")
> mlo1tar <- droplevels(subset(mw, Target.Name == "MLO1" & Sample.Name != "GUS-RNAi"))
> mlo1tar
> mlo1tar$Sample.Name <- relevel(mlo1tar$Sample.Name, ref="MLO1-RNAi")
> levels(mlo1tar$Sample.Name)
> ggplot(mlo1tar, aes(x=Sample.Name, y=Mean))+
+   geom_boxplot()+
+   geom_point(aes(shape=wdh))+
+   theme_bw()+
+   ylab("RQ-value")+
+   xlab("Target Gene")+
+   labs(title="Transkription des MLO1 Gens innerhalb der RNAi Behandlungen")
> fitmlo1tar <- lm(log(Mean) ~ wdh + Sample.Name, mlo1tar)
> summary(fitmlo1tar)
> anova(fitmlo1tar)
> compmlo1tar <- lsmeans(fitmlo1tar, specs="Sample.Name", contr="trt.vs.ctrl")
> compmlo1tar
> plot(confint(compmlo1tar$lsmeans),
+   ylab="",
+   xlab="Expression of MLO1 [log RQ]")

```

### A.6.2. Statistischen Analysen der Expression der *RhMLOs* der *RhMLO-RNAi* Linien

Nachfolgend sind tabellarisch die Ergebnisse der statistischen Analysen der Expression der *RhMLO* Gene in den *RhMLO-RNAi* Linien aufgeführt. Da die Ergebnisse anhand von Grafiken in dem entsprechenden Kapitel erläutert werden, wird hier darauf verzichtet.

**Tabelle A.6.2.1: Gesamteffekte der Expression von *RhMLO1* der stabil transgenen RhMLO1-RNAi Linien über die Wiederholungen.**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
wdh	9	1,6598	0,18442	0,8254	0,59865
Sample.Name	3	2,1648	0,72160	3,2295	0,03798 *
Residuals	27	6,0328	0,22344		

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Sample.Name: Beschreibt den Einfluss aller analysierten Proben auf die Expression.

**Tabelle A.6.2.2: Ergebnisse der statistischen Analysen der Expression von *RhMLO1* der stabil transgenen RhMLO1-RNAi Linien im Vergleich zur Kontrolle.**

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
1C1 - PC K	0,11250490	0,3342431	27	0,337	0,9963
1C3 - PC K	-0,22462291	0,3342431	27	-0,672	0,9573
1C4 - PC K	-0,24463434	0,3342431	27	-0,732	0,9433
1C5 - PC K	-0,29313394	0,3342431	27	-0,877	0,8988
1C6 - PC K	-0,09654660	0,3342431	27	-0,289	0,9979
1C7 - PC K	-0,03889837	0,3342431	27	-0,116	0,9999
1C8 - PC K	-0,38869599	0,3342431	27	-1,163	0,7690
1C9 - PC K	0,12859486	0,3342431	27	0,385	0,9940
PC GUS - PC K	0,29078767	0,3342431	27	0,870	0,9013

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

**Tabelle A.6.2.3: Gesamteffekte der Expression von *RhMLO2* der stabil transgenen RhMLO2-RNAi Linien über die Wiederholungen.**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
wdh	9	18,549	2,0610	2,0450	0,074603 .
Sample.Name	3	21,221	7,0735	7,0184	0,001306 **
Residuals	26	26,204	1,0079		

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Sample.Name: Beschreibt den Einfluss aller analysierten Proben auf die Expression.

**Tabelle A.6.2.4: Ergebnisse der statistischen Analysen der Expression von *RhMLO2* der stabil transgenen RhMLO2-RNAi Linien im Vergleich zur Kontrolle.**

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
2C1 - PC K	2,0691081	0,7098770	26	2,915	0,0492 *
2C12 - PC K	0,8556841	0,7098770	26	1,205	0,7459
2C4 - PC K	1,7624331	0,7098770	26	2,483	0,1219
2C5 - PC K	1,2922241	0,7098770	26	1,820	0,3811
2C9 - PC K	1,4682524	0,7098770	26	2,068	0,2598
2E1 - PC K	1,9693021	0,7098770	26	2,774	0,0668 .
2E2 - PC K	1,1907675	0,7098770	26	1,677	0,4623
2C3 - PC K	0,8129101	0,7728162	26	1,052	0,8254
PC GUS - PC K	2,2796674	0,7098770	26	3,211	0,0250 *

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

**Tabelle A.6.2.5: Gesamteffekte der Expression von *RhMLO3* der stabil transgenen RhMLO3/4-RNAi Linien über die Wiederholungen.**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
wdh	9	1,2479	0,13866	0,8011	0,6188364
Sample.Name	3	4,7347	1,57822	9,1176	0,0002706 ***
Residuals	26	4,5005	0,17310		

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

Sample.Name: Beschreibt den Einfluss aller analysierten Proben auf die Expression.

**Tabelle A.6.2.6: Ergebnisse der statistischen Analysen der Expression von *RhMLO3* der stabil transgenen RhMLO3/4-RNAi Linien im Vergleich zur Kontrolle.**

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
3/4C1 - PC K	-0,02281838	0,2941911	26	-0,078	1,0000
3/4C2 - PC K	-0,49177937	0,2941911	26	-1,672	0,4658
3/4C5 - PC K	-0,19269799	0,2941911	26	-0,655	0,9608
3/4C6 - PC K	-0,22025566	0,3202747	26	-0,688	0,9538
3/4C7 - PC K	0,09192990	0,2941911	26	0,312	0,9972
3/4C9 - PC K	-0,15104347	0,2941911	26	-0,513	0,9831
3/4E1 - PC K	-0,37700345	0,2941911	26	-1,281	0,7024
3/4E2 - PC K	-0,38061236	0,2941911	26	-1,294	0,6953
PC GUS - PC K	-0,25995452	0,2941911	26	-0,884	0,8963

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

**Tabelle A.6.2.7: Gesamteffekte der Expression von *RhMLO4* der stabil transgenen RhMLO3/4-RNAi Linien über die Wiederholungen.**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
wdh	9	2,1045	0,23384	0,5846	0,7975
Sample.Name	3	2,5475	0,84918	2,1231	0,1216
Residuals	26	10,3995	0,39998		

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

Sample.Name: Beschreibt den Einfluss aller analysierten Proben auf die Expression.

**Tabelle A.6.2.8: Ergebnisse der statistischen Analysen der Expression von *RhMLO4* der stabil transgenen RhMLO3/4-RNAi Linien im Vergleich zur Kontrolle.**

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
3/4C1 - PC K	0,28924379	0,4472024	26	0,647	0,9624
3/4C2 - PC K	0,18634698	0,4472024	26	0,417	0,9920
3/4C5 - PC K	0,05263002	0,4472024	26	0,118	0,9999
3/4C6 - PC K	0,25533808	0,4472024	26	0,524	0,9818
3/4C7 - PC K	0,10367902	0,4472024	26	0,232	0,9991
3/4C9 - PC K	-0,32949590	0,4472024	26	-0,737	0,9420
3/4E1 - PC K	0,47985425	0,4472024	26	1,073	0,8152
3/4E2 - PC K	0,22964540	0,4472024	26	0,514	0,9831
PC GUS - PC K	0,44946692	0,4472024	26	1,005	0,8470

Signifikanzkodierung: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

Im Folgenden ist exemplarisch der Code der statistischen Analysen der Expression von *RhMLO1* in den stabil transgenen RhMLO1-RNAi Linien aufgeführt. Auf die Aufführung der Zwischenergebnisse der Analysen wurde aus Platzgründen verzichtet.

```

> getwd()
> setwd("NA")
> dat1 <- read.csv2("NA\\qPCR_Results_MLO1_1.csv")
> dat2 <- read.csv2("NA\\qPCR_Results_MLO1_2.csv")
> dat3 <- read.csv2("NA\\qPCR_Results_MLO1_3.csv")
> dat4 <- read.csv2("NA\\qPCR_Results_MLO1_4.csv")
> head(dat1)
> str(dat1)
> str(dat2)
> str(dat3)
> str(dat4)
> d1 <- na.omit(subset(dat1, select=c("Sample.Name", "RQ")))
> d2 <- na.omit(subset(dat2, select=c("Sample.Name", "RQ")))
> d3 <- na.omit(subset(dat3, select=c("Sample.Name", "RQ")))
> d4 <- na.omit(subset(dat4, select=c("Sample.Name", "RQ")))
> d1$wdh <- 1
> d2$wdh <- 2
> d3$wdh <- 3
> d4$wdh <- 4
> datn <- rbind(d1, d2, d3, d4)
> datn
> datn$wdh <- as.factor(datn$wdh)
> str(datn)
> install.packages("ggplot2")
> library(ggplot2)
> ggplot(datn, aes(x=Sample.Name, y=RQ))+
+ geom_point(aes(color=Sample.Name), position=position_jitter(width=0.5, height=0))+
+ facet_grid(~wdh)+
+ theme(axis.text.x = element_text(angle=90, vjust=0.5))
> ggsave("NA.png", width=20, height=18, units="cm", dpi=800)
> library("plyr", lib.loc="~/R/win-library/3.2")
> mw <- droplevels(ddply(datn, .(Sample.Name, wdh), summarize, Mean=mean(RQ, na.rm =
TRUE)))
> mw
> str(mw)
> lev <- levels(mw$Sample.Name)
> lev
> mw$Sample.Name <- factor(mw$Sample.Name, levels=lev[c(length(lev), 1:(length(lev)-1))])
> levels(mw$Sample.Name)
> ggplot(mw, aes(x=Sample.Name, y=Mean))+
+ geom_boxplot()+
+ geom_point(aes(color=wdh), position=position_jitter(width=0.1, height=0))+
+ theme_bw()+
+ theme(axis.text.x = element_text(angle=90, vjust=0.5))+
+ ylab("RQ value")+
+ xlab("Gene of interest")+
+ scale_color_discrete(name="Repetition")
> fitl <- lm(log(Mean) ~ Sample.Name + wdh, mw)
> plot(fitl, which=2) # Residuen sind nicht perfekt log-normalverteilt, aber besser besser als ohne log
> anova(fitl)

```

```

> library(lsmmeans)
> comp <- lsmmeans(fitl, specs="Sample.Name", contr="trt.vs.ctrl")
> comp
> png(filename="Konfidenzintervalle_log_rq.png", width=850, height=850, units="px")
> plot(confint(comp$lsmmeans) ,
+   ylab="Gene of interest",
+   xlab="Confidence interval [log scale]")
> dfcomp <- as.data.frame(print(comp$contrasts))
> dfcomp

```

## A.7. Bioinformatik quantitative Mehltauinokulationen

### A.7.1. Statistische Analysen der transienten Infiltrations/Inokulations-Versuche

Nachfolgend ist der R Code der statistischen Analysen der transienten Infiltrations/Inokulations-Versuche mit den Echten Mehltau aufgeführt.

```

>library(ggplot2)
>library(lsmmeans)
>setwd("NA")
>datiie <-read.table("Infiltration_Inokulation_Experimente.txt", header=TRUE, sep="\t")
>str(datiie)
>levels(datiie$Konstrukt)
>table(datiie$Konstrukt)
>table(datiie[,c( "Infiltration.Inokulation","Konstrukt")])
>datiie$InfInok<-factor(datiie$Infiltration.Inokulation)
>datiie$transformed <-factor("yes", levels=c("no", "yes"))
>datiie$transformed[datiie$Konstrukt %in%c("GUS-RNAi")] <- "no"
>table(datiie[,c( "transformed","Konstrukt")])
>ggplot(datiie, aes(y= Anzahl.MZ/Anzahl.gK, x=Konstrukt)) +
+geom_boxplot(outlier.shape=NA) +
+geom_point(aes(color=transformed)) +facet_wrap(~InfInok) +
+theme(axis.text.x =element_text(angle =90, vjust =0.5))
>ggplot(datiie, aes(y= Anzahl.MZ/Anzahl.gK, x=Konstrukt)) +
+geom_boxplot(outlier.shape=NA) +
+geom_point(aes(color=InfInok), position=position_jitter(width=0.3, +height=0)) +
+theme(axis.text.x =element_text(angle =90, vjust =0.5))
>datiie$Anzahl.noMZ <-datiie$Anzahl.gK -datiie$Anzahl.MZ
>fitiie <-glm(cbind(Anzahl.MZ, Anzahl.noMZ) ~InfInok*Konstrukt, >data=datiie,
family=quasibinomial())
>anova(fitiie, test="F")
>fitiieex <-glm(cbind(Anzahl.MZ, Anzahl.noMZ) +~InfInok*(transformed/Konstrukt), data=datiie,
family=quasibinomial())
>anova(fitiieex, test="F")
>lsmmeans(fitiie, specs="Konstrukt", contr="trt.vs.ctrl")

```

### A.7.2. Statistische Analysen der Inokulations-Versuche mit den RhMLO-RNAi Linien

Nachfolgend ist der R Code der statistischen Analysen der Inokulations-Versuche mit dem Echten Mehltau und den RhMLO-RNAi Linien aufgeführt.

```

>library(ggplot2)
>library(lsmmeans)
>setwd("NA")
>datif1 <-read.table("NA.txt", header=TRUE)
>str(datif1)
>levels(datif1$Linie)
>table(datif1$Linie)
>table(datif1[,c("Inokulation","Linie")])
>datif1$Genotyp <-relevel(datif1$Linie, ref="PCK")
>lG<-levels(datif1$Linie)
>datif1$transformed <-factor("yes", levels=c("no", "yes"))
>datif1$transformed[datif1$Linie %in%c("PCK", "GUS", "PCGUS")] <- "no"
>table(datif1[,c("transformed", "Linie")])
>ggplot(datif1, aes(y=Myzelbildung, x=Linie)) +geom_boxplot(outlier.shape=NA) +
+geom_point(aes(color=transformed)) +facet_wrap(~Inokulation)
+scale_y_log10(breaks=c(1,2,5,10,20,50, 100, 200)) +
+theme(axis.text.x =element_text(angle =90, vjust =0.5))
>ggplot(datif1, aes(y=Myzelbildung, x=Linie)) +
+geom_boxplot(outlier.shape=NA) +
+geom_point(aes(color=Inokulation), position=position_jitter(width=0.3, height=0)) +
+scale_y_log10(breaks=c(1,2,5,10,20,50, 100, 200))+
+theme(axis.text.x =element_text(angle =90, vjust =0.5))
fitf1 <-glm(Myzelbildung ~Inokulation*Linie, data=datif1, family=quasipoisson())
anova(fitf1, test="F")
fitf1tx <-glm(Myzelbildung ~Inokulation*(transformed/Linie), data=datif1, family=quasipoisson())
anova(fitf1tx, test="F")

```

### Analysen der Versuche A, B und C

```

>datif1ABC <-droplevels(subset(datif1, Inokulation %in%c("A","B","C")))
>ggplot(datif1ABC, aes(y=Myzelbildung, x=Linie)) +
+geom_boxplot(outlier.shape=NA) +
+geom_point(aes(color=Inokulation), position=position_jitter(width=0.3, height=0)) +
+scale_y_log10(breaks=c(1,2,5,10,20,50, 100, 200))
>fitf1ABC <-glm(Myzelbildung ~Inokulation*Linie, data=datif1ABC, family=quasipoisson())
>anova(fitf1ABC, test="F")
>lsmmeans(fitf1ABC, specs="Linie", contr="trt.vs.ctrl")
>lsmmeans(fitf1ABC, specs="Linie",by="Inokulation", contr="trt.vs.ctrl")

```

### Analysen der Versuche D, E und F

```

>datif1DEF <-droplevels(subset(datif1, Inokulation %in%c("D","E","F")))
>ggplot(datif1DEF, aes(y=Myzelbildung, x=Linie)) +
+geom_boxplot(outlier.shape=NA) +
+geom_point(aes(color=Inokulation), position=position_jitter(width=0.3, height=0)) +
+scale_y_log10(breaks=c(1,2,5,10,20,50, 100, 200))
>fitf1DEF <-glm(Myzelbildung ~Inokulation*Linie, data=datif1DEF, family=quasipoisson())
>anova(fitf1DEF, test="F")
>lsmmeans(fitf1DEF, specs="Linie", contr="trt.vs.ctrl")
>lsmmeans(fitf1DEF, specs="Linie",by="Inokulation", contr="trt.vs.ctrl")

```

## A.8. Zusätzliche Ergebnisse der stabilen Transformation der TALENKonstrukte

**Tabelle A.8.1.: Übersicht über die detektierten Mutationen der Probe T3/4C 1.**

Position	Typ	Länge [bp]	Referenz	Frequenz
75 - 85	Deletion	11	AGTTCTACAAG	1,07
78 - 86	Deletion	9	TCTACAAGA	1,85
80 - 86	Deletion	7	TACAAGA	1,71
81 - 83	Deletion	3	ACA	3,18
81 - 84	Deletion	4	ACAA	2,77
81 - 85	Deletion	5	ACAAG	10,65
81 - 86	Deletion	6	ACAAGA	2,59
82 - 85	Deletion	4	CAAG	4,67
82 - 87	Deletion	6	CAAGAT	1,41
83 - 85	Deletion	3	AAG	8,72
83 - 86	Deletion	4	AAGA	1,32
84 - 85	Deletion	2	AG	1,66

**Tabelle A.8.2.: Übersicht über die detektierten Mutationen der Probe T3/4C 1.2.1.2.**

Position	Typ	Länge [bp]	Referenz	Frequenz
77-86	Deletion	10	TTCTACAAGA	1,24
78-86	Deletion	9	TCTACAAGA	2,58
80-86	Deletion	7	TACAAGA	2,59
81-83	Deletion	3	ACA	5,05
81-84	Deletion	4	ACAA	4,32
81-85	Deletion	5	ACAAG	17,54
81-86	Deletion	6	ACAAGA	2,76
82-85	Deletion	4	CAAG	4,67
82-87	Deletion	6	CAAGAT	1,41
83-85	Deletion	3	AAG	6,62
83-86	Deletion	4	AAGA	2,39
84-85	Deletion	2	AG	1,28

**Tabelle A.8.3.:Übersicht über die Mutationsraten der untersuchten Pools der TALEN-Proben.**

Probe	Amplifiziertes <i>RhMLO</i>	Anzahl Reads	Mutationsrate
T3/4A 1	<i>RhMLO1</i>	12670	0 %
	<i>RhMLO2</i>	11090	0 %
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	15289	51,7 %
T3/4A 1.1.2.2.1.1	<i>RhMLO1</i>	22426	0 %
	<i>RhMLO2</i>	21037	0 %
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	26716	46,2 %
T3/4C 1	<i>RhMLO1</i>	18451	0 %
	<i>RhMLO2</i>	13937	0 %
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	9966	41,6 %
T3/4C 1.2.1.2	<i>RhMLO1</i>	18353	0 %
	<i>RhMLO2</i>	13685	0 %
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	12739	52,4 %
T3/4D 1	<i>RhMLO1</i>	15103	0 %
	<i>RhMLO2</i>	9563	0 %
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	27383	62,0 %
T3/4D 1.1.2.1.3	<i>RhMLO1</i>	15245	0 %
	<i>RhMLO2</i>	13346	0 %
	<i>RhMLO3/RhMLO4</i>	23850	89,4 %

#### A.9. Zusätzliche Ergebnisse der stabilen Transformation der CRISPR/Cas Konstrukte

**Tabelle A.9.1: Detektierte Varianten des Sub-Pools kürzerer Sequenzen der Probe CC2C 2.**

Position	Typ	Länge [bp]	Referenz	Frequenz (Sub-Pool)	Frequenz (gesamt)
99-108	Deletion	10	GAGAGTGCCC	4,68	1,45
99-119	Deletion	21	GAGAGTGCCCGACGTGTTTTG	3,21	0,99
100-108	Deletion	9	AGAGTGCCC	1,26	0,39
100-110	Deletion	11	AGAGTGCCCGA	4,56	1,41
100-125	Deletion	26	AGAGTGCCCGACGTGT TTTGGCCGCA	4,24	1,31
101-108	Deletion	8	GAGTGCCC	1,47	0,46
101-113	Deletion	13	GAGTGCCCGACGT	1,2	0,37
105-119	Deletion	15	GCCCGACGTGTTTTG	1,75	0,54
109-125	Deletion	17	GACGTGTTTTGGCCGCA	1,22	0,38
109-129	Deletion	21	GACGTGTTTTGGCCGACGCCG	1,59	0,49
112-116	Deletion	5	GTGTT	1,12	0,35
122-139	Deletion	18	CGCAGCCGGATATGACAA	1,12	0,35

**Tabelle A.9.2: Detektierte Varianten des Sub-Pools längerer Sequenzen der Probe CC2C 2.**

Position	Typ	Länge [bp]	Insertions-Sequenz	Frequenz (Sub-Pool)	Frequenz (gesamt)
103^104	Insertion	14	TGCCCCGACGTGTTT	1,4	0,15
104^105	Insertion	18	GCCCCGACGTGTTTTGGCC	2,92	0,32
105^106	Insertion	16	CCCGACGTGTTTTGGC	4,21	0,46
106^107	Insertion	14	CCGACGTGTTTTGG	4,55	0,50
107^108	Insertion	13	CGACGTGTTTTGG	1,52	0,17
108^109	Insertion	11	GACGTGTTTTG	7,02	0,77
109^110	Insertion	6	ACGTGT	1,4	0,15
110^111	Insertion	11	CGTGTTTTTGGC	3,14	0,35
110^111	Insertion	13	CGTGTTTTTGGCCG	2,08	0,23
110^111	Insertion	16	CGTGTTTTTGGCCGCAG	1,01	0,11
110^111	Insertion	17	CGTGTTTTTGGCCGCAGC	2,41	0,27
111^112	Insertion	14	GTGTTTTGGCCGCA	2,36	0,26
111^112	Insertion	18	GTGTTTTGGCCGCAGCCG	1,4	0,15
112^113	Insertion	5	TGTTT	1,24	0,14
112^113	Insertion	13	TGTTTTGGCCGCA	3,59	0,39
116^117	Insertion	8	TTGGCCGC	5,33	0,59
116^117	Insertion	14	TTGGCCGCAGCCGG	4,21	0,46
116^117	Insertion	15	TTGGCCGCAGCCGGA	1,29	0,14
118^119	Insertion	4	GGCC	1,35	0,15
118^119	Insertion	10	GGCCGCAGCC	1,46	0,16
119^120	Insertion	6	GCCGCA	1,29	0,14
120^121	Insertion	2	CC	1,18	0,13
137^138	Insertion	1	A	1,12	0,12

**Tabelle A.9.3: Detektierte Varianten des Sub-Pools kürzerer Sequenzen der Probe CC2C 2.3.**

Position	Typ	Länge [bp]	Referenz	Frequenz (Sub-Pool)	Frequenz (gesamt)
99-108	Deletion	10	GAGAGTGCCC	2,74	0,69
101-108	Deletion	8	GAGTGCCC	2,26	0,57
101-111	Deletion	11	GAGTGCCCGAC	3,53	0,89
102-118	Deletion	17	AGTGCCCGACGTGTTTT	1,05	0,27
105-119	Deletion	15	GCCCCGACGTGTTTTG	1,11	0,28
120-125	Deletion	6	GCCGCA	2,48	0,63
123-125	Deletion	3	GCA	4,74	1,20
127-139	Deletion	13	CCGGATATGACAA	1,75	0,44
131-139	Deletion	9	ATATGACAA	1,53	0,39

**Tabelle A.9.4: Detektierte Varianten des Sub-Pools längerer Sequenzen der Probe CC2C 2.3.**

Position	Typ	Länge [bp]	Insertions-Sequenz	Frequenz (Sub-Pool)	Frequenz (gesamt)
102^103	Insertion	16	GTGCCCCGACGTGTTTT	1,65	0,14
103^104	Insertion	14	TGCCCCGACGTGTTT	2,56	0,23
104^105	Insertion	15	GCCCCGACGTGTTTTG	1,55	0,14
105^106	Insertion	1	C	1,55	0,14
106^107	Insertion	14	CCGACGTGTTTTGG	2,47	0,22
106^107	Insertion	20	CCGACGTGTTTTGGCCGCA G	6,03	0,53
108^109	Insertion	11	GACGTGTTTTG	1,55	0,14
108^109	Insertion	17	GACGTGTTTTGGCCGCA	1,55	0,14
110^111	Insertion	10	CGTGTTTTGG	1,1	0,10
110^111	Insertion	11	CGTGTTTTGGC	4,11	0,36
110^111	Insertion	13	CGTGTTTTGGCCG	1,1	0,10
110^111	Insertion	17	CGTGTTTTGGCCGCAGC	1,46	0,13
111^112	Insertion	14	GTGTTTTGGCCGCA	1,1	0,10
113^114	Insertion	14	GTTTTGGCCGCAGC	1,19	0,10
117^118	Insertion	13	TGGCCGCAGCCGG	9,78	0,86
117^118	Insertion	14	TGGCCGCAGCCGGA	1,01	0,09
117^118	Insertion	16	TGGCCGCAGCCGGATA	2,93	0,26
118^119	Insertion	4	GGCC	1,01	0,09
118^119	Insertion	10	GGCCGCAGCC	1,01	0,09
118^119	Insertion	13	GGCCGCAGCCGGA	1,65	0,14
119^120	Insertion	2	GC	1,46	0,13
119^120	Insertion	6	GCCGCA	1,19	0,10
137^138	Insertion	1	A	1,19	0,10

**Tabelle A.9.5: Detektierte Varianten des Sub-Pools kürzerer Sequenzen der Probe CC2G 8x.**

Position	Typ	Länge [bp]	Referenz / Insertions-Sequenz	Frequenz (Sub-Pool)	Frequenz (gesamt)
94-126	Deletion	33	CCGGTGAGAGTGCCCCGACGT GTTTTGGCCGCAG	5,76	2,90
96-98	Deletion	3	GGT	4,66	2,35
97-111	Deletion	15	GTGAGAGTGCCCCGAC	1,31	0,66
98-115	Deletion	18	TGAGAGTGCCCCGACGTGT	1,19	0,60
98-117	Deletion	20	TGAGAGTGCCCCGACGTGTTT	1,71	0,86
99-107	Deletion	9	GAGAGTGCC	1,27	0,64
99-108	Deletion	10	GAGAGTGCCC	2,22	1,12
99-119	Deletion	21	GAGAGTGCCCCGACGTGTTTTG	1,42	0,72
99-125	Deletion	27	GAGAGTGCCCCGACGTGTTTTG GCCGCA	1,48	0,75
99-126	Deletion	28	GAGAGTGCCCCGACGTGTTTTG	1,04	0,52

Fortsetzung Tabelle A.9.5

			GCCGCAG		
101-108	Deletion	8	GAGTGCCC	1,48	0,75
101-111	Deletion	11	GAGTGCCCCGAC	1,21	0,61
109	Deletion	1	G	1,33	0,67
109-114	Deletion	6	GACGTG	4,70	2,37
111-121	Deletion	11	CGTGTTTTGGC	1,38	0,69
118^119	Insertion	2	AC	4,72	2,38
124-128	Deletion	5	CAGCC	16,59	8,37
131	Deletion	1	A	16,85	8,50
131-139	Deletion	9	ATATGACAA	2,24	1,13

**Tabelle A.9.6: Detektierte Varianten des Sub-Pools längerer Sequenzen der Probe CC2G 8x.**

Position	Typ	Länge [bp]	Insertions-Sequenz	Frequenz (Sub-Pool)	Frequenz (gesamt)
98^99	Insertion	2	GA	2,49	0,79
100^101	Insertion	29	GAGTGCCCCGACGTGTTTTGGC CGCAGCCG	1,45	0,46
102^103	Insertion	33	GTGCCCCGACGTGTTTTGGCCG CAGCCGGATATG	1,75	0,56
103^104	Insertion	21	TGCCCCGACGTGTTTTGGCCGC	1,99	0,63
104^105	Insertion	15	GCCCCGACGTGTTTTG	24,13	7,66
104^105	Insertion	21	GCCCCGACGTGTTTTGGCCGCA	3,16	1,00
108^109	Insertion	21	GACGTGTTTTGGCCGCAGCCG	6,53	2,07
108^109	Insertion	26	GACGTGTTTTGGCCGCAGCCG GATAT	1,08	0,34
109^110	Insertion	9	ACGTGTTTT	4,34	1,38
109^110	Insertion	18	ACGTGTTTTGGCCGCAGC	1,68	0,53
109^110	Insertion	25	ACGTGTTTTGGCCGCAGCCGG ATAT	1,78	0,57
112^113	Insertion	12	TGTTTTGGCCGC	1,14	0,36
118^119	Insertion	4	GGCC	9,72	3,09
118^119	Insertion	23	GGCCGGCCGCAGCCGGTTTGG CC	1,35	0,43
122^123	Insertion	7	GCAGCCG	5,45	1,73

**Tabelle A.9.7: Detektierte Varianten des Sub-Pools gleicher Länge zur Referenz der Probe CC3/4E 5x.**

Position	Typ	Länge [bp]	Insertions-Sequenz	Frequenz (Sub-Pool)	Frequenz (gesamt)
108^109	Insertion	11	GATTATAACCA	6,14	2,53

**Tabelle A.9.8: Detektierte Varianten des Sub-Pools kürzerer Sequenzen der Probe CC3/4E 5x.**

Position	Typ	Länge [bp]	Insertions-/Referenz-Sequenz	Frequenz (Sub-Pool)	Frequenz (gesamt)
88	Deletion	1	G	1,4	0,25
118^119	Insertion	5	AGATT	1,77	0,32
120^121	Insertion	6	AACCAA	2,06	0,37

**Tabelle A.9.9: Detektierte Varianten des Sub-Pools längerer Sequenzen der Probe CC3/4E 5x.**

Position	Typ	Länge [bp]	Insertions-Sequenz	Frequenz (Sub-Pool)	Frequenz (gesamt)
86^87	Insertion	36	TGGTGGGA ACTAACTAC AAGTGATTATAACCATGA	1,92	0,78
90^91	Insertion	35	GGGA ACTAACTACAAGT GATTATAACCAAGATGG	2,77	1,13
95^96	Insertion	22	CTAAACTACAAGTGATTATAA C	1,69	0,69
96^97	Insertion	15	TAAACTACAAGTGAT	1,13	0,46
96^97	Insertion	47	TAAACTACAAGTGATTTAAA CTACAAGTGATTAACTACA AGTGATT	1,52	0,62
100^101	Insertion	28	CTACAAGTGATTATAACCA AGATGGGGC	2,19	0,89
101^102	Insertion	26	TACAAGTGATTATAACCAA GATGGGG	1,77	0,72
106^107	Insertion	43	GTGATTATAACCATGTGATTA TAACCATGGTGATTATAACCA T	1,29	0,53
108^109	Insertion	11	GATTATAACCA	1,4	0,57
118^119	Insertion	14	AACTACAAGTGATT	4,86	1,98
118^119	Insertion	14	AAGATCAAGTGATT	1,23	0,50
120^121	Insertion	6	AACCAA	8,17	3,32

**Tabelle A.9.10: Übersicht über die Mutationsraten der untersuchten Proben der CRISPR/Cas Linien.**

<b>Probe</b>	<b>Amplifiziertes <i>RhMLO</i></b>	<b>Anzahl Reads</b>	<b>Mutationsrate</b>
CC1A 3.3.3	<i>RhMLO1</i>	9310	0 %
	<i>RhMLO2</i>	10724	0 %
	<i>RhMLO3/4</i>	12441	0 %
CC2C 2	<i>RhMLO2</i>	16217	15,3 %
	<i>RhMLO1</i>	13369	0 %
	<i>RhMLO3/4</i>	15545	0 %
CC2C 2.3	<i>RhMLO2</i>	12430	9,8 %
	<i>RhMLO1</i>	11409	0 %
	<i>RhMLO3/4</i>	15254	0 %
CC2G 8x	<i>RhMLO2</i>	9366	58,6 %
	<i>RhMLO1</i>	9719	0 %
	<i>RhMLO3/4</i>	11922	0 %
CC3/4A 2	<i>RhMLO3/4</i>	19812	9,6 %
	<i>RhMLO1</i>	22029	0 %
	<i>RhMLO2</i>	8213	0 %
CC3/4A 2.2.2	<i>RhMLO3/4</i>	16722	36,3 %
	<i>RhMLO1</i>	19088	0 %
	<i>RhMLO2</i>	7538	0 %
CC3/4E 5x	<i>RhMLO3/4</i>	11791	15,9 %
	<i>RhMLO1</i>	19449	0 %
	<i>RhMLO2</i>	10386	0 %

## Publikationen

Bartsch M, Geike J, Winkelmann T (2016) Fünf Jahre WeGa PhD: Ein deutschlandweites Doktorandennetzwerk Gartenbauwissenschaftlich forschender Doktoranden mit Zukunftsaussicht. DGG-Proceedings, Vol. 6 (WeGa), No. 2: 1-5 doi: 10.5288/dgg-pr-06-02-mb-2016.

Geike J, Kaufmann H, Schürmann F, Debener T (2015) Targeted Mutagenesis of *MLO*-Homologous Genes in the Rose Genome. ISHS Acta Horticulturae, XXV International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals.1087: 507–513.

Kaufmann H, Xianqin Q, Wehmeyer J, Debener, T (2012) Isolation, Molecular Characterization, and Mapping of Four Rose *MLO* Orthologs. Front Plant Sci 3, doi: 10.3389/fpls.2012.00244.

## Tagungsbeiträge

### Vorträge

Geike (2016) Targeted Mutagenesis of *MLO*-Homologous Genes in the Rose Genome. 8<sup>th</sup> International Rosaceae Genomics Conference. Angers, Frankreich.

Geike (2015) Targeted Mutagenesis of *MLO*-Homologous Genes in the Rose Genome. 25<sup>th</sup> International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals. Gent, Belgien.

Geike (2015) *MLO*-Orthologe in Rosen als Basis für Reverse Genetics Strategien in der Resistenzzüchtung. Workshop „Molekulare Züchtung“ der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie e.V. Einbeck, Deutschland.

### Poster

Geike (2015) Targeted Mutagenesis of *MLO*-Homologous Genes in the Rose Genome. 11<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, Foz do Iguacu, Brasilien.

Geike (2013) Targeted Mutagenesis of *MLO*-Homologous Genes in the Rose Genome. 6<sup>th</sup> International Rose Symposium, Hannover, Deutschland.

---

## Lebenslauf

Vorname, Name: Juliane Geike, geb. Wehmeyer  
Geburtsdatum: 09. Oktober 1986  
Geburtsort: Northeim  
Nationalität: deutsch

### Beruflicher Werdegang

seit 03/2017 Regulatory Affairs Manager Biotechnology bei KWS SAAT SE

### Berufsausbildung

12/2012 – 02/2017 Promotion im Fachbereich Biologie an der Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzengenetik, Abteilung Molekulare Pflanzenzüchtung  
10/2010 – 10/2012 Studium zum Master of Science der Pflanzenbiotechnologie an der Leibniz Universität Hannover  
10/2007 – 09/2010 Studium zum Bachelor of Science der Pflanzenbiotechnologie an der Leibniz Universität Hannover

### Freiwilligendienst

08/2006 – 09/2007 Freiwilliges Soziales Jahr in der Kultur, absolviert im Freilichtmuseum am Kiekeberg, Abteilung: PR & Marketing

### Schulausbildung

1999 – 2006 Ernst-Moritz-Arndt Gymnasium Herzberg am Harz, Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)  
1997 – 1999 Orientierungsstufe Wulften  
1993 – 1997 Grundschule Hörden

### Weitere praktische Tätigkeiten

06/2013 – 02/2017 Mitglied bei der standortübergreifenden und strukturierten Doktorandenausbildung WeGa PhD (Kompetenznetz Gartenbau)  
08/2014 – 07/2015 Doktorandensprecher WeGa PhD  
08/2013 – 07/2014 stellvertretender Doktorandensprecher WeGa PhD  
07/2009 – 03/2010 Studentische Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie der Leibniz Universität Hannover

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Debener für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung sowie die Unterstützung und fachlichen Diskussionen während der letzten Jahre.

Bei Frau Prof. Dr. Traud Winkelmann bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats sowie die schöne und bereichernde Zeit im Doktorandennetzwerk WeGa PhD und die hilfreichen Diskussionen währenddessen.

Bei den Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Pflanzenzüchtung bedanke ich mich ganz herzlich für die schöne Zeit, stete Hilfe und die tolle Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich Dr. Helgard Kaufmann für die vielen Ratschläge und hilfreichen Diskussionen danken. Ingrid Robotta für die unablässige Hilfe und Unterstützung im In-Vitro-Labor und die vielen gemeinsamen Stunden zusammen an der Werkbank. Julia Schröter für die unverzichtbare Hilfe und Unterstützung bei den molekularbiologischen Analysen und den vielen Isolationen.

Mein Dank gilt besonders meinen Mitdoktoranden Annette, Enzo, Friederike, Ina, Vinicius und Rose: Ohne Euch wäre die Zeit nicht mal halb so schön gewesen! Ich danke Euch für die vielen lustigen gemeinsamen Stunden im Labor, Büro, Park, usw. und den fachlichen und emotionalen Beistand bei Rückschlägen und Tiefs.

Ich danke meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für die fortwährende Unterstützung und den Zuspruch während der letzten Jahre sowie die Geduld und Rücksicht die Ihr mit mir hattet.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Jannis: Danke für Deinen unermüdlichen Zuspruch, Deine Unterstützung und Deine unendliche Geduld und Rücksicht während aller Höhen und Tiefen. Ohne Dich wäre dies alles nicht möglich gewesen!