

Zusammenfassung

Die moderne Landwirtschaft verlangt nach innovativen Techniken, um etablierte Strategien in der Zucht voranzutreiben. Traditionelle Ansätze haben ihre Grenzen und basieren vor allem auf der Verfügbarkeit eines breiten genetischen Spektrums und der Auswahl von geeigneten Genotypen zur Verbesserung der gewünschten Eigenschaften. Eines dieser Merkmale ist die Verbesserung der Resistenz gegen biotischen Stress oder Krankheitserreger. Um dieses Ziel bei Kulturpflanzen mit einer schmalen genetischen Basis wie z.B. *Brassica napus* zu erreichen, bedarf es neuer Strategien. Ein Beispiel hierfür ist die Störung von Pflanzenfaktoren, die vom Erreger für die erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes benötigt werden (Suszeptibilitätsfaktoren). Die Verticilliumwelke wird durch den bodenbürtigen hemi-biotrophen Pilz *Verticillium longisporum* verursacht und dieser ist eine der häufigsten Pilzerkrankungen im Rapsanbau. Die Krankheit führt zu einer vorzeitigen Reifung und kann zu erheblichen Ertragseinbußen führen. Die Methoden für das Disease Management sind sehr begrenzt. Gegenmaßnahmen setzen vor allem auf Bodenhygiene oder Präventionsstrategien zur Verringerung der Anzahl der Sporen im Boden. Die genetischen Ressourcen für die Resistenzzüchtung sind limitiert und es wurde bisher keine echte Resistenz entdeckt. Suszeptibilitätsfaktoren in Verbindung mit der Genom-Modifikation basierend auf CRISPR/Cas9 kann als Quelle zur Erzeugung von rezessiver Resistenz genutzt werden. CRISPR/Cas9 ist das vielversprechendste System für die gezielte Mutagenese mit dem Vorteil der einfachen Assemblierung, Verwendung und des Multiplexen. Die Ausschaltung der Zielgene wird durch die Induktion kleiner InDels ermöglicht, die durch non homologous end joining (NHEJ) nach einem Doppelstrangbruch im Zielort verursacht werden. Ein weiterer Ansatz, der durch diese Technologie ermöglicht wird, ist die Einführung einer Reparaturvorlage für homology directed repair (HDR), welche es ermöglicht die Nukleotidsequenz nach Wunsch zu verändern ohne die Genfunktion zu stören. In dieser Studie adaptieren wir mehrere Vektorsysteme, die verschiedene Nukleasen und Promotoren für die Anwendung in *Brassica napus* enthalten. Nach erfolgreicher Etablierung unserer Expressionskassetten liegt der Fokus auf dem Knockout der Kandidatengene *BnCRT1a* und *BnHVA22c*, die an der *V. longisporum* -*B. napus* Interaktion beteiligt sind. Loss-of-function Linien für die Gene *BnCRT1a* und *BnHVA22c* wurden generiert und mit *V. longisporum* infiziert. Zusätzlich zu diesem NHEJ-Ansatz sollen miRNA-Bindungsstellen von pilzlichen miRNAs im Wirtsgenom mittels HDR-Ansatzes verändert werden, ohne die Funktion für die Gene *BnAGO1* und *BnTAO1* zu beeinträchtigen. Zu diesem Zweck wurde das virale Genom des Bean Yellow Dwarf Virus für die Verwendung in *B. napus* hairy roots angepasst. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Loss-of-function Linien eine stark reduzierte Ausprägung der Symptome und Wachstumshemmung zeigten. Diese Ergebnisse unterstreichen unsere Arbeitshypothese, dass *CRT1a* und *HVA22c* die Resistenz gegen *V. longisporum* in ihrem mutierten Zustand hervorrufen können. Die darauffolgenden Experimente beschäftigten sich mit der Funktionsweise dieser Gene in Pflanzen. Leider konnten dabei keine signifikanten Unterschiede im Expressionsprofil der Markergene für molekulare und physiologische Prozesse zwischen den Mutanten und Wildtyp festgestellt werden. Lediglich das Ethylen-Markergen *ETR2* zeigte eine erhöhte Expression in Knockout-Linien im nicht infizierten Zustand, dies steht in Einklang mit Expressionsdaten aus *A. thaliana*. Auch die Analyse der co-regulierten Gene, welche eine mögliche Rolle in der Proteinfaltung / ER-Stress (für *CRT1a*) oder dem Vesikeltansport / Calloseverschluss der Plasmodesmata (für *HVA22c*) spielen, zeigte keinen Unterschied zwischen mutierten Linien und dem Wildtyp. Die Vektorsysteme für den HDR-basierten Ansatz wurden ebenfalls erfolgreich implementiert und virale Replicons des Bean Yellow Dwarf Virus konnten innerhalb der Zelle nachgewiesen werden. Die miRNA-Bindestellen in den Genen *BnAGO1* und *BnTAO1*, die von *V. longisporum* genutzt werden, waren das Ziel unseres HDR-Ansatzes. Es konnten keine positiven HDR-Ereignisse identifiziert werden, welche einen Sequenzaustausch belegen. Insgesamt zeigte diese Arbeit, dass die Anwendung von CRISPR/Cas in Kombination Suszeptibilitätsfaktoren eine wertvolle Strategie zur Erzeugung der rezessiven Resistenzen gegen Krankheitserreger darstellt. Sie kann in Zukunft besonders für Kulturpflanzen mit limitierten genetischen Ressourcen sinnvoll in bestehende Zuchtmethodik integriert werden.

