



Hochschule Anhalt

Anhalt University of Applied Sciences

Fachbereich Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik

Thema

Etablierung des VIGS-Systems zur Untersuchung
trichom-spezifischer Gene in Tomate

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science

(B.Sc.)

von: Jacqueline Mathy
geboren am 29.06.1992

Studiengang: Biotechnologie

Gutachter: Prof. Dr. Sabine Rosahl
Prof. Dr. Alain Tissier

Köthen, 11.05.2016

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Alain Tissier für die Möglichkeit bedanken, meine Bachelorarbeit am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie in Halle anzufertigen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Stefan Bennewitz für die Unterstützung beim Anfertigen meiner Bachelorarbeit, sowie für das Korrekturlesen und die vielen Ratschläge.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Sabine Rosahl für die angenehme Betreuung und die Beantwortung all meiner Fragen.

Ein großer Dank geht zuletzt an die gesamte Arbeitsgruppe „Glanduläre Trichome und Isoprenoidbiosynthese“ der Abteilung „Stoffwechsel- und Zellbiologie“ für all die Hilfe bei auftauchenden Problemen, alle Anregungen und die schöne Zeit.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Anhangsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
2. Erläuterung der Aufgabenstellung	3
3. Stand des Wissens und der Technik	4
3.1. Glanduläre Trichome der Tomate.....	4
3.2. Virus-induziertes Gensilencing (VIGS)	6
3.3. Die trichom-spezifischen Genkandidaten.....	8
4. Materialien und Methoden	10
4.1. Materialien.....	10
4.1.1. Bakterien und Pflanzen	10
4.1.2. Antibiotika	10
4.1.3. Lösungen und Medien.....	11
4.1.4. Enzyme, Puffer und Marker.....	11
4.1.5. Primer.....	14
4.1.6. Kits und sonstige Materialien	15
4.2. Methoden.....	16
4.2.1. Isolation DNA-freier RNA aus Tomate und Bestimmung der Konzentration der RNA	16
4.2.2. Messung der RNA mit dem QIAxcel Advanced System.....	17
4.2.3. Synthese von cDNA.....	18
4.2.4. Kontroll-PCR der DNA	18
4.2.5. Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR	19
4.2.6. Aufreinigung der amplifizierten DNA-Fragmente	20

4.2.7. Klonierungsverfahren und Vektor-Konstruktion	20
4.2.8. Plasmide	22
4.2.9. Transformation von <i>E. coli</i> (DH10B)	23
4.2.10. Plasmid Aufbereitung und Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA	24
4.2.11. Restriktionsverdau und Agarosegel-Elektrophorese	24
4.2.12. Transformation von <i>A. tumefaciens</i> (GV3101::pmP90)	25
4.2.14. Agroinfiltration für VIGS	26
4.2.15. Lichtmikroskopie	26
4.2.16. Bestimmung des Trichom-Scores	27
4.2.17. qRT-PCR	28
4.2.18. Statistische Analyse	29
5. Ergebnisse	30
5.1. VIGS in einer <i>yfp</i> -Expressionslinie von <i>Solanum lycopersicum</i>	30
5.2. VIGS in einer <i>Del/Ros1</i> -Expressionslinie von <i>S. lycopersicum</i>	37
5.3. VIGS in der wilden Tomate <i>Solanum habrochaites</i>	38
5.4. Veränderung der Form von Typ VI Trichomen durch VIGS trichom-spezifischer Gene ..	39
5.5. Relative Quantifizierung durch qRT-PCR	40
6. Diskussion	42
7. Zusammenfassung und Ausblick	48
Literaturverzeichnis	50
Quellenverzeichnis	54
Anhang	A-1
Eidesstattliche Erklärung	A-6

Abkürzungsverzeichnis

CaMV	engl. <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> , Blumenkohl-Mosaik-Virus
CP	engl. <i>coat protein</i> , Kapsid-Protein
Ct	engl. <i>cycle threshold</i> , Schwellenwert-Zyklus
DCL	engl. <i>DICER-like protein</i> , DICER-Homolog-Protein
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Delia und Rosea1
dsRNA	doppelsträngige RNA
EST	engl. <i>Expressed Sequence Tag</i> , exprimierte Sequenzteilstücke
GOI	engl. <i>Gene of Interest</i> , Gen von Interesse
GPP	Geranyldiphosphat
HDR	4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl Diphosphat Reduktase, IPP/DMAPP-Synthase des MEP-Wegs
HMBPP	4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl Diphosphat
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropylthiogalactosid
LB	Luria-Bertani
MCS	engl. <i>Multiple Cloning Site</i> , multiple Klonierungsstelle
MEP	Methylerythritolphosphat
MP	Movement-Protein
PDS	Phytoen-Desaturase

PTGS	post-transkriptionales Gen-Silencing
PVX	engl. <i>Potato Virus X</i> , Kartoffelvirus X
QTL	engl. <i>Quantitative Trait Loci</i> , Region eines quantitativen Merkmals
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RISC	engl. <i>RNA-induced Silencing Complex</i> , RNA-induzierter Silencing-Komplex
Rz	selbst-spaltendes Ribozym
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i> , kleine eingreifende RNA
TGMV	engl. <i>Tomato Golden Mosaic Virus</i> , Tomate-Golden-Mosaik-Virus
TMV	engl. <i>Tobacco Mosaic Virus</i> , Tabak-Mosaik-Virus
TRV	engl. <i>Tobacco Rattle Virus</i> , Tabak-Rattle-Virus
VIGS	virus-induziertes Gen-Silencing
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid, Substrat für das Enzym β -Galactosidase

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Trichomtypen von verschiedenen <i>Solanum</i> spp.....	5
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Trichoms der kultivierten Tomate <i>S. lycopersicum</i> (LA4024) und der Parameter a_1 und a_2 in grün, b_1 und b_2 in rot zur Bestimmung des Trichom-Scores.	27
Abb. 3: Vergleichende Darstellung von Typ VI Trichom-Köpfe von Tomate.....	28
Abb. 4: TRV-Vektorkonstrukte für Agroinfiltration in Tomate	31
Abb. 5: Die einzelnen Schritte des TRV-vermittelten VIGS in <i>S. lycopersicum</i>	31
Abb. 6: Mikroskopie-Aufnahmen agroinfiltrierter Blätter vier Wochen nach Behandlung.	35
Abb. 7: Mikroskopie-Aufnahmen eines mit pAGT2377 infiltrierten Blattes vier Wochen nach der Behandlung.	36
Abb. 8: Phänotypen erhalten durch VIGS von <i>Del/Ros1</i> in der <i>Del/Ros1</i> exprimierenden Tomatenlinie.....	38
Abb. 9: Graphische Darstellung des Trichom-Scores der wilden Tomate <i>S. habrochaites</i> (LA1777), der kultivierten Tomate <i>S. lycopersicum</i> (LA4024) und der <i>yfp</i> -Expressionslinie von <i>S. lycopersicum</i> nach VIGS.....	39
Abb. 10: Darstellung der Expressionslevel von <i>pds</i> und <i>hdr</i> relativ zum Referenzgen Actin in den nicht infiltrierten Kontrollen und in den mit pAGT2374 und pAGT1849 infiltrierten Proben.	40
Abb. 11: Darstellung der Expressionslevel des kodierenden Gens des WRKY Transkriptionsfaktors 32 relativ zum Referenzgen Actin in den nicht infiltrierten Kontrollen und in den mit pAGT2240 infiltrierten Proben.	41

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und deren Anwendung	10
Tab. 2: Übersicht der verwendeten Pflanzen und deren Anwendung	10
Tab. 3: Übersicht der verwendeten Antibiotika, sowie der jeweiligen Lösungsmittel und Konzentrationen	10
Tab. 4: Übersicht der verwendeten Lösungen und Medien, sowie deren Zusammensetzung	11
Tab. 5: Übersicht der verwendeten Enzyme und deren Konzentrationen	11
Tab. 6: Übersicht der eingesetzten Puffer	12
Tab. 7: Übersicht der eingesetzten Marker	13
Tab. 8: Liste der verwendeten Oligonukleotid-Primer	14
Tab. 9: Liste der verwendeten Oligonukleotid-Primer für qRT-PCR	15
Tab. 10: Übersicht aller verwendeten Kits und Materialien	15
Tab. 11: Übersicht der amplifizierten DNA-Fragmente, deren Größe und der verwendeten Primer	19
Tab. 12: Übersicht der klonierten Plasmide, deren vermittelte Resistenzen und des Klonierungsschrittes indem sie verwendet wurden	22
Tab. 13: Übersicht aller weiteren verwendeten Plasmide	23

Anhangsverzeichnis

Abb. A1: Verwendete Vektoren für VIGS in <i>Solanum lycopersicum</i> und deren Bezeichnung (links)	A-1
Abb. A2: Einige Phänotypen erhalten durch VIGS von Solyc01g10930 (HDR) und Solyc03g123760 (PDS).....	A-2
Abb. A3: Einige Phenotypen erhalten durch VIGS von Solyc01g10930 (HDR).	A-3
Abb. A4: TRV-Vektorkonstrukte für Agroinfiltration in eine <i>Delila/Roseal</i> -Expressionslinie von <i>S. lycopersicum</i>	A-4
Abb. A5: Darstellung der Expressionslevel von <i>yfp</i> relativ zum Referenzgen Actin in den nicht infiltrierten Kontrollen und in den mit pAGT1848 (YFP) infiltrierten Proben	A-4
Abb. A6: Darstellung der Expressionslevel von <i>yfp</i> relativ zum Referenzgen Actin in den nicht infiltrierten Kontrollen und in den mit pAGT2240 (WRKY Transkriptionsfaktor 32) und pAGT2242 ((E)- β -Ocimen Synthase) infiltrierten Proben.....	A-5

1. Einleitung

Bei der Abwehr von Pflanzen gegen biotische und abiotische Stressfaktoren spielt die Oberfläche der Pflanzen eine große Rolle. Die äußere Epidermisschicht grenzt das Pflanzeninnere von der Umgebung ab und schützt dieses. Die Epidermis der meisten Pflanzen bildet haarartige Ausstülpungen aus. Diese werden als Trichome bezeichnet. Sie sind in einer Vielfalt von Formen, Größen und Strukturen vorzufinden und weisen unterschiedliche Stoffwechselaktivitäten auf. Auf Grund ihrer Lage haben sie einen Einfluss auf eine Vielzahl von Wechselwirkungen mit der Umgebung der Pflanze. Man unterscheidet Trichome in nicht-glanduläre und glanduläre Trichome. In den sekretorischen Kopfzellen der glandulären Trichome werden unterschiedliche Sekundärmetaboliten gebildet und gespeichert. Durch Berührung lösen sich die Kopfzellen der glandulären Trichome von der Pflanze und geben diese Metaboliten an die Umwelt ab. Diese Stoffe haben einen großen Einfluss bei der Abwehr der Pflanze gegen Pflanzenfresser und Schädlinge. So werden klebrige Harze als Insektenfallen gebildet oder mittels spezieller Duftstoffe die Feinde der Schädlinge angelockt. Viele dieser Verbindungen sind daher für die Wirtschaft von Interesse, als Duftstoffe oder aufgrund ihrer weiteren Eigenschaften als Wirkstoffe für die Medizin. Eine Möglichkeit liegt in der Produktion neuer Verbindungen in großem Maßstab in den Trichomen.

Am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie in Halle beschäftigt sich die Arbeitsgruppe „Glanduläre Trichome und Isoprenoidsynthese“ von Prof. Dr. Alain Tissier mit der Biologie der glandulären Trichome, ihrer Entwicklung, der Terpenbiosynthese in den Trichomen und dem Metabolic Engineering von interessanten Stoffen in Kooperation mit der Wirtschaft. Als Modellpflanzen werden hauptsächlich Nachtschattengewächse, wie Tabak- und Tomatenpflanzen eingesetzt, da sie eine große genetische Vielfalt aufweisen und umfangreiche Transkriptomsequenzen für diese Pflanzen zur Verfügung stehen (IPB-Halle 2013). Allerdings sind die Funktionen vieler Gene oder deren Rolle in der Entwicklung und dem Metabolismus der glandulären Trichome unklar, obwohl ihre Sequenz bekannt ist. Eine Möglichkeit zur Aufklärung ist das gezielte Silencing trichom-spezifischer Gene oder Genfamilien. Einfacher und schneller als über eine stabile Transformation der Pflanze ist dies durch VIGS (Virus-induziertes Gensilencing) möglich. Bereits nach zwei Wochen kann man entsprechende Anzeichen des Gensilencing in der Pflanze beobachten und neue Erkenntnisse über die getesteten trichom-spezifischen Gene gewinnen. So wurde das Genom in der kultivierten Tomate

Solanum lycopersicum vollständig sequenziert, wodurch sich diese Pflanze gut für Untersuchungen der glandulären Trichome und trichom-spezifischer Gene eignet. Die glandulären Trichome der wilden Tomate *S. habrochaites* und der kultivierten Tomate *S. lycopersicum* weisen unterschiedliche Trichom-Kopfformen auf. Mittels einer Kreuzung eines F1-Hybrids (*S. habrochaites* LA1777 x *S. lycopersicum* WVA106) mit *S. lycopersicum* wurde eine Rückkreuzungspopulation erzeugt, die phänotypisiert und genotypisiert wurde. Anhand einer QTL-Analyse konnten Korrelationen zwischen einzelnen Genen und den Unterschieden im Phänotyp der Trichome bestimmt werden. Am stärksten hochreguliert im Vergleich zum Blatt waren Gene eines QTLs auf Chromosom 1. Zur Ermittlung des Einflusses dieser Gene auf die Trichom-Entwicklung und -form bietet sich VIGS in Tomate mit ausgewählten Genkandidaten an.

2. Erläuterung der Aufgabenstellung

Zwar ist die Anwendung von VIGS an Tomatenpflanzen zur Untersuchung von Genen mit unbekannter Funktion bereits häufig in der Literatur erwähnt worden, allerdings wird dabei meist auf die Entwicklung von Blüten und Früchten fokussiert. Um neue Erkenntnisse über trichom-spezifische Gene der Tomatenpflanze zu erlangen, war es Ziel dieser Arbeit an der Entwicklung eines Systems zum VIGS von trichom-spezifischen Genen in *Solanum* spp. mitzuwirken. VIGS ist eine Methode zum Gensilencing in Pflanzen, die erst kürzlich am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie eingeführt wurde. Die Arbeitsgruppe „Glanduläre Trichome und Isoprenoidsynthese“ ist die Erste, die an der Etablierung dieser Methode am Forschungsinstitut arbeitet. Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollten die vorangegangenen Untersuchungen an der kultivierten Tomate *Solanum lycopersicum* (LA4024) und der wilden Tomate *Solanum habrochaites* (LA1777) fortgeführt werden. Es sollte die bereits verwendete Agroinfiltrationsmethode mittels Vakuum durch Anpassung von freiwählbaren Parametern verbessert und eine neue Infiltrationsmethode mittels Zahnstocher an kultivierten Tomatenpflanzen getestet werden. Da die Vakuuminfiltration von *S. habrochaites* zur Nekrose der infiltrierten Blättern führt, sollte ermittelt werden ob eine Agroinfiltration für VIGS mit der Zahnstocher-Methode möglich ist. Zur Anwendung von VIGS für die Untersuchung trichom-spezifischer Gene sollten Vektorkonstrukte auf Basis des TRV (Tabacco Rattle Virus) für ausgewählte Zielgene kloniert und in *S. lycopersicum* infiltriert werden. Als Genkandidaten wurden in den Trichomen hochregulierte Gene ausgewählt, die einen Einfluss auf die Trichom-Form haben könnten und die zuvor über QTL-Analysen einer Rückkreuzungspopulation ermittelt wurden. Bei diesen Genen handelt es sich um Solyc01g109120 (WD-40 Wiederholungsprotein), Solyc01g104550 (WRKY Transkriptionsfaktor 32) und Solyc01g105870 ((E)- β -Ocimen Synthase). Durch Betrachtungen der agroinfiltrierten Pflanze mit bloßem Auge und unter dem Mikroskop sollte nach zwei bis drei Wochen Veränderungen im Phänotyp der gesamten Pflanze, ihrer Blättern und Trichomen festgestellt werden. Mittels des Trichom-Scores sollte die Trichom-Form von Trichomen auf neu-gebildeten Blättern bestimmt werden. Durch quantitative RT-PCR sollte das beobachtete Silencing der trichom-spezifischen Gene bestätigt werden.

3. Stand des Wissens und der Technik

3.1. Glanduläre Trichome der Tomate

Trichome sind kleine hervorstehende Pflanzenteile epidermalen Ursprungs die auf der Oberfläche von Blättern oder anderen Organen gefunden werden können. Sie variieren in Größe, Form und Anzahl der Zellen (Schilmiller et al. 2008, Werker 2000). Glanduläre Trichome können aus nur wenigen Zellen bestehen oder größere Strukturen aus differenzierten Basal-, Stängel- und apikalen Sekretionszellen bilden (Besser et al. 2009, Payne 1978, Schilmiller et al. 2008). Es wird vermutet, dass glanduläre Trichome aus nicht-glandulären Trichomen durch Differentiation von apikalen Zellen in sekretorische Zellen entstanden sind. So ähneln sich mehrzellige nicht-glanduläre und glanduläre Trichome morphologisch (Tissier 2012a). Üblicherweise sind auf der Pflanzenoberfläche mehrere unterschiedliche Trichom-Typen zu finden (Schilmiller et al. 2008, Tissier 2012a).

Glanduläre Trichome produzieren, speichern und sekretieren große Mengen an Sekundärmetaboliten (A. Schilmiller et al. 2010, Schilmiller et al. 2008, A. L. Schilmiller et al. 2010, Spyropoulou et al. 2014). Diese verschiedenen Produkte reichen von Insekten anziehenden Nektaren zu Salzen und hochgradigen Toxinen. Daher sind Trichome Teil vieler Prozesse der Interaktion mit der Umgebung, wie die Abwehr gegen Pflanzenfresser, Schädlinge und Pathogene oder in der Ionen-Homöostase. Viele dieser Inhaltsstoffe spielen als Medikamente (Artemisinin zur Behandlung von Malaria), Duftstoffe (Sclareol als Präkursor für Ambrox), Nahrungsmittelzusätze und natürliche Pestizide (Gossypol aus Baumwolle wirkt anti-funguell) eine kommerzielle Rolle (Glas et al. 2012, Kim et al. 2014, A. Schilmiller et al. 2010, Schilmiller et al. 2008, A. L. Schilmiller et al. 2010, Tissier 2012a). Trichome operieren als geschlossene biochemische Systeme mit wenigen hochaktiven Stoffwechselwegen, des Primär- und Sekundärmetabolismus (Schilmiller et al. 2008). Die Expression von Genen der Trichom-Stoffwechselwege beschränkt sich auf die glandulären Zellen der Trichome und somit sind diese Gene hochspezifisch (Tissier 2012a, b). Die Dichte der Trichome auf dem Pflanzenblatt hat keinen Einfluss auf die Synthese und Aktivität der entsprechenden Enzyme (A. Schilmiller et al. 2010), jedoch auf die systemische Antwort auf Umwelteinflüsse. Denn mit einem Anstieg der Trichomanzahl nimmt auch die Menge der glandulären Zellen und somit der produzierten Metabolite zu.

Angiosperme, wie die Lamiaceae, Solanaceae, Asteraceae und Cannabaceae sind besonders reich an glandulären Trichomen (Tissier 2012a). So bilden auch die wilde Tomate *Solanum habrochaites* (LA1777) und die kultivierte Tomate *Solanum lycopersicum* glanduläre Trichome besonders auf den Blättern und Stängeln aus (Besser et al. 2009). Insgesamt können sieben verschiedene Typen von Trichomen der *Solanum* spp. gefunden werden. Dabei sind Typ II, V und III nicht-glanduläre Trichome und Typ I, IV, VI und VII glanduläre Trichome. Sie unterscheiden sich sowohl in ihrer Morphologie, als auch in ihrem chemischen Inhalt (Glas et al. 2012). Zwei Arten von Trichomen treten dabei vermehrt auf. Dies sind zum einem Typ I Trichome mit einem mehrzelligen Stängel und einer einzelnen, kleinen Drüsenzelle an der Spitze. Zum anderen findet man Typ VI Trichome vor. Diese haben einzelligen Stängel mit einem, aus vier Zellen bestehenden, glandulären Kopf. Zusammen produzieren diese Drüsen eine Vielzahl von Stoffen (A. L. Schilmiller et al. 2010, Tissier 2012b). Die produzierten Sekundärmetaboliten reichen von Terpenen über Phenylpropanoid-Derivate und Acylzuckern zu Flavonoiden (Kim et al. 2014, A. L. Schilmiller et al. 2010, Spyropoulou et al. 2014). *Solanum lycopersicum* akkumuliert dabei hauptsächlich Monoterpene und *Solanum habrochaites* große Mengen an Sesquiterpenen (Besser et al. 2009, Glas et al. 2012).

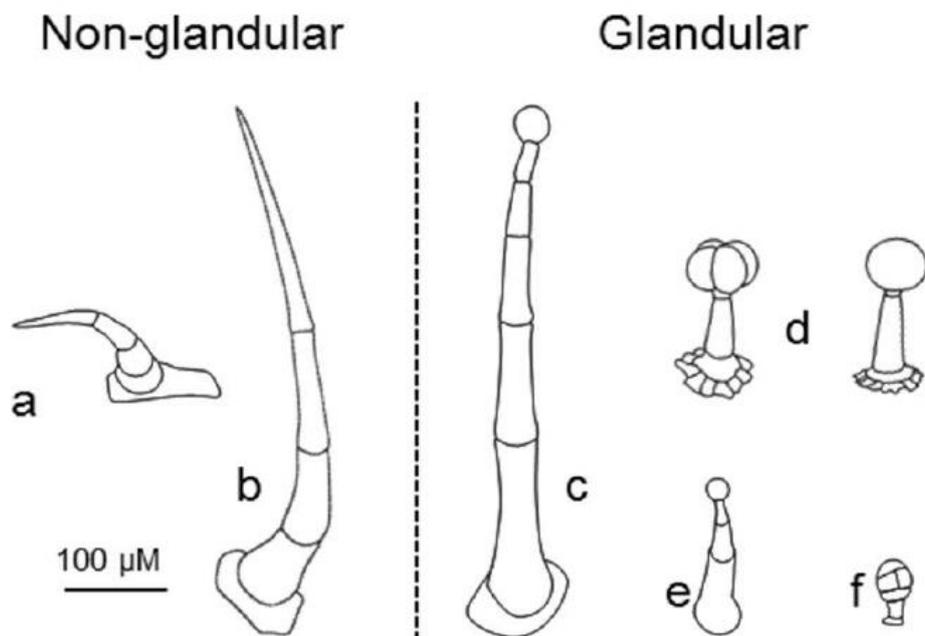


Abb. 1: Trichomtypen von verschiedenen *Solanum* spp. **a.** Typ II von *S. lycopersicum*. **b.** Typ III. **c.** Typ I. **d.** Typ VI glanduläre Trichome. **Links:** Trichome der kultivierten Tomate *S. lycopersicum* mit vier sekretorischen Zellen. **Rechts:** Trichome der wilden Tomate *S. habrochaites*. mit vier sekretorischen Zellen umgeben von einer Zellwand-Hülle, sodass der Eindruck einer einzelnen sekretorischen Zelle entsteht. In dem interzellulären Bereich in der Mitte dieser vier Zellen werden wahrscheinlich viele der sekretorischen Produkte gespeichert. **e.** Typ IV von *S. habrochaites*. **f.** Typ VII (Tissier 2012b).

Da Trichome nicht mit dem vaskulären System verbunden sind und von der Epidermis hervorstehen, können sie häufig einfach separiert, geerntet und deren Inhaltsstoffe, Proteine und RNAs untersucht werden. Somit können Enzyme und für die Produktion von Sekundärmetaboliten verantwortliche Stoffwechselwege in diesen Strukturen identifiziert werden (Schillmiller et al. 2010, Schillmiller et al. 2008). Zusätzlich zur dokumentierten, chemischen Diversität ist eine steigende Anzahl an genetischen und genomischen Quellen für Tomate verfügbar (Fernandez-Pozo et al. 2015a). Durch Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierungen von Trichom-RNA, der Produktion von trichom-spezifischen EST-Bibliotheken und Microarrays von verschiedenen Pflanzenarten, wie Tomate, konnten viele Gene der Stoffwechselwege in den Trichomen, identifiziert werden (Schillmiller et al. 2008, Spyropoulou et al. 2014, Tissier 2012a). Gerade die Rolle der von Tomatentrichomen produzierten Sekundärmetabolite bei der Abwehr gegen Pathogene ist von Interesse. Die Kenntnis der Tomatensequenzen schafft die Möglichkeit für weitere Untersuchungen, wie *metabolic engineering* in Tomatentrichomen (Tissier 2012b) zum weiteren Verständnis der Trichom-Entwicklung und der trichom-spezifischen Gene und Stoffwechselwege. Allerdings wurden solche Studien in glandulären Trichomen durch den Mangel an passenden Methoden für lange Zeit verhindert. Um die Funktion von unbekanntem Gensequenzen zu ermitteln, wurden Phänotypen von Mutantenlinien mit T-DNA-Insertionen oder -Deletionen analysiert. Allerdings weisen solche Pflanzenlinien einige Nachteile, wie fehlende Phänotypen aufgrund von hoher Genduplikation im Pflanzengenom und der Verlust von Insertionen auf (Liu et al. 2002). Zudem ist es äußerst schwierig stabile genetische Transformanten bei Tomatenpflanzen (Besser et al. 2009, Liu et al. 2002) und anderen Pflanzenspezies herzustellen (Becker und Lange 2010). Inzwischen hat sich virus-induziertes Gensilencing als eine nützliche Methode zur Untersuchung von Genfunktionen in der *Solanum*-Spezies und anderen Spezies etabliert und kann erfolgreich für Studien des Trichom-Metabolismus in Tomate genutzt werden (Besser et al. 2009).

3.2. Virus-induziertes Gensilencing (VIGS)

VIGS stellt eine transiente Alternative zum Ausschalten der Expression eines spezifischen Gens in einer großen Anzahl an Pflanzen dar (Becker und Lange 2010, Burch-Smith et al. 2004, Liu et al. 2002), wodurch die Funktion eines bereits sequenzierten Gens analysiert werden (Ratcliff et al. 2001) und diese Funktion mit einem bestimmten Phänotyp verbunden werden kann (Virus

Induced Gene Silencing: Methods and Protocols 2013). Dabei besteht kein Bedarf eine Pflanze genetisch stabil zu transformieren, aber es können Mutanten und über-exprimierende Linien zum Studium multipler Geninteraktionen verwendet werden (Plant Gene Silencing: Methods and Protocols 2015). Man kann mehrere Replikate von einer einzigen infiltrierten Pflanze gewinnen, wodurch die benötigte Pflanzenanzahl für biologische Assays verringert wird (Quadrana et al. 2011). Bei VIGS wird ein rekombinanter Virenvektor, der eine partielle Sequenz des Wirtsgens enthält, genutzt um die Pflanze zu infizieren und post-transkriptionales Gensilencing (PTGS) auszulösen (Virus Induced Gene Silencing: Methods and Protocols 2013, Becker und Lange 2010, Liu et al. 2002). Durch PTGS wirken Pflanzen der Ausbreitung von Viren bei einer Infektion entgegen. Bei PTGS handelt es sich um einen sequenz-spezifischen RNA-Abbaumechanismus, der RNA-Interferenz ähnelt (Becker und Lange 2010) und durch doppelsträngige RNA (dsRNA) ausgelöst wird (Liu et al. 2002). Wenn sich der Virus in der Pflanze verbreitet, wird die T-DNA mit dem viralen Genom in das Genom der infizierten Wirtszellen integriert und transkribiert. Dies führt zur Produktion von dsRNAs (Becker und Lange 2010). Da in den Pflanzenzellen natürlicherweise keine dsRNAs vorkommen, werden RNAs speziell dann durch PTGS abgebaut, wenn ihre Sequenz mit der dsRNA übereinstimmt. So stellen beim VIGS sowohl virale RNAs als auch endogene Transkripte, welche homolog zum Insert des VIGS-Vektors sind, Ziele des RNA-Abbaus dar (Liu et al. 2002, Ratcliff et al. 2001). DCL (*DICER-like proteins*, RNase III Nukleasen) spalten die dsRNAs in siRNAs (*small interfering RNAs*) von 21 bis 24 Nukleotiden Länge (Becker und Lange 2010). Diese siRNAs gelangen in den RISC (*RNA-induced Silencing Complex*), welcher einen der beiden Stränge der siRNA abbaut. Der zweite Strang verbleibt im RISC und dient als Guide-RNA für den Abbau weiterer komplementärer siRNA und dem sequenz-spezifischen Spalten der Ziel-mRNA (Plant Gene Silencing: Methods and Protocols 2015). Das Virus-induzierte Silencing-Signal wird weiter amplifiziert und verteilt sich systematisch durch die Pflanze unabhängig von der erfolgreichen Ausbreitung der Virenbestandteile (Becker und Lange 2010). Die Symptome der infizierten Pflanze beim VIGS sind Verlust der Funktion oder reduzierte Expression des Zielgens (Liu et al. 2002, Ratcliff et al. 2001) ausgelöst durch eine Repression der Translation des jeweiligen Gens (Plant Gene Silencing: Methods and Protocols 2015). In den späteren Stadien des Infektionszyklus ist PTGS verantwortlich für den zunehmenden Rückgang der Virusverbreitung und –Vermehrung (Ratcliff et al. 2001).

Vektoren für VIGS sind von binären Ti-Plasmiden abgeleitete Standardvektoren, die für eine durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Pflanzentransformation genutzt werden. (Becker und Lange 2010, Unver und Budak 2009). Verschiedene Viren darunter der *Tobacco Mosaic*

Virus (TMV), *Potato Virus X* (PVX) und *Tomato Golden Mosaic Virus* (TGMV) wurden für VIGS als Vektoren entwickelt (Ratcliff et al. 2001, Unver und Budak 2009). Obwohl diese Vektoren effektiv sind, weisen sie einige Nachteile auf. Häufig ist der VIGS-Phänotyp, verursacht durch die Virusinfektion, durch Chlorose, Blattdeformation und Symptomen von Nekrose verfälscht. Außerdem sind diese Viren nicht in der Lage in jede Zelle einzudringen, wodurch in diesen Zellen das Zielgen des Wirts nicht stillgelegt werden kann. Zudem infizieren diese Viren keine Wachstumspunkte und können somit keinen Erkenntnisgewinn über die Entwicklung von Pflanzengewebe ermöglichen. VIGS mit dem *Tabacco Rattle Virus* (TRV) befällt eine große Auswahl an Wirtspflanzen, induziert nur milde Symptome der Virusinfektion (Becker und Lange 2010) und große Flächen nebeneinander liegender Zellen werden infiziert bis sich der Virus über die komplette Pflanze einschließlich Meristem verteilt hat (Ratcliff et al. 2001, Unver und Budak 2009). Auch wird ein Silencing der Genexpression in Wachstumspunkten ausgelöst. Somit ist der TRV-Vektor geeigneter zur Durchführung von VIGS-Experimenten im Vergleich zu TMV, PVX oder TGMV (Ratcliff et al. 2001) und ist damit auch einer der am meisten Genutzten (Virus Induced Gene Silencing: Methods and Protocols 2013). TRV ist ein positiv-strängiger RNA-Virus mit einem zweiteiligen Genom. Proteine, die durch RNA 1 kodiert werden, sind verantwortlich für Replikation und Bewegung innerhalb der Wirtspflanze. Proteine, die durch RNA 2 kodiert werden, sind dagegen für Virion-Bildung und durch Nematoden verursachte Übertragung zwischen Pflanzen verantwortlich (Ratcliff et al. 2001). Daher werden in der Regel zwei TRV-Vektoren pTRV1 (RNA 1) und pTRV2 (RNA 2) jeweils separat zwischen LB und RB platziert. Dabei wird ein Fragment des Zielgens in pTRV2 kloniert oder in einen pTRV2-GW Vektor (ein Gateway kompatibler Vektor) durch das restriktions- und ligationsfreie Gateway-Rekombinations-System (Virus Induced Gene Silencing: Methods and Protocols 2013, Unver und Budak 2009). Die Verwendung des Gateway-Systems erlaubt die Hochdurchsatz-Insertion von ESTs, wie zum Beispiel von Tomate, in einem TRV-Vektor wodurch eine große Anzahl an Genfragmenten untersucht werden kann (Liu et al. 2002, Purkayastha und Dasgupta 2009).

3.3. Die trichom-spezifischen Genkandidaten

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene mit trichom-spezifischer Expression Solyc01g109120 (WD-40 Wiederholungsprotein), Solyc01g104550 (WRKY

Transkriptionsfaktor 32) und Solyc01g105870 ((E)- β -Ocimen Synthase) korrelieren zu Unterschieden im Phänotyp der Trichome. Sie wurden anhand QTL-Analyse einer Rückkreuzungspopulation (*S. habrochaites* LA1777 x *S. lycopersicum* WVA106) ausgewählt und kodieren Enzyme, die unterschiedliche Funktionen aufweisen. Obwohl ihre Rolle in der Trichom-Entstehung und Entwicklung der unterschiedlichen Trichom-Formen nicht geklärt ist, wurden eine Reihe ihrer Eigenschaften und Aufgaben bei verwandten Proteinen untersucht. WD-40 Proteine bilden eine der größten Proteinfamilien in Eukaryoten (Wang et al. 2013). WD40-Proteindomänen falten sich in einen β -Propeller und bilden eine Plattform ohne katalytische Aktivität auf der sich große Protein-Proteinkomplexe reversibel bilden. Sie spielen in einer Vielzahl von Prozessen, wie in der Signaltransduktion, RNA-Verarbeitung, DNA-Replikation, Transkription, Proteinabbau, Vesikeltransport, Regulation der Zellteilung (Smith 2008) und Histon/Chromatin-Modifikation/Erkennung, eine Rolle (Suganuma et al. 2008). Der Name dieser Proteindomänen stammt von dem Kern der Wiederholungseinheiten, der 40-60 Aminosäure-Residuum beinhaltet, die mit einem Tryptophan-Asparaginsäure-Dipeptid (W-D) enden (Smith 2008). WRKY Transkriptionsfaktoren bilden eine der größten Transkriptionsfaktor-Familien in Pflanzen. Charakteristisch werden sie durch die Aminosäuresequenz WRKYGQK am N-terminalen Ende und den Zinkfinger-Motiven Cys(2)-His(2) oder Cys(2)-HisCys am C-terminalen Ende definiert. Diese beiden Merkmale werden für die Fähigkeit der WRKY-Proteine benötigt spezifisch an die DNA-Sequenz (T)(T)TGAC(C/T) (die sogenannte W-Box) im Promotor ihrer Zielgene, zu binden (Bakshi und Oelmüller 2014). Sie regulieren die abiotische und biotische Stresstoleranz von Pflanzen gegen Verletzungen, Trockenheit, Salze, Hitze, Kälte und Osmotischen Druck (Schlutenhofer und Yuan 2015) aber auch Alterung und Trichom-Entwicklung. Der WRKY Transkriptionsfaktor 32 beinhaltet zwei Cys(2)-His(2) Zinkfinger-Motive (Eulgem et al. 2000). Er reguliert die Kältetoleranz und spielt bei der Einwirkung von Hitze, Kälte und Salzen auf die Pflanze eine Rolle (Bakshi und Oelmüller 2014). (E)- β -Ocimen Synthase katalysiert die Bildung des Terpens (E)- β -Ocimen aus GPP (Geranyldiphosphat). Häufig findet eine durch Pflanzenschädlinge induzierte Emission von flüchtigen Terpenen im Zuge der Pflanzenabwehr statt. Diese flüchtigen Chemikalien ziehen die natürlichen Feinde der Pflanzenschädlinge an (Arimura et al. 2004). (E)- β -Ocimen findet man bereits in geringen Mengen in unbeschädigten Blättern und in größeren Mengen in durch Insekten geschädigten Pflanzen von *M. truncatula* (Navia-Giné et al. 2009). Aber auch von Blüten von *Citrus unshiu* (Shimada et al. 2005) und Löwenmaul (Dudareva 2003) wird (E)- β -Ocimen als Duftstoff emittiert. Dies lässt darauf schließen, dass Pflanzen durch Emission dieses Terpens Insekten anziehen.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Bakterien und Pflanzen

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und deren Anwendung

Bakterienstämme	Anwendung
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Klonierung
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101::pMP90	Agroinfiltration

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Pflanzen und deren Anwendung

Pflanzenlinie	Anwendung
unter dem trichom-spezifischen TPS5-Promotor <i>yfp</i> - exprimierende <i>Solanum lycopersicum</i> (cv. MoneyMaker)- Tomatenlinie	VIGS
<i>Del</i> und <i>Ros1</i> exprimierende <i>S. lycopersicum</i> (cv. Micro Tom)-Tomatenlinie	VIGS
<i>Solanum habrochaites</i> (LA1777)	VIGS

4.1.2. Antibiotika

Antibiotika für die Selektion von rekombinanten *E. coli* und für die Kultivierung von Agrobakterien für virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS) in Tomate werden in Tab. 3 gezeigt.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Antibiotika, sowie der jeweiligen Lösungsmittel und Konzentrationen

Antibiotika	Lösungsmittel	Endkonzentration
Carbenicillin	Wasser/Ethanol (50:50, v/v)	50 µg/ml
Gentamycin	Steriles Wasser	50 µg/ml
Kanamycin	Steriles Wasser	50 µg/ml
Rifampicin	Methanol	25 µg/ml

Spectinomycin	Steriles Wasser	100 µg/ml
---------------	-----------------	-----------

4.1.3. Lösungen und Medien

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Lösungen und Medien, sowie deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Acetosyringon	50 mM gelöst in DMSO
LB-Medium (Luria-Bertani Medium)	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 85 mM Natriumchlorid (pH 7,5)
Infiltrationsmedium	10 mM Magnesiumchlorid 10 mM MES (pH5,7) 200 µM Acetosyringon
IPTG	100mM gelöst in sterilem Wasser
SOC-Medium	0,5% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Trypton 10 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat 20 mM Glukose
TAE	40 mM Tris Hydrochlorid 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA (pH 8,0)
X-Gal	20 mg/ml gelöst in Dimethylformamid

4.1.4. Enzyme, Puffer und Marker

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Enzyme und deren Konzentrationen

Bezeichnung	Konzentration	Anbieter
ALLin™ Red Taq Mastermix 2x	-	highQu

BsaI	10 U/μl	New England Biolabs
EcoRI	10 U/μl	Thermo Scientific
5x QPCR Mix EvaGreen [®] (no Rox)	-	Bio&Sell
LR Clonase II Enzyme Mix	-	Invitrogen
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	2,5 U/μl	Thermo Scientific
Proteinase K	2 μg/μl	Invitrogen
Proto Script II Enzyme Mix (2x)	2,5 U/μl ProtoScript II Reverse Transcriptase 1,0 U/μl Murine RNase Inhibitor	New England Biolabs
DNase I	2 U/μl	Ambion
T4-Ligase	20 U/μl	Fermentas
TURBO DNase	2 U/μl	Ambion
XhoI	20 U/μl	New England Biolabs

Tab. 6: Übersicht der eingesetzten Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anbieter
CutSmart	50mM Kaliumacetat 20mM Tris-acetate 10mM Magnesiumacetat 100 μg/ml BSA pH 7.9 bei 25 °C	New England Biolabs
Denaturierungspuffer für Qiaxcel	-	Qiagen
10x DNase I Puffer	-	Ambion
10x <i>Pfu</i> Puffer	200 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25 °C) 100 mM Ammoniumsulfat 100 mM Kaliumchlorid 1% (v/v) Triton X-100 1 mg/ml BSA	Thermo Scientific
Proto Script II Reaction Mix (2x)	50 mM Tris-Acetate (pH 8,3) 75 mM Kaliumacetat 3,1 mM Magnesiumacetat	New England Biolabs

	2 mM Dithiothreitol (DTT) 0,5 mM dNTPs each	
Puffer G	10 mM Tris-HCl (pH 7,5 bei 37 °C) 10 mM Magnesiumchlorid 50 mM Natriumchlorid 0,1 mg/ml BSA	Thermo Scientific
Puffer O	50 mM Tris-HCl (pH 7,5 bei 37 °C) 10 mM Magnesiumchlorid 100 mM Natriumchlorid 0,1 mg/ml BSA	Thermo Scientific
Salzlösung des pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits	1,2 M Natriumchlorid 0,06 M Magnesiumchlorid	Invitrogen
10x T4 Ligase Puffer	400 mM Tris-HCl 100 mM Magnesiumchlorid 100 mM Dithiothreitol (DTT) 5 mM ATP (pH 7,8 bei 25 °C)	Fermentas
TE-Puffer (pH8,0)	1 M Tris Hydrochlorid 0,5 M EDTA	-
10x TURBO DNase Puffer	-	Ambion
Verdünnungspuffer für Qiaxcel	-	Qiagen

Tab. 7: Übersicht der eingesetzten Marker

Bezeichnung	Anbieter
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (von 75 bis 20,000 bp)	Thermo Scientific
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder (von 25 bis 700 bp)	Thermo Scientific

4.1.5. Primer

Primer für VIGS wurden für eine spezifische Gen-Region entworfen, wobei die optimale Länge des Genfragments 100 bis 500 bp beträgt (Virus Induced Gene Silencing: Methods and Protocols 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden ungefähr 300 bp lange Genfragmente verwendet, die möglichst spezifisch für das jeweilige Zielgen sind um simultanes Silencing beim VIGS von eng verwandten Genen zu vermeiden (Becker 2010). Hierfür wurde die cDNA-Sequenz des Zielgens mit Tomatengenom-cDNA (ITAG release 2.40) mit dem *Solgenomics VIGS tool* (Fernandez-Pozo et al. 2015b) verglichen um den geeignetsten Sequenz-Bereich herauszufinden. Mithilfe des *OligoAnalyzer 3.1* von IDT (Integrated DNA Technologies 2016) wurden nun entsprechende Primer entworfen und gegen die Tomatengenom-cDNA-Bibliothek (ITAG release 2.40) mit dem *Solgenomics BLAST tool* (Sol Genomics Network 2016) untersucht um die Spezifität der Primer für das Zielgenfragment zu überprüfen.

Tab. 8: Liste der verwendeten Oligonukleotid-Primer

Genkandidat	Primer	Sequenz (5'-3')
-	M13 For	GTAAAACGACGGCCAG
	M13 Rev	CAGGAAACAGCTATGAC
Solyc03g078400 Actin	SBE98 For	TTGTTGCACCACCTGAGAGGAAGT
	SBE99 Rev	TGTGGACAATGGAAGGACCAGACT
lacZ	SBE859 For	CACCGGAATGCGAGACCGTCACAGCTTGTC
	SBE860 Rev	AAGCGGAGACCGCAGCTGGCACG
YFP	SBE861 For	TTTGAAGACAATTCGCCGAGGTGAAGTTCGAGG
	SBE862 Rev	TTTGAAGACAAAAGCCTTTGCTCAGCTTGGACT
Solyc01g10930 HDR	SBE895 For	TTGGTCTCAAATGTCATCAGATGCTCCGCCGGC
	SBE897 Rev	TTGGTCTCACGAATTCCTCGCTTCATAAGCAATCTGAACTG C
Solyc01g104550 WRKY Transkriptionsfaktor 32	SBE863 For	TTGGTCTCAAATGCCTTAGATGTCCAATTATAT
	SBE864 Rev	TTGGTCTCAAAGCGAGTTTTTGGTAATTCTT
	SBE883 For	TTGGTCTCAAATGCCAAAACTCATGAAGAGTTATC
	SBE884 Rev	TTGGTCTCACGAATAATTCATGATCACCATCATAG
Solyc01g105870 Terpensynthase (E)- β -Ocimen Synthase	SBE885 For	TTGGTCTCAAATGACAAGTACCCTGACATAATTCGTTGGCC TGC
	SBE886 Rev	TTGGTCTCACGAACGTGTCCGTCTCCATGCTGGTATATG
Solyc01g109120 WD-40	SBE872 For	GGTTGGTCTCAAATGATACAATCTTCTTCTCATTCTCC
	SBE874 Rev	TTTGGTCTCACGAAGAGTTTTTGGTAATTCTT

Wiederholungsprotein		
Solyc03g123760 PDS	SBE892 For	TTGGTCTCAAATGTACAGAATTATACGCTTTTACTAG
	SBE894 Rev	TTGGTCTCACGAAACTTTCAGTTCCCAAAGAAG
Solyc12g099260 ATP Citrat Lyase α - Untereinheit	SBE880 For	TTGGTCTCAAATGAGCATTGAAAAGCTGGTTTCGG
	SBE881 Rev	TTGGTCTCAAAGCTCAGCACACAACAGAGTGC

Tab. 9: Liste der verwendeten Oligonukleotid-Primer für qRT-PCR

Genkandidat	Primer	Sequenz (5'-3')	Größe des PCR-Produkts
Solyc03g078400 Actin	SBE98	TTGTTGCACCACCTGAGAGGAAGT	129 bp
	SBE99	TGTGGACAATGGAAGGACCAGACT	
Solyc01g104550 WRKY Transkriptionsfaktor 32	SBE902	GGGTTGCTGTTGCTGCTGCT	70 bp
	SBE903	CAACTCTCTCCAGTTGAATGGCTTTGA	
Solyc01g105870 Terpensynthese (E)- β -Ocimen Synthase	SBE904	CCAGCATGGAGACGGACACGG	91 bp
	SBE905	GGGCATGGAAATAGTGATGGGCTCAA	
Solyc01g10930 HDR	SBE910	AAGAGAACTTCTTACCGGAGGGTCC	64 bp
	SBE911	TCGGGGGTGGATGCACCAGA	
Solyc03g123760 PDS	SBE912	AGCAAGCGTAGTTTAGCTTTGTGGT	116 bp
	SBE913	TCTCCTACTTGCTTCACCTCGCA	
YFP	SBE918	GCGCGATCACATGGTCCTGCT	66 bp
	SBE919	AGCTCGTCCATGCCGAGAGTGA	

4.1.6. Kits und sonstige Materialien

Tab. 10: Übersicht aller verwendeten Kits und Materialien

Bezeichnung	Konzentration	Anbieter
DNA-free TM Kit	-	Ambion
DNase Inactivation Reagent	-	Ambion
dNTP Mix	12,5 mM dATP 12,5 mM dCTP 12,5 mM dGTP	Invitrogen

	12,5 mM dTTP	
d(T) ₂₃ VN	50 µM	New England Biolabs
MinElute Gel Extraction Kit	-	Qiagen
Nucleo Spinn Plasmid Easy Pure Kit	-	MACHEREY-NAGEL
pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit	-	Invitrogen
pENTR™/D-TOPO® Vektor	15-20 ng/µl	Invitrogen
Proto Script® II First Strand cDNA Synthesis Kit	-	New England Biolabs
QIAquick PCR Purification Kit	-	Qiagen
Random Primer Mix	60 µM	New England Biolabs
RNeasy Plant Mini Kit	-	Qiagen
TURBO DNA-free™ Kit	-	Ambion

4.2. Methoden

4.2.1. Isolation DNA-freier RNA aus Tomate und Bestimmung der Konzentration der RNA

Das RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen wurde verwendet um RNA aus Blättern von Tomate zu isolieren. Zunächst wurde 100 µg Pflanzenmaterial geerntet und in einem 2ml-Tube mit zwei Stahlkugeln (3 mm Durchmesser) in flüssigen Stickstoff zwischengelagert. Insgesamt wurde das Pflanzenmaterial viermal für 30 s bei 30 Hz mit der MM400 Kugelmühle von Retsch homogenisiert und dabei nach jedem Schritt mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Danach wurden 450 µl einer Mischung aus 1 ml Puffer RLT und 10 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und für 2 min bei 56°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit der Zentrifuge (Zentrifuge 5424 oder 5424R von Eppendorf) wurde der Überstand auf die violette Säule des Kits (QIAshredder Säule) überführt und für 2 min erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen neuen 2 ml-Tube überführt und mit 0,5 V Ethanol (100%) gemischt. Die Probe wurde anschließend auf die rosa Säule des Kits (RNeasy Säule) überführt und für 15 s bei über 8000 rpm zentrifugiert. Nach Entsorgung des Durchflusses erfolgte der erste Waschschrift durch die Zugabe von 700 µl auf die rosa Säule und Zentrifugation für 15 s bei über 8000 rpm. Es erfolgten zwei weitere Waschschriffe wobei jeweils 500 µl Puffer RPE auf die rosa Säule gegeben wurden und danach

eine Zentrifugation beim ersten Schritt für 15 s und beim zweiten Schritt für 2 min bei über 8000 rpm durchgeführt wurde. Die rosa Säule wurde in ein neues 1,5 ml-Tube transferiert und für 1 min bei über 8000 rpm zentrifugiert. Erneut wurde die rosa Säule in neues 1,5 ml Tube transferiert und zur Elution 40 µl RNase-freies Wasser zugegeben. Nach Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur wurde eine Zentrifugation für 15 s bei über 8000 rpm durchgeführt. Der Durchfluss wurde erneute auf die rosa Säule gegeben und die Elution wiederholt. Die gewonnene RNA wurde durch die Messung der Konzentration mittels des Nano Drop 1000 Spektrophotometers von Thermo Scientific bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert. Nur bei $A_{260/230} > 1,8$ wurde die RNA weiterverwendet. RNA wurde in 5 µl-Aliquoten bei -80°C gelagert und mehrfaches Auftauen vermieden. Zur Entfernung eventuell auftretender Restmengen an genomischer DNA in den RNA-Proben wurde ein DNase-Behandlung mit dem TURBO DNA-free™ Kit (oder DNA-free™ Kit) von Ambion durchgeführt. Dafür wurde zu 10 µg RNA 5 µl von 10x TURBO DNase Puffer (DNase I Puffer) und 1 µl TURBO DNase (rDNase I) in einem Gesamtvolumen von 50 µl gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 5 µl DNase Inactivation Reagent und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden alle Enzyme, Salze und gDNA ausgefällt. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g für 1,5 min wurde der Überstand in ein neues Tube überführt und erneut die Quantität mittels Konzentrationsmessung mit dem Nano Drop 1000 Spektrophotometer ermittelt.

4.2.2. Messung der RNA mit dem QIAxcel Advanced System

Eine Messung der gewonnenen RNA (siehe 4.2.1.) wurde mit dem QIAxcel Advanced System von Qiagen durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden 500 ng RNA mit 4 µl Denaturierungspuffer für 2 min bei 70 °C inkubiert und anschließend 2 µl Verdünnungspuffer hinzugegeben. Nach der Messung mit dem QIAxcel Advanced Gerät wurde die Qualität der RNA mithilfe der dazugehörigen Software bestimmt. Anhand des Gelbildes und des Elektropherogramms wurde die Degradation der RNA abgeschätzt.

4.2.3. Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA wurde unter Verwendung des Proto Script[®] II First Strand cDNA Synthesis Kit von New England Biolabs nach den Anweisungen des Herstellers nach dem Standard-Protokoll durchgeführt. Zunächst wurden 250 ng RNA, 50 µM Oligo dT-Primer [d(T)₂₃VN] und 1 µl des Random Primer Mixes in einem Gesamtvolumen von 8 µl bei 65°C für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Proto Script II Reaction Mix (2x) und 2 µl Proto Script II Enzyme Mix erfolgte eine weitere Inkubation bei 25 °C für 5 min, 45 °C für 60 min und bei 80 °C für 5 min. Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde mittels PCR mit ALLin[™] Red Taq Mastermix nach Anweisungen des Herstellers highQu mit weniger als 100 ng cDNA überprüft.

4.2.4. Kontroll-PCR der DNA

Um die Kontamination der gewonnenen cDNA (siehe 4.2.3.) mit genomischer DNA auszuschließen, wurde ein Kontrollgen mittels PCR über ein Intron amplifiziert. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 µl 2x ALLin[™] Red Taq Mastermix von highQu, 4 pmol forward und reverse Primer (SBE98 und SBE99), 1 µl cDNA auf einem Gesamtvolumen von 20 µl. Als Kontrollen wurden jeweils ein Ansatz mit 10 ng gDNA und ein Ansatz mit entsprechender Menge Wasser anstelle von cDNA hergestellt. Alle drei Ansätze wurden nach den Anweisungen des Herstellers highQu inkubiert. Durch anschließende Gelelektrophorese für 30 min mit einem 2%-igen Agarosegel (siehe 4.2.11.) konnten die Ansätze miteinander verglichen werden um eine Kontamination der cDNA mit gDNA auszuschließen.

Um die Größe des Inserts zu bestätigen wurde eine Kontroll-PCR der klonierten Vektoren durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 2 µl ALLin[™] Red Taq Mastermix, 20 pM forward und reverse Primer, 2 µl steriles Wasser und maximal 30 ng Plasmid auf ein Gesamtvolumen von 10 µl. Die anschließende Inkubation erfolgte nach Anweisungen des Herstellers highQu. Es wurde eine Gelelektrophorese (siehe 4.2.11.) durchgeführt um die Größen der DNA-Fragmente zu kontrollieren.

4.2.5. Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR

Für die Klonierung eines mit Golden Gate kompatiblen Entry-Vektors (pAGT2092) wurde ein *blunt-end* (Ende eines DNA-Doppelstrangs ohne Überhang) *lacZ*-Fragment aus pICH47732 (siehe Tab. 12) durch PCR mit *Pfu* DNA Polymerase amplifiziert. Es wurde ein Reaktionsansatz von 100 µl bestehend aus 10 µl 10x *Pfu* Puffer, dNTPs (0,2 mM each), 20 pM/µl forward und reverse Primer, 1 ng DNA (pICH47732), 2 mM Magnesiumsulfat, 1,25 bis 2,5 U *Pfu* DNA Polymerase und der entsprechenden Menge an nuklease-freien Wasser hergestellt. Das verwendete PCR-Programm bestand aus einer anfänglichen Denaturierung für 1-3 min bei 95 °C und 30 Zyklen mit 30 s bei 95 °C; 30 s bei $T_M-5 = 60$ °C; 2 min/kb bei 72 °C, sowie einer Extension für 5-15 min bei 72 °C. Mit derselben Methode wurde des Weiteren ein YFP-Fragment aus pAGT1848 amplifiziert. Für die Klonierung aller weiteren VIGS-Vektoren wurde die Sequenz des Zielgenfragments durch PCR amplifiziert. Es wurde ein Reaktionsansatz von 100 µl hergestellt. Dazu wurden nach Anweisung des Herstellers highQu 50 µl ALLin™ Red Taq Mastermix (2x), 10 µM der spezifischen forward und reverse Primer (siehe 4.1.5.), 10 ng/µl cDNA (von *S. lycopersicum* LA 4024) mit destilliertem Wasser gemischt. Das verwendete PCR-Programm bestand aus einer anfänglichen Inkubation für 1 min bei 95 °C und 35-40 Zyklen mit 15 s bei 95 °C; 15 s bei T_M ; 15 s/kb bei 72 °C, sowie einer Inkubation für 5 min bei 72 °C.

Tab. 11: Übersicht der amplifizierten DNA-Fragmente, deren Größe und der verwendeten Primer

Name	Bemerkungen	Größe in bp
PCR SBE859-860	<i>lacZ</i> -Fragment aus pICH47732 (<i>blunt end</i> Produkt für TOPO-Klonierung)	606
PCR SBE861-862	YFP-Fragment aus pAGT1848	308
PCR SBE863-864	Fragment von Solyc01g104550 (WRKY Transkriptionsfaktor 32)	308
PCR SBE883-884	Fragment von Solyc01g104550 (WRKY Transkriptionsfaktor 32) für Klonierung in pTRV2-GW-DR	308
PCR SBE885-886	Fragment von Solyc01g105870 ((E)-beta-Ocimen Synthase)	308
PCR SBE872-874	Fragment von Solyc01g109120 (WD-40 Wiederholungsprotein)	308
PCR SBE880-881	Fragment von Solyc12g099260 (ATP Citrat Lyase α -Untereinheit) für Klonierung in pTRV2-GW-DR	308
PCR SBE892-894	Fragment von Solyc03g123760 (PDS)	308
PCR SBE895-897	Fragment von Solyc01g10930 (HDR)	308

4.2.6. Aufreinigung der amplifizierten DNA-Fragmente

Konnte nach Durchführung einer PCR die Entstehung des einzelnen gewünschten Produktes durch Gelelektrophorese (siehe 4.2.11.) mit 10 µl des Reaktionsansatzes nachgewiesen werden, wurden die DNA-Fragmente mittels QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen nach Anweisung des Herstellers auf gereinigt. Wurden zudem noch andere unerwünschte Produkte amplifiziert, wurde mit dem kompletten Ansatz nach der Reaktion eine Gelelektrophorese durchgeführt. Unter einer UV-Lichtlampe wurden die Banden des Zielfragments mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das Fragment mit dem MinElute Gel Extraction Kit von Qiagen nach Anweisung des Herstellers auf gereinigt. In beiden Fällen wurde die DNA mit einem Nano Drop 1000 Spektrophotometers von Thermo Scientific bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert.

4.2.7. Klonierungsverfahren und Vektor-Konstruktion

Zunächst wurde ein Golden Gate-kompatibler Entry-Vektor pAGT2092 mittels TOPO[®] Klonierung kloniert. Dabei handelt sich um eine Methode zum direkten Klonieren von *blunt-end* PCR Produkten in einen Entry-Vektor für das Gateway[®]-System von Invitrogen. Eine solche Klonierung wurde mit dem pENTR[™] Directional TOPO[®] Cloning Kit von Invitrogen durchgeführt. In einem Reaktionsansatz wurden nach Anweisung des Herstellers 70 bis 80 ng *blunt-end* PCR-Produkt (SBE859-860); 1 µl Salzlösung (1,2 M Natriumchlorid und 0,06 M Magnesiumchlorid) und 15 bis 20 ng TOPO[®] Vektor gemischt und auf 5 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Für optimale Ergebnisse wurde ein 2:1 molares Verhältnis von PCR-Produkt (PCR SBE859-860) : pENTR[™]/D-TOPO[®] Vektor gewählt. Anschließend wurden 2 µl des Reaktionsansatzes mit *E. coli* (siehe 4.2.2.) transformiert und mit den positiven Kolonien (blaue) nach Blau-Weiß-Selektion eine Kolonie-PCR durchgeführt (siehe 4.2.13.). Blau-Weiß-Selektion beruht auf dem *lacZ*-Gen, das für die Bildung von β-Galactosidase verantwortlich ist. Bei Inkubation mit den Substraten der β-Galactosidase IPTG und X-Gal werden Bakterienkolonien, die ein intaktes *lacZ*-Gen enthalten durch Umsatz der Substrate blau. Klone, bei denen das *lacZ*-Gen durch Insertion eines DNA-Fragments unterbrochen wurde oder gar kein *lacZ*-Gen vorhanden ist, sind nach Blau-Weiß-Selektion weiß (Mülhardt 2013). Von einem positiven Entry-Klon wurde die Plasmid-DNA gewonnen (siehe

4.2.10.) und durch PCR mit vektorspezifischen M13 forward und reverse Primern und den genspezifischen Primern SBE859-860 (siehe 4.2.4.) und Restriktionsverdau mit BsaI (siehe 4.2.11.) auf Korrektheit kontrolliert, sowie die Nukleotidsequenz mittels Sequenzierung (durchgeführt von Eurofins MWG Operon) überprüft. Für das Co-Silencing der Zielgene mit YFP wurde mittels einer Golden Gate Level 0 Reaktion das YFP-Fragment PCR SBE861-862 in den Level 1 Vektor pAGM1301 kloniert, wodurch pAGT2093 entstand. Anschließend wurden die DNA-Fragmente der GOIs zusammen mit (für das Silencing mit YFP) oder ohne pAGT2093 (für das Silencing in der *Del/Ros1* exprimierenden Tomatenlinie) durch Golden Gate Level 1 Klonierung in den Entry-Vektor pAGT2092 kloniert. Alle Golden Gate Klonierungen (Engler et al. 2008) wurden mit je 20 fmol Plasmid durchgeführt. Für die Restriktions-Ligations-Reaktion wurden in einem Gesamtansatz von 20 µl 5 U der T4 DNA Ligase, 10 U des Restriktionsenzym mit 10x T4 DNA Ligase Puffer zur DNA hinzugegeben. Der Gesamtansatz wurde bei 37 °C für 2 Stunden und anschließend bei 80 °C für 5 min inkubiert. Die Insertion wurde auf Korrektheit über Restriktionsverdau und Gelelektrophorese, sowie über PCR mit ALLinTM Red Taq Mastermix nach Anweisungen des Herstellers highQu mit M13-Primern und genspezifischen Primern kontrolliert. Die Nukleotidsequenz wurde mittels Sequenzierung (durchgeführt von Eurofins MWG Operon) überprüft. Für Sequenz-Alignments wurde die Software *Geneious* von Biomatters verwendet.

Die entstandenen Entry-Klone wurden durch Gateway Klonierung mit dem LR ClonaseTM II Enzymmix von Invitrogen in den Destination-Vektor pTRV2-GW kloniert. Der LR ClonaseTM II Enzymmix katalysiert die in vitro Rekombination zwischen einem *attL*-flankiertem Entry-Klon und einem *attR*-flankiertem Destination-Vektor um einen *attB*-flankierten Expressions-Klon zu erhalten. Dazu wurden 50-150 ng Entry-Klon, 150 ng/µl Destination-Vektor auf 8 µl mit TE Puffer aufgefüllt. Nach Zugabe von 2 µl LR ClonaseTM Enzymmix wurde der Reaktionsansatz für 1 h bei 25 °C inkubiert und 1 µl Proteinase K hinzugegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 10 min. Direkt anschließend wurde 1 µl mit *E. coli* transformiert (siehe 4.2.9.). Der Destination-Vektor enthält das *CcdB*-Gen, welches für die Vergiftung der Topoisomerase II verantwortlich ist. Da dies zum Tod des Bakteriums führt, wachsen somit nur Klone, die ein neues Insert enthalten (Mülhardt 2013). Der Vektor wurde auf Korrektheit über PCR (siehe 4.2.4.) mit genspezifischen Primern überprüft und in *A. tumefaciens* transformiert. Vor der Agroinfiltration wurde zur weiteren Kontrolle eine Kolonie-PCR durchgeführt.

4.2.8. Plasmide

Tab. 12: Übersicht der klonierten Plasmide, deren vermittelte Resistenzen und des Klonierungsschrittes indem sie verwendet wurden.

Name	vermittelte Resistenz	Klonierungsschritt	Bemerkungen
pAGT2092	Kanamycin	TOPO-Klonierung des Entry-Vektors	PCR SBE859-860 (lacZ-Kassette von pICH47732) in pENTR/D-TOPO-Vektor, VIGS Silencing pENTR Konstrukt
pAGT2093	Spectinomycin	Golden Gate Level 0	PCR SBE861-862 (YFP von pAGT1845) in pAGM1301
pAGT2230	Kanamycin	Golden Gate Level 1	PCR SBE872-874 (Fragment von Solyc01g109120 (WD-40 Wiederholungsprotein)) und pAGT2093 in pAGT2092
pAGT2231	Kanamycin	Golden Gate Level 1	PCR SBE863-864 (Fragment von Solyc01g104550 (WRKY Transkriptionsfaktor 32)) in pAGT2092
pAGT2238	Carbenicillin	Gateway	pAGT2230 in pTRV2-GW
pAGT2239	Kanamycin	Gateway	pAGT2231 in pTRV2-GW-DR
pAGT2240	Carbenicillin	Gateway	pAGT2322 in pTRV2-GW
pAGT2242	Carbenicillin	Gateway	pAGT2323 in pTRV2-GW
pAGT2320	Kanamycin	Golden Gate Level 1	PCR880-881 (Fragment von Solyc12g099260 (ATP Citrat Lyase α -Untereinheit)) in pAGT2092
pAGT2322	Kanamycin	Golden Gate Level 1	PCR SBE883-884 (Fragment von Solyc01g104550 (WRKY Transkriptionsfaktor 32)) und pAGT2093 in pAGT2092
pAGT2323	Kanamycin	Golden Gate Level 1	PCR SBE885-886 (Fragment von Solyc01g105870 ((E)- β -Ocimen Synthase)) und pAGT2093 in pAGT2092
pAGT2359	Kanamycin	Gateway	pAGT2320 in pTRV2-GW-DR

pAGT2362	Kanamycin	Golden Gate Level 1	PCR SBE895-897 (Fragment von Solyc01g10930 (HDR)) und pAGT2093 in pAGT2092
pAGT2420	Kanamycin	Golden Gate Level 1	PCR SBE892-894 (Fragment von Solyc03g123760 (PDS)) und pAGT2093 in pAGT2092
pAGT2477	Carbenicillin	Gateway	pAGT2420 in pTRV2-GW
pAGT2479	Carbenicillin	Gateway	pAGT2362 in pTRV2-GW

Tab. 13: Übersicht aller weiteren verwendeten Plasmide

Name	vermittelte Resistenz	Bemerkungen
pAGM1301	Spectinomycin	Golden Gate Level 0 Destination-Vektor CBTS2a S564I A567V D568G in pICH41308
pAGT1848	Carbenicillin	pAGT1845 (YFP) in pTRV2-GW, Template für PCR SBE861-862
pAGT1917	Kanamycin	pTRV1
pAGT1918	Kanamycin	pTRV2-DR für Silencing von <i>Delia</i> und <i>Roseal</i>
pAGT1919	Kanamycin	pTRV2-GW-DR (Gateway kompatibel, beinhaltet <i>attR2</i> und <i>attR1</i>) für Silencing des GOI sowie <i>Del/Ros1</i>
pICH47732	Carbenicillin	Golden Gate Level 1 Destination-Vektor, Template für PCR SBE859-860

4.2.9. Transformation von *E. coli* (DH10B)

50 µl chemokompetente Zellen wurden von -80 °C auf Eis transferiert und dort für 5 min aufgetaut. Nach Zugabe der DNA (max. 50 ng DNA/50 µl Zellen) wurden die Zellen für 30 min auf Eis gegeben, 90 s bei 42 °C erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium wurden die Zellen für 1h bei 37 °C im Schüttelschrank bei 180 rpm inkubiert. Bevor die transformierten Zellen ausplattiert wurden, wurden die verwendeten Agarplatten zur Blau-Weiß-Selektion mit 50 µl X-Gal und 50 µl IPTG (100mM) bestrichen. 50 – 200 µl der Zellsuspension wurde auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank Übernacht (max. 16h) inkubiert. Für die

weitere Isolierung der Plasmide (siehe 4.2.10.) wurde eine 5 ml-Kultur (LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika) von positiv transformierten Kolonien hergestellt.

4.2.10. Plasmid Aufbereitung und Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA

Das Nucleo Spin Plasmid Easy Pure Kit von MACHEREY-NAGEL wurde verwendet, um Plasmide aus Bakterien zu isolieren. Dazu wurden die Anweisungen des Herstellers leicht abgewandelt um größere Konzentration an Plasmid zu erhalten. Zunächst wurden 150 µl Puffer A1 zum Zellpellet gegeben und die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Puffer A2 zugegeben und die Proben mit der Hand kurz geschüttelt. Nach einer Inkubation von 2 min wurden 350 µl Puffer A3 zugegeben und die Probe erneut per Hand geschüttelt bis das Lysat farblos wurde. Es wurde für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und 680 µl des Überstandes auf die Säule gegeben. Die Säule wurde für 1 min bei 1500 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurden 450 µl Puffer AQ auf die Säule gegeben und diese für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zweimal zentrifugiert, wobei jeweils der Durchfluss verworfen wurde. Als nächstes wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Tube überführt und 40 µl Puffer AE auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 min wurde erneut für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die isolierten Plasmide. Die Konzentration wurde mithilfe eines Nano Drop 1000 Spektrophotometers von Thermo Scientific bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

4.2.11. Restriktionsverdau und Agarosegel-Elektrophorese

Um die Größe des eingefügten Genfragments der klonierten Vektorkonstrukte zu bestätigen wurden 300 bis 500 ng der Plasmid-DNA verdaut. Die Plasmide wurden mit 5 U des entsprechenden Restriktionsenzym und dem benötigten Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Die Analyse der Fragmentgrößen erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese in TAE Puffer bei 100 V unter Verwendung von 1-2,5% (w/v) Agarosegelen, die 0,25 µl/ml Ethidiumbromid enthielten. Dabei wurde der GeneRuler™

1 kb Plus DNA Ladder (von 75 bis 20,000 bp) und der GeneRuler™ Low Range DNA Ladder (von 25 bis 700 bp) von Thermo Scientific als Marker verwendet, um die Größe der Fragmente abzuschätzen. Die Software Geneious von Biomatters wurde zur Bestimmung der zu erwartenden Fragmentgrößen nach dem Restriktionsverdau eingesetzt.

4.2.12. Transformation von *A. tumefaciens* (GV3101::pmP90)

50 µl elektrokompente Zellen wurden von -80 °C auf Eis transferiert und dort für 5 min aufgetaut. Es wurde 20 ng DNA hinzugefügt. Die Zellen wurden in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette überführt und einem Impuls von 2,5 kV und 200 Ω ausgesetzt (verwendeter Elektroporator: MicroPulser™ von BioRad). Nach Zugabe von 1000 µl LB-Medium wurden die Zellen für 2 h bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Von den Proben wurden schließlich 100 µl auf LB-Agar-Platten (beinhalteten die entsprechenden Antibiotika) ausgestrichen und bei 28 °C für zwei bis drei Tage inkubiert.

4.2.13. Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob die Transformation von *A. tumefaciens* erfolgreich war, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurden nach Anweisung des Herstellers highQu 25 µl ALLin™ Red Taq Mastermix (2x) und 10 µM forward und reverse Primer (bis zu 0,4 µM Endkonzentration) mit destilliertem Wasser gemischt. Es wurden Einzelkolonien von einer Petrischale mit einer Pipettenspitze aufgenommen und im PCR-Ansatz resuspendiert. Das verwendete PCR-Programm bestand aus einer anfänglichen Inkubation für 1 min bei 95 °C und 35-40 Zyklen mit 15 s bei 95 °C; 15 s bei T_M; 15 s/kb bei 72 °C, sowie einer Inkubation für 5 min bei 72 °C. Anschließend wurde die Größe des amplifizierten Genabschnittes über Gelelektrophorese mit einem 1-2%igem Agarosegel überprüft.

4.2.14. Agroinfiltration für VIGS

Für VIGS wurden pTRV1, pTRV2 und sämtliche klonierten pTRV2-Vektorkonstrukte in den *Agrobacterium*-Stamm GV3101 durch Elektroporation (siehe 4.2.12.) eingebracht. Die Agrobakterien wurden mit entsprechendem selektivem Antibiotika (100 mg/ml) in einer 5-ml Kultur (LB-Medium) über Nacht bei 28 °C und 220 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur 10-fach in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika (100 mg/ml) verdünnt und 10 mM MES (pH 5,7) und 20 µM Acetosyringon zugegeben. Die verdünnte Kultur wurde über Nacht bei 28 °C und 220 rpm inkubiert. Die *Agrobacterium*-Zellen wurden geerntet (Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 4000 x g) und in Infiltrationsmedium resuspendiert (10 oder 20 ml Gesamtvolumen) und auf eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 1 eingestellt. Der Infiltrationsansatz wurde für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Agrobakterien wurden mittels Vakuum oder Zahnstocher in vier bis maximal sechs Wochen alte Tomatenpflanzen (*S. habrochaites* und *S. lycopersicum*, siehe 4.1.1.) infiltriert. Für die Zahnstocher-Methode wurden direkt vor Infiltration pro Konstrukt 1 ml des Infiltrationsansatzes bei 3500 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen Tropfen verworfen und das Zellpellet in dem restlichen Infiltrationsmedium resuspendiert. Ein Zahnstocher wurde in die Zellsuspension eingetaucht bis sich die Spitze vollgesogen hatte. Anschließend wurde mit dem Zahnstocher drei- bis viermal in die Sprossachse direkt oberhalb der Erde eingestochen. Für die Vakuuminfiltration wurden die Pflanzen aus der Erde entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Wurzeln intakt blieben. Die Pflanzen wurden bis auf die Wurzeln in 20 ml Infiltrationsansatz getaucht, mehrmals (dreimal oder sechsmal) ein Vakuum von 1 min angelegt und in Töpfe eingepflanzt. Die Pflanzen wurden über die erste Nacht nach Infiltration abgedeckt und für 10 bis 30 Tage inkubiert.

4.2.15. Lichtmikroskopie

Zwei bis vier Wochen nach Infiltration wurden pro infiltrierter *Solanum lycopersicum* Pflanze bis zu drei Blätter geerntet und mit Auflicht mikroskopiert. Zur morphologischen Analyse wurden die Trichome mit Durchlichtmikroskopie betrachtet. Zur Bestimmung des Trichom-Scores wurden Aufnahmen von zehn Trichomen je untersuchten Blatt mit einem hohen Kontrast zwischen den Trichomen und dem Blatthintergrund erstellt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie

wurden die Blätter der YFP-exprimierenden *S. lycopersicum* Tomatenlinie auf *yfp*-Fluoreszenz untersucht. Für sämtliche lichtmikroskopische Aufnahmen wurde das Nikon AZ100 Multizoom Mikroskop mit der *NIS-Elements* Software verwendet.

4.2.16. Bestimmung des Trichom-Scores

Der Trichom-Score wurde genutzt um eine Abweichung der Trichom-Form nach VIGS im Vergleich zur nicht infiltrierten Pflanze festzustellen. Sowohl die wilde Tomate *Solanum habrochaites* (LA1777) und als auch die kultivierte Tomate *Solanum lycopersicum* (LA4024) bilden glanduläre Typ VI Trichome aus. Allerdings unterscheiden sie sich in der Form ihrer Köpfe. Bei LA1777 erscheinen die vier sekretorischen Zellen wie eine Kugel, während bei LA4024 sie die Form eines Kleeblatts bilden (siehe Abb. 1d). Durch die Bestimmung des Trichom-Scores kann ermittelt werden, welcher Form ein Trichom-Kopf ähnelt. Ein Trichom-Score von ungefähr 0,95 weisen die Trichome der wilden Tomate auf, wobei ein Trichom-Score von 1 einem perfekten Kreisquerschnitt entsprechen würde. Im Bereich von 0,75 bis 0,8 liegen Trichome der kultivierten Tomate und Hybride weisen ungefähr einen Trichom-Score von 0,9 auf (siehe Abb.3). Zur Berechnung des Trichom-Scores müssen die Längen der grünen Strecken a_1 und a_2 und der roten Diagonalen b_1 und b_2 gemessen (siehe Abb. 2) und in folgende Formel eingesetzt werden (Stefan Bennewitz, unveröffentlicht):

$$\text{Trichom - Score} = \frac{(a_1 + a_2)}{(b_1 + b_2)} \quad (\text{II})$$

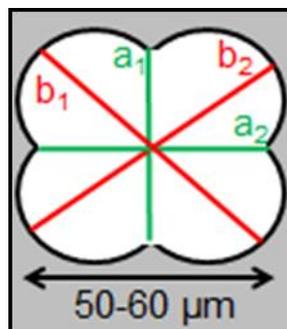


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Trichoms der kultivierten Tomate *S. lycopersicum* (LA4024) und der Parameter a_1 und a_2 in grün, b_1 und b_2 in rot zur Bestimmung des Trichom-Scores (Stefan Bennewitz, unveröffentlicht).

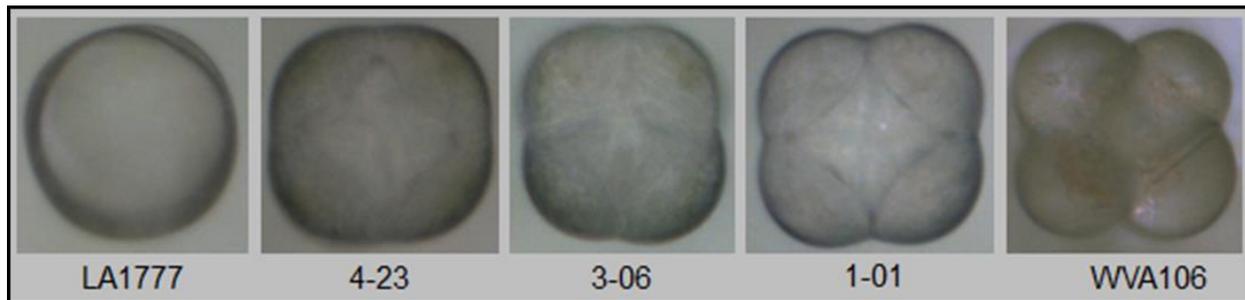


Abb. 3: Vergleichende Darstellung von Typ VI Trichom-Köpfe von Tomate. Ganz links ein Trichom-Kopf der wilden Tomate *S. habrochaites* und ganz rechts ein Trichom-Kopf der kultivierten Tomate *S. lycopersicum*. Die mittleren drei Abbildungen zeigen Trichom-Köpfe von Tomaten einer Rückkreuzungspopulation (Stefan Bennewitz, unveröffentlicht).

4.2.17. qRT-PCR

Es wurden genspezifische Primer mit einer Länge von 18 bis 24 bp und einer Amplikonlänge von 70 bis 150 bp entworfen (siehe Tab. 9). Danach wurde eine qRT-PCR mit cDNA der kultivierten Tomate *Solanum lycopersicum* und den Primerpaaren durchgeführt um eine hohe Primer-Effizienz sicherzustellen. Nach Abschluss der Reaktion wurde eine Gelelektrophorese der einzelnen Reaktionsansätze der jeweiligen Primerpaare mit einem 2,5%-igen Agarosegel durchgeführt (siehe 4.2.11.). Die qRT-PCR erfolgte in einem 96 well Format mit dem CFX ConnectTM Real-Time PCR Detection System von Bio-Rad. Von jeder zu analysierenden Probe wurde die Reaktion im Triplikate durchgeführt. Hierzu wurden in einem Reaktionsansatz 2 µl 5x QPCR Mix EvaGreen[®] (no Rox) von Bio&Sell, 200nM Primer (forward und reverse), 10 ng/µl cDNA gemischt und auf 10 µl mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 15 min für 95 °C wurden 40 Zyklen mit 15 s bei 95 °C, 20 s bei 60 °C und 20 s bei 72 °C durchgeführt. Anschließend wurde eine Schmelzkurve bei 60 bis 95 °C in 0,5 °C Schritten vorgenommen um die Entstehung eines einzelnen Produkts zu bestätigen. Durch die *Fluidigm Real Time PCR Analysis* Software wurden mittels der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak und Smittgen 2001) die Expressionslevel der Zielgene normalisiert zum Referenzgen Actin ermittelt. Hierzu wurde die Differenz des ΔC_t -Wertes der Probe und des ΔC_t -Wertes der Kontrolle berechnet. Als Probe wurde cDNA von Blättern der agroinfiltrierten Tomate verwendet und als Kontrolle cDNA von Blättern nicht-infiltrierter Tomatenpflanzen. Die weitere Berechnung erfolgte, wie in Formel I dargestellt.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{Kontrolle})} \quad (I)$$

4.2.18. Statistische Analyse

Unter Verwendung von *Microsoft Excel 2010* wurde ein zweiseitiger t-Test auf die in 4.2.16. und 4.2.17. ermittelten Datensätze angewandt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Stichproben aus Grundgesamtheiten mit gleicher Varianz entstammen. Die Unterschiede in den Mittelwerten zweier Datensätze waren signifikant für p-Werte unter 0,05; sehr signifikant für $p \leq 0,01$ und hoch signifikant für $p \leq 0,001$.

5. Ergebnisse

5.1. VIGS in einer *yfp*-Expressionslinie von *Solanum lycopersicum*

VIGS führt abhängig von dem stillgelegten Gen nicht immer zu einem veränderten Phänotyp der infiltrierten Pflanze. Da das Silencing nicht über die komplette Pflanze oder auch nur ganze einzelne Blätter erfolgt, kann man oftmals die Blattbereiche mit stillgelegten Genen nicht bestimmen. Daher empfiehlt es sich gleichzeitig das Zielgen und ein Markergen für VIGS einzusetzen. Für die nachfolgenden Untersuchungen zum Silencing trichom-spezifischer Gene wurden transgene Tomatenpflanzen von *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker) verwendet, die YFP in den Typ VI Trichomen bilden. Unter dem Mikroskop kann man nach vollständigem Silencing von *yfp* keine Fluoreszenz mehr in den Trichomen erkennen. Um ein deutliches *yfp*-Silencing zu erreichen, wurden nur Tomatenpflanzen mit einer starken YFP-Fluoreszenz aller Typ VI Trichome für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet. Ähnliche Forschungen wurden bereits mit TRV-GFP-Konstrukten in verschiedenen Pflanzenarten durchgeführt (Quadrana et al. 2011, Ratcliff et al. 2001, Tian et al. 2014). Zur einfachen optischen Kontrolle ohne weitere Hilfsmittel wurde stets gleichzeitig VIGS mit den kodierenden Genen für die Enzyme HDR und PDS durchgeführt. Die Stilllegung dieser Gene führt zu einer gut erkennbaren Veränderung im Erscheinungsbild der getesteten Pflanzen. Bei HDR handelt es sich um ein Enzym des MEP-Stoffwechselweges. Es katalysiert die Bildung von IPP und DMAPP aus HMBPP. Aus IPP und DMAPP entstehen die Carotinoide, welche essentielle Komponenten der Photosynthesevorgänge in Pflanzen sind. Werden keine Carotinoide gebildet, führt dies zur Zerstörung von Chlorophyll durch Photooxidation. Dies resultiert in einem Ausbleichen des grünen Gewebes der Pflanzen (Arias et al. 2006, Becker und Lange 2010). Bei PDS handelt es sich um ein Enzym des Carotinoid-Biosynthesewegs, das Phytoen in ζ -Carotin umwandelt und schon häufig für VIGS verwendet wurde (Becker und Lange 2010, Burch-Smith et al. 2004, Fragkostefanakis et al. 2014, Liu et al. 2002). Nach dem Silencing des PDS kodierenden Gens werden ebenfalls keine Carotinoide in der Pflanze gebildet. (Qin et al. 2007). Im Gegensatz zu HDR und PDS liegt der Vorteil des Silencing von *yfp* in der geringen Beeinflussung der Stoffwechselwege der Pflanze. Veränderungen des Metabolismus bei gleichzeitigem VIGS von *yfp* und einem trichom-spezifischen Gen können so auf das Silencing des Zielgens zurückgeführt werden.

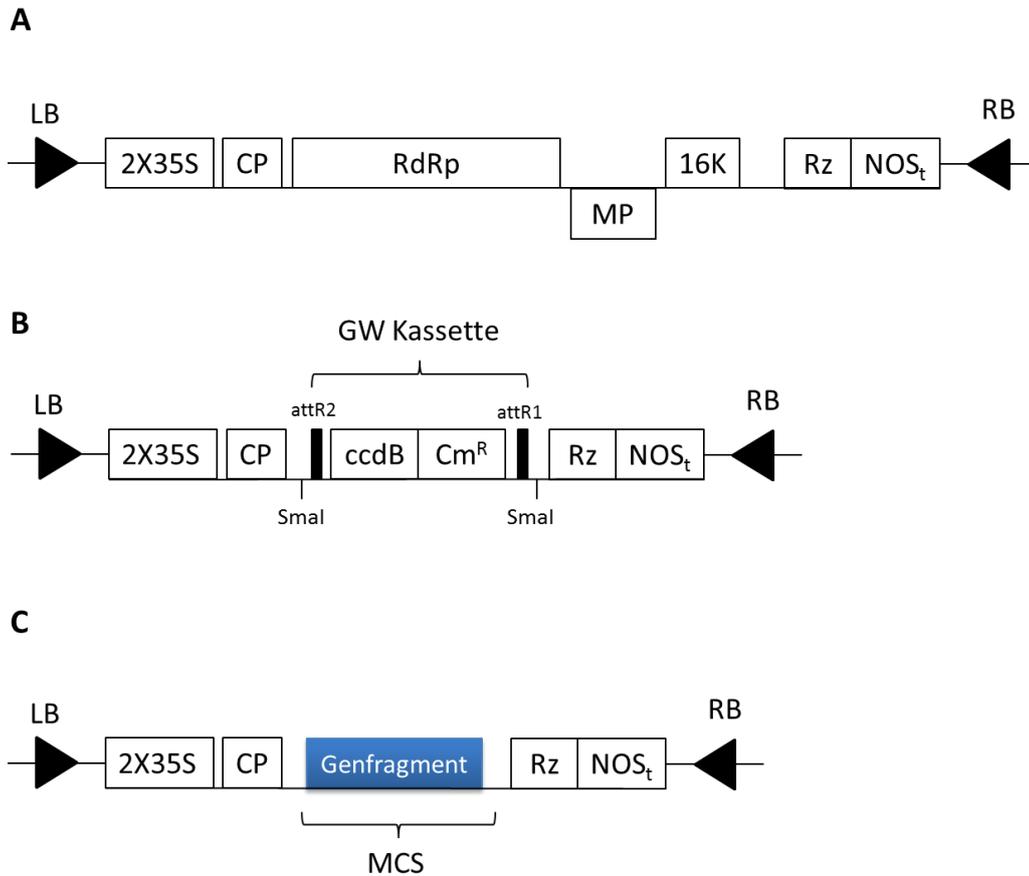


Abb. 4: TRV-Vektorkonstrukte für Agroinfiltration in Tomate. **A.** pTRV1. **B.** pTRV2-GW (gateway-kompatibler TRV-Vektor). **C.** pTRV2-GW mit einem Fragment eines Kontrollgens als Insert anstelle der Gateway Kasette (GW Kasette)

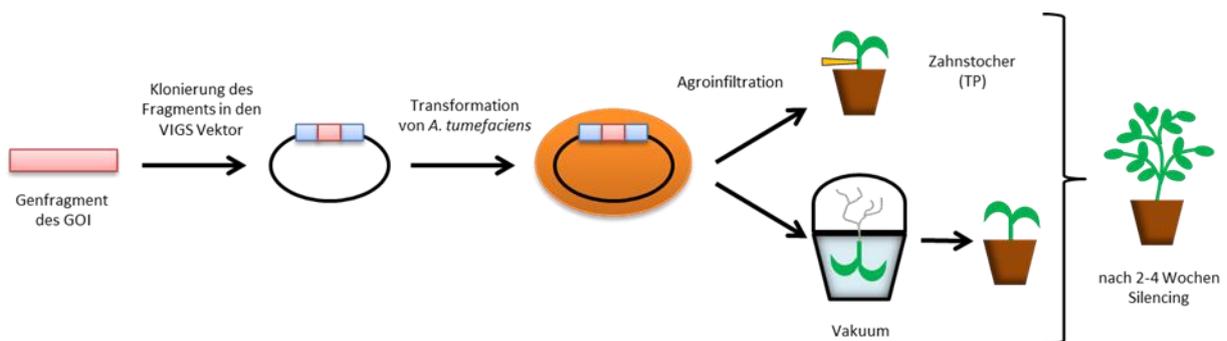


Abb. 5: Die einzelnen Schritte des TRV-vermittelten VIGS in *S. lycopersicum*. Das Genfragment eines Gens mit bekannter Sequenz wird selektiert und in pTRV2-GW kloniert. Die klonierten Plasmide und pTRV1 werden jeweils einzeln in *A. tumefaciens* transformiert und zusammen in die Pflanzen infiltriert. Die Agroinfiltration mittels Zahnstocher und Vakuum wird dargestellt.

Deshalb wurde zur Überprüfung ob ein Co-Silencing von zwei Genen auf unterschiedlichen Vektoren in *S. lycopersicum* möglich ist, bereits vor Anfertigung dieser Arbeit entsprechende TRV-Vektorkonstrukte mit Fragmenten der für YFP- und HDR-kodierenden Gene erstellt. TRV

besitzt ein zweiteiliges Genom, das für VIGS auf zwei Vektoren (pTRV1 und pTRV2) aufgeteilt wird. TRV-cDNA Klone werden normalerweise zwischen einem duplizierten CaMV 35S Promotor (2X35S) und einem Nopalinsynthase Terminator (NOS_I) in einem T-DNA Vektor platziert. pTRV1 (pAGT1917, erhalten von Cathie Martin vom John Innes Center, UK) besteht des Weiteren aus einem Kapsid-Protein (CP), einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp), einem Movement-Protein (MP), einem 16 kDa großen cystein-reichen Protein und einem selbstspaltenden Ribozym (Rz). Die bereits klonierten pTRV2-GW-Konstrukte (pAGT1848, pAGT1849 und pAGT2374 von Stefan Bennewitz und Franziska Pröhl) beinhalten anstelle der Gateway Kasette (GW Kasette) in der MCS stets ein Fragment des gewählten Gens (siehe Abb. 4 und Abb. A1). Für das Co-Silencing von *hdr* und *yfp* wurden anschließend Agrobakterien mit jeweils einem der beiden Plasmide (pAGT1848 für HDR und pAGT1849 für YFP) transformiert und zusammen mit pTRV1 transformierten Agrobakterien in die Pflanzen mit zwei unterschiedlichen Methoden infiltriert. Die Agroinfiltration wurde mittels Zahnstocher mit OD₆₀₀ = 1 der Agrobakterienkultur, als auch durch Anlegen eines Vakuums in einem Exsikkator von Typ DN200 (fortan als großer Exsikkator bezeichnet) mit OD₆₀₀ = 0,25 durchgeführt (siehe 2.2.1 und Abb. 5). Je Infiltrationsmethode und Ansatz wurden zwei bis drei Pflanzen verwendet und nach 2 Wochen untersucht. Alle Pflanzen zeigten im Vergleich zu nicht behandelten Pflanzen ein verlangsamtes Wachstum. Die Hälfte wies ein Ausbleichen der Blätter auf und die Trichome derselben Blätter zeigten YFP-Fluoreszenz. Die untersuchten Blätter der anderen Hälfte der Pflanzen zeigten keine oder zumindest teilweise keine YFP-Fluoreszenz, aber auch die Blätter blieben grün. Zur Kontrolle wurden Pflanzen mit dem Zahnstocher nur unter Einsatz von pTRV1 infiltriert. Sie zeigten dasselbe verlangsamte Wachstum, wie alle anderen infiltrierten Pflanzen. Als zweite Kontrolle wurde mittels Vakuuminfiltration nur mit den mit pAGT1848 transformierten Agrobakterien ohne pTRV1 infiltriert. Es war keine Veränderung in dem Aussehen oder der Größe im Vergleich zu nicht infiltrierten Pflanzen erkennbar. Des Weiteren wurde ermittelt, ob ein effektives VIGS unter Verwendung von einem der Konstrukte zusammen mit pTRV1 möglich ist. Gleichzeitig wurden hierbei unterschiedliche Parameter, wie verschiedene optische Dichten der Agrobakteriensuspension und wie oft hintereinander ein Vakuum aufrechterhalten wurde (3x1 min, 6x1 min), getestet. Ziel war es die Vakuuminfiltration zu verbessern und die Bedingungen mit den optimalen Ergebnissen zu bestimmen. Wurde VIGS mit pAGT1848 (YFP) durchgeführt, konnte bei beiden Infiltrationsmethoden nach einer Inkubation von zwei Wochen dasselbe Ergebnis erzielt werden. Unter dem Mikroskop wiesen die Trichome in bestimmten Bereichen eines Blattes keine YFP-Fluoreszenz auf. Es waren auch Blätter zu finden über deren gesamte Blattfläche verteilt Trichome sowohl mit als

auch ohne Fluoreszenz zu sehen waren. Auch bei der Verwendung von pAGT1849 (HDR) und pAGT2374 (PDS) zeigten einzelne Blätter teilweise oder komplett eine Farbänderung der Blätter zu hellgrün oder weiß unabhängig von der verwendeten Infiltrationsmethode. Es wurde eine optische Dichte von 0,1; 0,25; 0,5 der Agrobakterien-Suspension unter Verwendung des großen Exsikkators und eines Exsikkators von DN100 (fortan als kleiner Exsikkator bezeichnet) getestet. Die unterschiedlichen optischen Dichten führten zu keiner Änderung im Verblässen der Blätter (siehe Abb. A2). Weder waren größere helle Flächen zu sehen, noch waren diese Gebiete stärker gebleicht. Jedoch konnte in dem kleinen Exsikkator im Gegensatz zum großen Exsikkator ein Vakuum in kürzerer Zeit erzeugt und meist sämtliche Blätter vollständig infiltriert werden. Alle Vakuum-infiltrierten Pflanzen wiesen nach zwei bis drei Wochen und die Zahnstocher-infiltrierten Pflanzen nach vier Wochen einen sichtbar veränderten Phänotyp auf. Einige der Vakuum-infiltrierten Pflanzen zeigten nach zwei Inkubation eindeutigen Zwergwuchs. Sie waren wesentlich kleiner als die restlichen behandelten Pflanzen, die ohnehin ein verlangsamtes Wachstum zeigten (siehe Abb. A2 und Abb. A3). Daher wurden alle nachfolgenden VIGS-Untersuchungen mit der Zahnstocher-Methode durchgeführt.

Nachdem das Co-Silencing von *hdr* und *yfp* nicht erfolgreich war, wurden neue pTRV2-GW-Konstrukte entworfen um ein gleichzeitiges Silencing von *yfp* und einem trichom-spezifischen Zielgen zu gewährleisten. Diese wurden mit jeweils einem Fragment von drei verschiedenen trichom-spezifischen Zielgenen und einem *yfp*-Fragment mittels des Gateway-Systems kloniert. Die Einzelheiten des Klonierungsverfahrens können 2.2.11. entnommen werden. Bei den getesteten Genen handelt es sich um Solyc01g109120 (WD-40 Wiederholungsprotein), Solyc01g104550 (WRKY Transkriptionsfaktor 32) und Solyc01g105870 ((E)- β -Ocimen Synthase) (siehe Abb. A1). Als Kontrollen wurden Fragmente der kodierenden Gene für HDR und PDS auf dieselbe Weise wie die trichom-spezifischen Genfragmente zusammen mit dem Genfragment von YFP in pTRV2-GW-Vektoren kloniert (siehe Abb. A1).

Diese klonierten Konstrukte wurden jeweils zusammen mit pTRV1 in die Tomatenpflanzen der *yfp*-Expressionslinie agroinfiltriert. Von sämtlichen Pflanzen wurden anschließend Blattproben entnommen und unter dem Mikroskop auf YFP-Fluoreszenz untersucht. Die Blätter, der mit pAGT2240 (WRKY Transkriptionsfaktor 32) und pAGT2242 ((E)- β -Ocimen Synthase) infiltrierten Pflanzen wiesen eine deutliche Abnahme der YFP-Fluoreszenz in den Typ VI Trichom-Köpfen vier Wochen nach Behandlung auf. Auf einigen Blättern konnten kaum noch Trichom-Köpfe mit YFP-Fluoreszenz detektiert werden (siehe Abb. 6). Dagegen zeigten sämtliche mit pAGT2238 (WD-40 Wiederholungsprotein) infiltrierten Tomatenpflanzen nach

Infiltration immer noch ein deutliches YFP-Fluoreszenz-Signal (siehe Abb. 6F). Bei VIGS-Untersuchungen mit angestrebtem Silencing der beiden Kontrollen *pds* und *yfp* durch pAGT2477 erhält man Pflanzen mit einigen schwach ausgebleichten Blättern, die in den hellen Bereichen keine YFP-Fluoreszenz mehr aufweisen. In den grünen Bereichen derselben Blätter kann eine deutliche Verringerung der YFP-Fluoreszenz festgestellt werden. Nach Agroinfiltration mit pAGT2479 konnte kein gemeinsames Silencing von *hdr* und *yfp* festgestellt werden. Zwar waren konnten Blätter mit helleren Bereichen gefunden werden, allerdings zeigten diese immer noch YFP-Fluoreszenz. Somit konnte nicht mit allen klonierten Plasmiden ein komplettes oder teilweises Silencing von *yfp* erreicht werden.

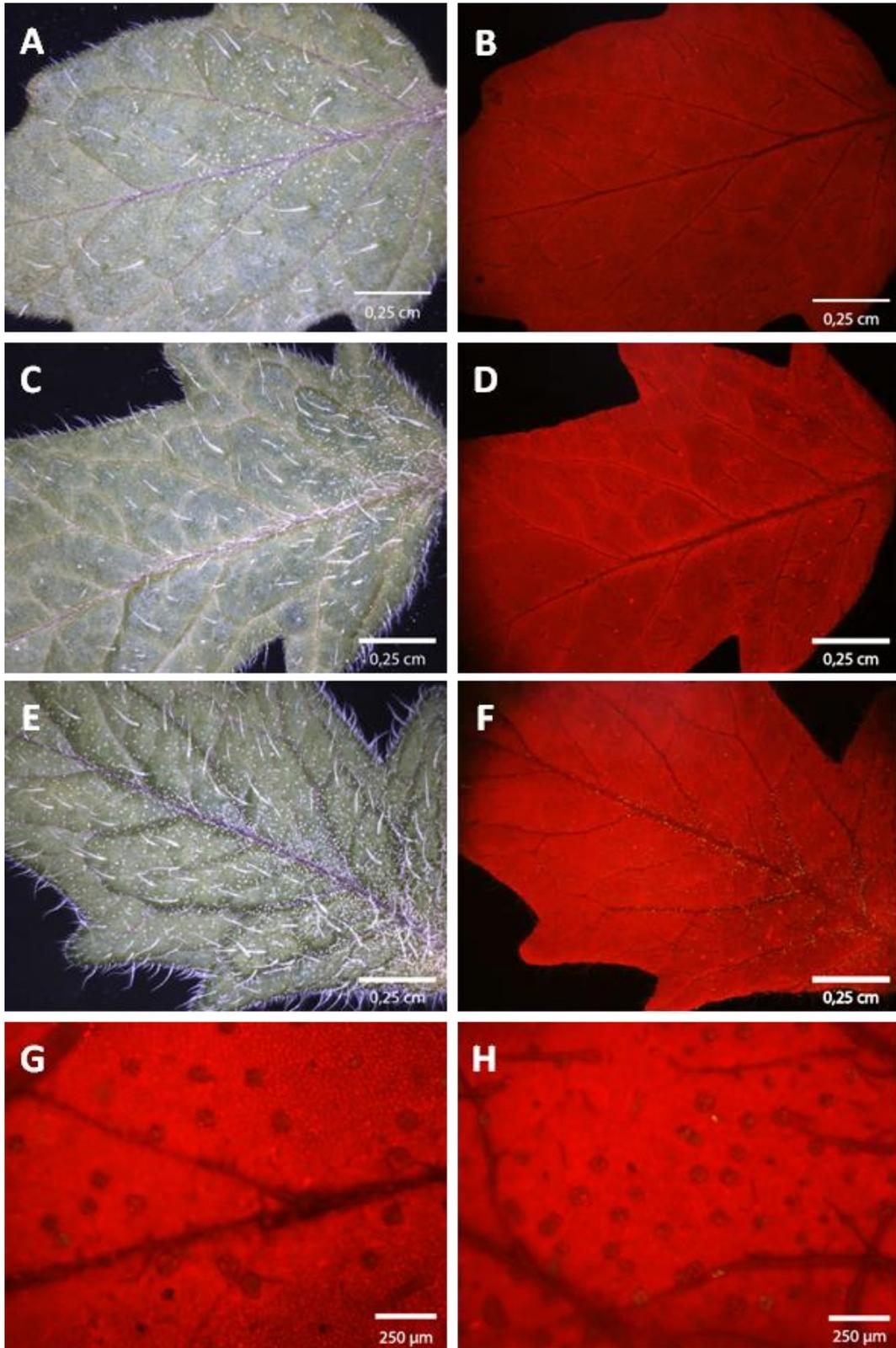


Abb. 6: Mikroskopie-Aufnahmen agroinfiltrierter Blätter vier Wochen nach Behandlung. **A.** Blatt infiltriert mit pTRV1 und pAGT2240 (WRKY Transkriptionsfaktor 32). **B.** Blatt A, YFP-Fluoreszenz Kanal. **C.** Blatt infiltriert mit pTRV1 und pAGT2242 ((E)- β -Ocimen Synthase). **D.** Blatt C, YFP-Fluoreszenz Kanal. **E.** Blatt infiltriert mit pTRV1 und pAGT2238 (WD-40 Wiederholungsprotein). **F.** Blatt E, YFP-Fluoreszenz Kanal. **G.** Blatt A, YFP-Fluoreszenz Kanal, vergrößert. **H.** Blatt C, YFP-Fluoreszenz Kanal, vergrößert.

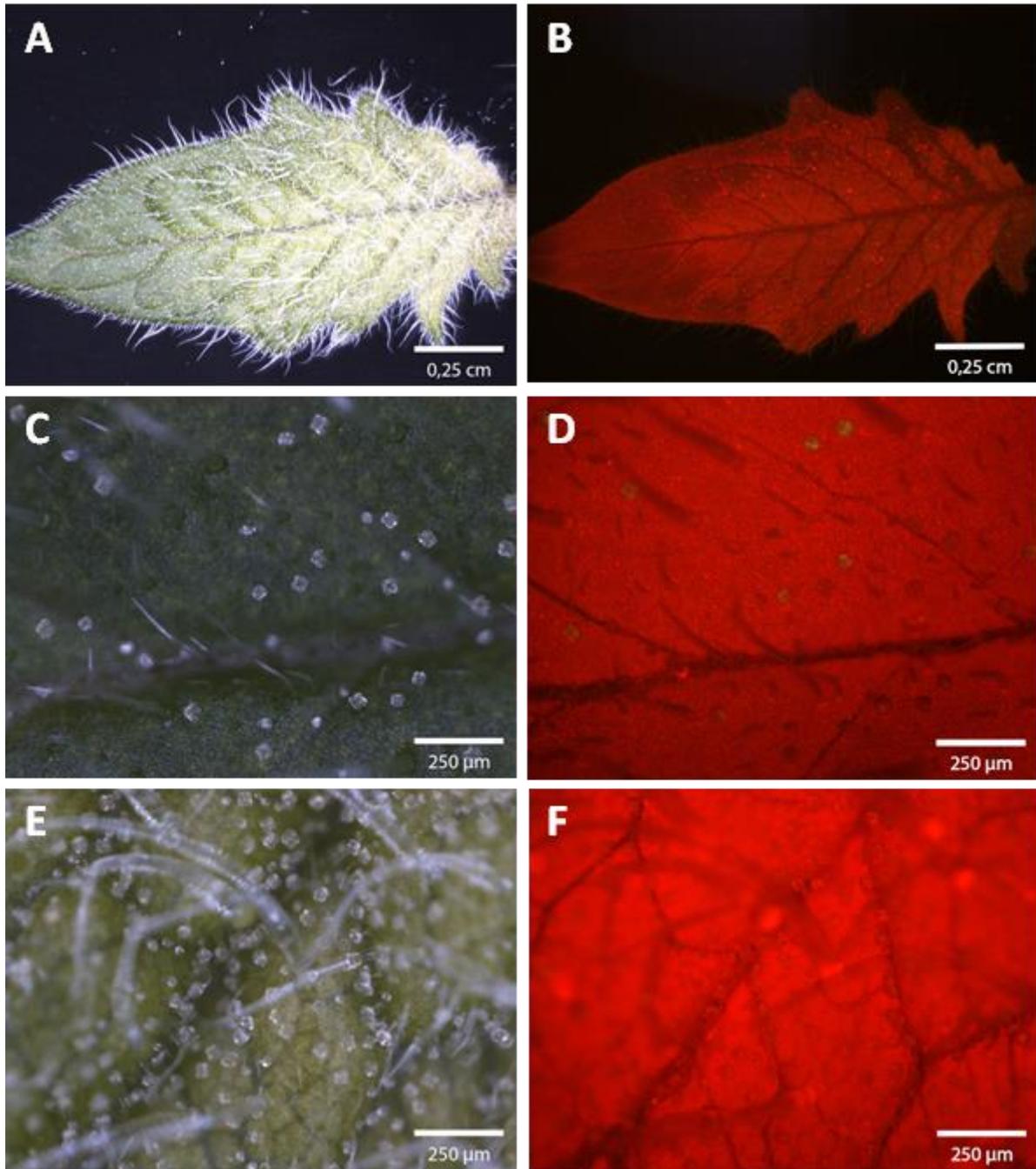


Abb. 7: Mikroskopie-Aufnahmen eines mit pAGT2377 infiltrierten Blattes vier Wochen nach der Behandlung. **A.** Phänotyp erzielt durch Silencing von *pds*. **B.** Phänotyp erzielt durch Silencing von *yfp*, YFP-Fluoreszenz Kanal. **C.** grüner Bereich des infiltrierten Blattes, vergrößert. **D.** grüner Bereich des infiltrierten Blattes, YFP-Fluoreszenz Kanal. **E.** gebleichter Bereich des infiltrierten Blattes, vergrößert. **F.** gebleichter Bereich des infiltrierten Blattes, YFP-Fluoreszenz Kanal, vergrößert.

5.2. VIGS in einer *Del/Ros1*-Expressionslinie von *S. lycopersicum*

Die ausgewählten trichom-spezifischen Gene sollten außer in der *yfp*-Expressionslinie von *S. lycopersicum* in einer weiteren Tomatenlinie durch VIGS stillgelegt werden. Die Silencing-Ergebnisse sollten miteinander verglichen werden um das effektivere System für VIGS eines trichom-spezifischen Gens und eines Markergens auf einem TRV-Vektor zu bestimmen. Hierzu wurde eine *Del/Ros1*-Expressionslinie von *S. lycopersicum* (cv. Micro Tom) gewählt. Delila (Del) und Rosea1 (Ros1) sind Transkriptionsfaktoren des Großen Löwenmauls (*Antirrhinum majus*), die miteinander kombiniert die Anthocyan-Bildung induzieren. Anthocyane sind flavonoide Anti-Oxidantien und Tomatenlinien mit erhöhter Anthocyan-Produktion sind daher für die Wissenschaft von Interesse. Die Expression von *Del/Ros1* führt in der verwendeten Tomatenlinie (IPB-GVO#8511) zu einer violetten Pflanze. Durch VIGS von *Del/Ros1* findet ein Verlust der violetten Farbe in den Bereichen des Silencings statt, sodass die Pflanze in den entsprechenden Gebieten wieder grün gefärbte Blätter aufweist. Zur Untersuchung der trichom-spezifischen Gene sollte in pTRV2-DR-GW jeweils ein Genfragment über das Gateway-System kloniert werden (siehe 4.2.11.). pTRV2-DR-GW ist ein gateway-kompatibler pTRV2-Vektor, der als zusätzliches Insert in der MCS Genfragmente von *Del/Ros1* enthält (siehe Abb. A4). Aufgrund von Zeitmangel konnten diese VIGS-Vektorkonstrukte nicht vollständig erstellt werden. Es konnten nur Vektoren mit Fragmenten der Gene Solyc01g104550 (WRKY Transkriptionsfaktor 32) und Solyc12g099260 (ATP Citrat Lyase α -Untereinheit) kloniert werden. Die erhaltenen Plasmide wurden zusammen mit pTRV2-DR (pAGT1918) und pTRV2-GW-DR (pAGT1919) mit *A. tumefaciens* transformiert und Agroinfiltration jeweils zusammen mit pTRV1 mit der Zahnstocher-Methode durchgeführt. Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, konnten *Del/Ros1* mit pAGT1918 und pAGT1919 erfolgreich stillgelegt werden. Auch mit pAGT2359 (ATP Citrat Lyase α -Untereinheit) konnte dasselbe Ergebnis erzielt werden. Mit pAGT2239 konnte dagegen kein Silencing von *Del/Ros1* erreicht werden.



Abb. 8: Phänotypen erhalten durch VIGS von *Del/Ros1* in der *Del/Ros1* exprimierenden Tomatenlinie. **Links:** Phenotyp erzielt durch pTRV2-DR. **Rechts:** Phenotyp erzielt durch pTRV2-GW-DR.

5.3. VIGS in der wilden Tomate *Solanum habrochaites*

Bereits vor dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass VIGS mittels Vakuum-Infiltration in der wilden Tomate in *S. habrochaites* (LA1777) zur Nekrose der infiltrierten Blätter bis zum Absterben der ganzen Pflanze führt (nach Franziska Pröhl, unveröffentlicht). Es wurden daher weitere Pflanzen mit der Zahnstocher-Methode infiltriert. Die verwendete Agrobakterien-Suspension wies eine OD₆₀₀ von eins auf und beinhaltete mit pAGT2374 (PDS) und pTRV1 transformierte Agrobakterien. Nach zwei bis vier Wochen Inkubationszeit konnten jedoch keine ausgebleichten Blätter oder ein gehemmtes Wachstum detektiert werden. Es wurde daher keine VIGS-Versuche der trichom-spezifischen Gene in *S. habrochaites* unternommen.

5.4. Veränderung der Form von Typ VI Trichomen durch VIGS trichom-spezifischer Gene

Durch ein VIGS kann eine Veränderung der Trichom-Form auftreten, wenn die stillgelegten trichom-spezifischen Gene einen Einfluss auf die Entwicklung oder Struktur der Trichome haben. Bereits vor dieser Arbeit wurde die in Abschnitt 4.2.16. beschriebene Berechnungsmethode für die Form von glandulären Typ VI Trichomen von Tomate entwickelt. Ziel einer solchen Berechnung war es, die Form eines Typ VI Trichom-Kopfs der kultivierten oder wilden Tomate zuzuordnen um dadurch bei rückgekreuzten Tomatenpflanzen einen Rückschluss über den jeweiligen genetischen Hintergrund für die Trichom-Bildung der Pflanze ziehen zu können. Zur Feststellung, ob die Zielgene einen Einfluss auf die Trichom-Form haben, wurden unter dem Mikroskop Trichome von Blattbereichen mit optischen Anzeichen von VIGS untersucht. Hierzu wurden vier Wochen nach Agroinfiltration von drei infiltrierten, kultivierten Tomatenpflanzen (LA4024) der *yfp*-Expressionslinie jeweils drei neu gebildete Blätter betrachtet und Trichome mit einer gleichmäßigen Form ausgewählt. Der Trichom-Score wurde von mindestens zehn Trichomen pro TRV-Konstrukt und zum Vergleich von Trichomen der wilden (LA1777) und kultivierten (LA4024) Tomate ermittelt. Anhand der in Abb. 9 dargestellten Mittelwerte der Trichom-Scores lässt sich erkennen, dass sich die Form der Trichom-Köpfe nach einem VIGS der gewählten Gene in Gegenüberstellung mit den Trichom-Köpfen der nicht infiltrierten kultivierten Tomate nicht verändert.

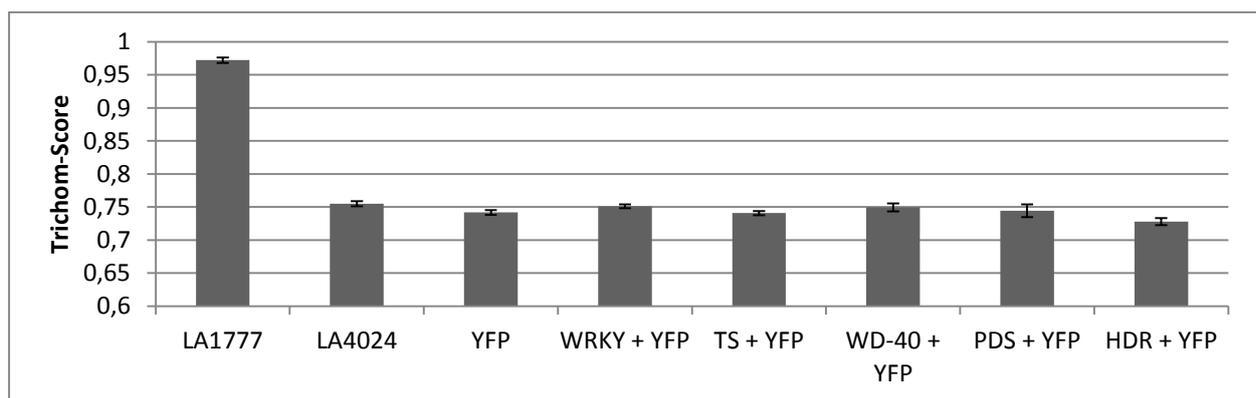


Abb. 9: Graphische Darstellung des Trichom-Scores der wilden Tomate *S. habrochaites* (LA1777), der kultivierten Tomate *S. lycopersicum* (LA4024) und der *yfp*-Expressionslinie von *S. lycopersicum* nach VIGS von *yfp* und den trichom-spezifischen Genen für WRKY Transkriptionsfaktor 32 (WRKY), (E)- β -Ocimen Synthase (TS), WD-40 Wiederholungsprotein (WD-40) oder den kodierenden Genen für PDS und HDR. Jede Säule stellt den Mittelwert des Trichom-Scores (n=10) und die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardfehler.

5.5. Relative Quantifizierung durch qRT-PCR

Es wurde eine quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) zur Bestimmung des Grades der Stilllegung der trichom-spezifischen Gene durch VIGS mit den klonierten pTRV2-Vektoren durchgeführt. Bei der qRT-PCR handelt es sich um eine Amplifizierungsmethode für Nucleinsäuren auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, die zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA möglich macht. Verwendet wurde der DNA-bindende Farbstoff EvaGreen[®] dessen Fluoreszenz-Signal proportional zur Menge der DNA zunimmt. Zur relativen Quantifizierung der Zielgene wurde als endogenes Referenzgen Actin herangezogen. Durch die Verwendung eines Referenzgens sollen mögliche Variationen während der Probenvorbereitung, RNA-Isolation (Qualität und Quantität) und der PCR-Reaktion normalisiert werden. Man erhält Veränderungen in der Transkriptmenge eines Gens in mehreren Proben relativ zum Referenzgen. Durch die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wurden die Genexpressionslevel normalisiert zum Referenzgen Actin (siehe 4.2.15.) und der Signifikanzwert mittels t-Test ermittelt. Dafür wurde angenommen, dass die Amplifikationseffizienz des Zielgens und des endogenen Referenzgens Actin ungefähr gleich ist. Wie man Abbildung 10 entnehmen kann, waren die Expressionslevel der Gene für PDS und HDR relativ zu Actin in den mit pAGT2374 (PDS) und pAGT1849 (HDR) infiltrierten Blattproben von *S. lycopersicum* deutlich geringer im Vergleich zu den nicht infiltrierten Kontrollen.

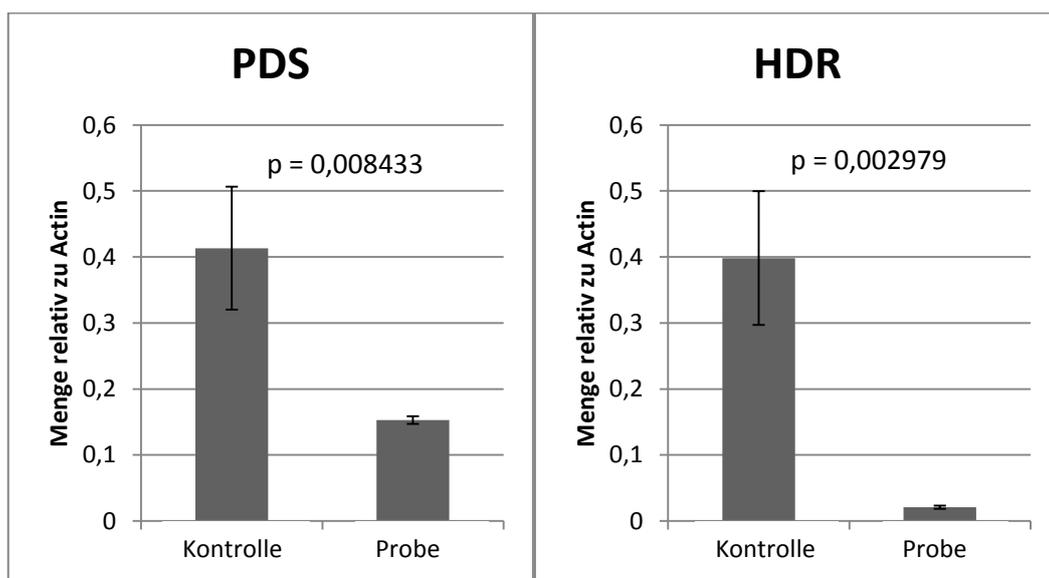


Abb. 10: Darstellung der Expressionslevel von *pds* und *hdr* relativ zum Referenzgen Actin in den nicht infiltrierten Kontrollen und in den mit pAGT2374 und pAGT1849 infiltrierten Proben.

Zu den Expressionslevel der trichom-spezifischen Gene können leider keine Aussagen getroffen werden. Da kein Silencing von *yfp* durch pAGT2238 in den agroinfiltrierten Pflanzen erreicht werden konnte wurde angenommen, dass das gewählte WD-40 Wiederholungsprotein ebenfalls nicht stillgelegt wurde. Aus diesem Grund wurde mit den entsprechenden Proben keine qRT-PCR durchgeführt. Aus den cDNA-Proben der mit pAGT2242 ((E)- β -Ocimen Synthase) infiltrierten Blätter konnte kein Produkt unter Verwendung der (E)- β -Ocimen Synthase-spezifischen Primer amplifiziert werden. Aus den cDNA-Proben der mit pAGT2240 (WRKY Transkriptionsfaktor 32) infiltrierten Blätter konnte dagegen ein Produkt mit den genspezifischen Primern amplifiziert werden. Allerdings weisen die Genexpressionslevel von WRKY Transkriptionsfaktor 32 in den Proben im Vergleich zu den Kontrollen keinen wesentlichen Unterschied auf (siehe Abb. 11). Die Expressionslevel von *yfp* relativ zum Referenzgen Actin waren nach dem VIGS dagegen höher als in den Kontrollen. Die p-Werte zeigen, dass die ermittelten Ergebnisse statistisch nicht signifikant sind (siehe Abb. 11, Abb. A5 und Abb. A6).

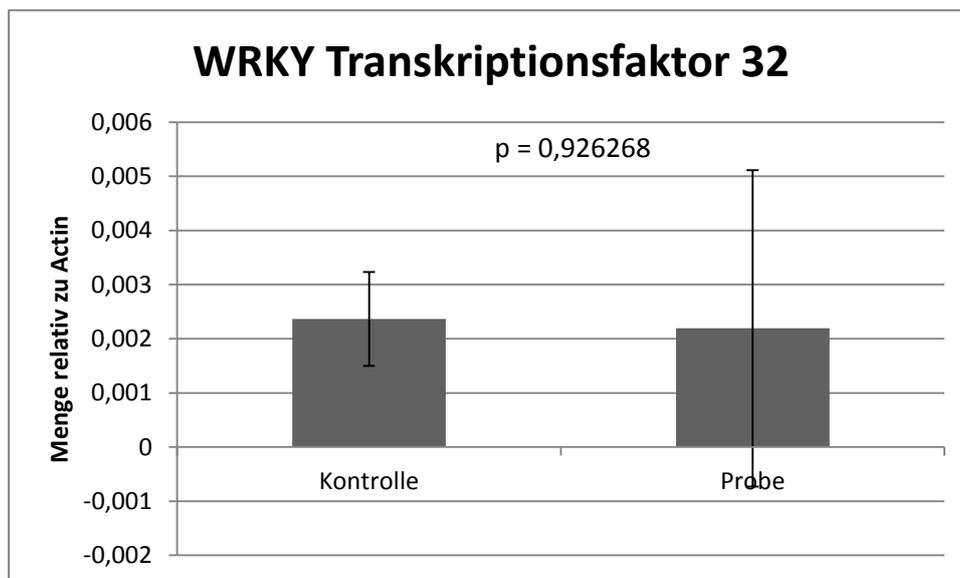


Abb. 11: Darstellung der Expressionslevel des kodierenden Gens des WRKY Transkriptionsfaktors 32 relativ zum Referenzgen Actin in den nicht infiltrierten Kontrollen und in den mit pAGT2240 infiltrierten Proben.

6. Diskussion

Zur Etablierung des VIGS-Systems in Tomate zum Silencing trichom-spezifischer Gene wurden zwei Agroinfiltrationsmethoden für Tomate an *S. lycopersicum* getestet mit dem Ziel die geeignetere Methode zu finden. Dazu wurden zunächst verschiedene Parameter verwendet um die optimaleren Bedingungen für die Vakuuminfiltration zu ermitteln. Unabhängig von der verwendeten optischen Dichte der Agrobakteriensuspension blieb die Stärke und Verteilung der Silencing-Symptome über die Pflanze verteilt stets gleich. Man konnte jedoch feststellen, dass durch die Verwendung des kleineren Exsikkators in größere, zusammenhängende Blattflächen die Agrobakteriensuspension eingebracht werden konnte. In dem kleineren Exsikkator ist es möglich in kürzerer Zeit ein stärkeres Vakuum aufzubauen im Vergleich zu dem großen Exsikkator, da ein kleineres Volumen evakuiert werden muss. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung einer Pumpe mit größerer Leistung, als die benutzte Wasserpumpe um die infiltrierte Blattfläche auszuweiten.

Nach Agroinfiltration konnte bei allen infiltrierten Tomatenpflanzen durch die Auswirkungen der Viren-DNA ein verlangsamtes Wachstum beobachtet werden. Zudem konnten Vakuuminfiltrierte Pflanzen mit noch stärker gehemmtem Wachstum im Vergleich zu den Zahnstocher-infiltrierte Pflanzen detektiert werden. Das Silencing von *pds* kann zu zwergwüchsigen Pflanzen führen (Qin et al. 2007). Die Stilllegung von *hdr* oder *pds* führt zur Inhibition des Carotenoid-Stoffwechselwegs, weshalb man auch von ähnlichen Auswirkungen bei dem Silencing von *hdr* ausgehen kann. Allerdings treten nach VIGS anderer Gene durch Vakuuminfiltration auch Pflanzen mit stark verlangsamtem Wachstum auf. Danach Infiltration mit dem Zahnstocher Tomatenpflanzen mit weniger gehemmtem Wachstum auftraten, lässt sich schließen, dass die infiltrierte Pflanzen durch die Vakuum-Methode größeren Stress ausgesetzt sind. Mit der Zahnstocher-Methode verteilt sich das PTGS im Vergleich zur Vakuum-Infiltration zunächst langsamer innerhalb der Pflanze aus, da sich die Agrobakteriensuspension erst durch das vaskuläre System vom Stängel zu den Blättern ausbreiten muss. Mit anderen Infiltrationsmethoden unter Einsatz von TRV wird häufig eine optimale Inkubationszeit von zwei bis drei Wochen zur Detektion der stärksten Symptome eines Gen-Silencings nach Agroinfiltration detektiert (Burch-Smith et al. 2009, Liu et al. 2002, Purkayastha und Dasgupta 2009, Unver und Budak 2009). Aber auch nach vier bis fünf Wochen kann eine Veränderung des Phänotyps der Pflanze durch VIGS beobachtet werden (Besser et al. 2009,

Burch-Smith et al. 2004). So sind erst nach vier Wochen erste Anzeichen eines veränderten Phänotyps durch das VIGS bei Zahnstocher-infiltrierten Pflanzen zu sehen. Die langsamere Ausbreitung des PTGS könnte weniger Stress für die Pflanze bedeuten und somit ein weiterer Grund sein, warum stark zwergwüchsige Tomatenpflanzen nur nach VIGS mit Vakuum-Infiltration auftraten. Bei der Vakuum-Methode wird ein größeres Volumen der Agrobakteriensuspension in die Blätter eingebracht. Aber auch die Methode an sich die Agrobakteriensuspension über ein Vakuum in die Tomatenpflanze zu infiltrieren könnte eine Rolle spielen. Um weitere Erkenntnisse hierzu zu erhalten, könnte die Vakuuminfiltration zur Kontrolle nur mit Wasser anstelle der Agrobakteriensuspension durchgeführt werden. Vergleicht man anschließend nicht infiltrierte Pflanzen mit Wasser infiltrierte und mit Agrobakteriensuspension infiltrierte Pflanzen, kann man die Auswirkungen alleine durch das Anlegen eines Vakuums besser abschätzen.

Durch VIGS nach Co-Infiltration durch pAGT1848 (HDR) und pAGT1849 (YFP) transformierten Agrobakterien in einer *yfp*-Expressionslinie von *S. lycopersicum* konnte kein Co-lokalisierendes Silencing von *hdr* und *yfp* in einer Pflanze erreicht werden. Es wurde in jeder infiltrierte Pflanze nur ein Gen ungleichmäßig über die Blattoberflächen verteilt stillgelegt. Daraus lässt sich schließen, dass kein effektives Co-Silencing zweier Gene in einer kultivierten Tomatenpflanze mittels zwei unterschiedlicher TRV-Vektor-Konstrukte möglich ist. Wurden Vektor-Konstrukte mit nur einem Genfragment als Insert einzeln eingesetzt, konnte ebenfalls nur ein ungleichmäßiges Silencing des entsprechenden Gens über die Blattoberflächen verteilt erreicht werden. PTGS agiert als Abwehrmechanismus der Pflanze, der die Virenakkumulation verhindert und direkt für die VIGS-Effizienz verantwortlich ist. Hierbei treten in der Regel Variationen der Stärke und Verteilung der Silencing-Antwort zwischen vielen verschiedenen Viren und Pflanzenarten auf. Auch können Fluktuationen zwischen Abklingen und Wiedererscheinen des Silencing-Signals eintreten bis sich eine stabile, aber relativ schwache Silencing-Antwort einstellt. Zudem haben Viren Gegenabwehrmechanismen entwickelt um PTGS zu umgehen oder zu verhindern (Plant Gene Silencing: Methods and Protocols 2015). Die komplexen Dynamiken zwischen PTGS durch die Pflanze und Gegenabwehrmechanismen der Viren könnten die Ungleichmäßigkeit der Silencing-Antwort der durchgeführten Untersuchungen erklären. Um ein großflächigeres Gensilencing in den Blättern zu erreichen, könnten auch andere Agroinfiltrationsmethoden für das VIGS in Tomate getestet werden. Eine Alternative zu den untersuchten Methoden stellt das Agrodrenching dar, wobei die Agrobakteriensuspension in die umliegende Erde pipettiert und durch die Wurzeln aufgenommen wird. Als Vorteil dieser Methode können bereits sehr junge Pflanzen ohne voll-

entwickelte Blätter infiltriert und ein effektives Silencing erzielt werden (Purkayastha und Dasgupta 2009). Da die Symptome des Gensilencings nach Agroinfiltration nur in neu entwickelten Blättern auftreten, empfiehlt es sich möglichst junge Pflanzen zu verwenden. Mit der Vakuum-Methode müssen jedoch bereits voll-entwickelte Blätter vorhanden sein, damit durch das Vakuum die Agrobakteriensuspension in entsprechendes Blattmaterial eingebracht werden kann. Um bereits kleinere Tomatenpflanzen zu infiltrieren, kann man acht Tage alte Tomatensetzlinge in eine verschlossene 60 ml Spritze gefüllt mit Agrobakteriensuspension geben. Durch Niederdrücken des Kolbens wird die die Agrobakteriensuspension in die Tomatensetzlinge gedrückt und die Setzlinge anschließend eingepflanzt (Fragkostefanakis et al. 2014). Auch mit der Zahnstocher-Methode können erst vier Wochen alte Pflanzen verwendet werden. Sie müssen einen gewissen Stängeldurchmesser aufweisen um ein Einstechen mit einem Zahnstocher ohne Zerstörung des Stängels zu ermöglichen. Um dieses Problem zu umgehen, könnte man eine Agroinfiltration mittels Spritze in das Meristem-Gewebe des Stängels oberhalb der Wurzeln durchführen. Durch die Verwendung einer Spritze mit Kanüle anstelle des Zahnstochers könnte eine wesentlich kleinere Verwundungsfläche erzeugt werden, wodurch sich der zugefügte Stress auf die Pflanze verringert und eventuell ein effektiveres Gensilencing erreicht werden kann. Durch diese Methode wurden bereits von Tomate hauptsächlich die Früchte inokuliert, jedoch von verschiedenen Arten auch andere Pflanzenbereiche (Purkayastha und Dasgupta 2009). Eine weitere Möglichkeit wäre die Wiederholung der Zahnstocher-Infiltration derselben Pflanze einige Tage nach der ersten anfänglichen Infiltration. Dadurch könnte womöglich ein Silencing in mehreren unterschiedlichen Stufen an neuentwickelten Blättern erreicht oder auch nur eine Verstärkung des Silencing-Signals erreicht werden. Die zweite Agroinfiltration sollte nur wenige Tage nach der Ersten stattfinden um eine mögliche *cross protection* auszuschließen. *Cross protection* ist eine Abwehrreaktion der Pflanze, die nach Zweitinfektion gegen den zweiten Virus resistent ist. Die Viren müssen sich auf Nukleotid-Ebene ähneln, jedoch nicht unbedingt miteinander verwandt sein. Zwei identische Inserts in ihrem Genom genügen um *cross protection* in der Pflanze innerhalb eines Monats nach Infektion auszulösen (Calisher und Horzinek 2012).

Um ein gleichzeitiges VIGS zweier unterschiedlicher Gene zu erzielen, wurde jeweils ein *yfp*-Fragment und ein weiteres Genfragment in einem TRV-Vektor fusioniert. Durch Einsatz dieser Vektoren konnte eine Verminderung der YFP-Fluoreszenz in den glandulären Typ VI Trichomen von einer Vielzahl der getesteten Pflanzen der *yfp*-Expressionslinie von *S. lycopersicum* erreicht werden. Anhand des erfolgreichen Silencings der PDS und YFP kodierenden Gene (pAGT2474) in denselben Blattbereichen lässt sich schließen, dass durch diese Methode generell zwei Gene

gleichzeitig in kultivierten Tomatenpflanzen stillgelegt werden können. Die Blätter der infiltrierten Pflanzen zeigten hellere bis weiße Bereiche. Nach Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte man keine YFP-Fluoreszenz in den Typ VI Trichomen auf den ausgebleichten Blattflächen erkennen. Allerdings konnte unter Verwendung von pAGT2479 (HDR und YFP) und pAGT2238 (WD-40 Wiederholungsprotein) für VIGS nach einem Zeitraum von bis zu vier Wochen nach Infiltration keine Abnahme des YFP-Fluoreszenz-Signals in den Typ VI Trichomen der untersuchten Tomatenpflanzen festgestellt werden. Der durch das Silencing von *hdr* mit pAGT2479 erzielte Phänotyp von ausgebleichten Blättern fiel nach den vier Wochen Inkubationszeit jedoch relativ schwach aus. Möglicherweise könnte durch eine erneute Untersuchung nach einer längeren Zeit der infiltrierten Tomatenpflanzen eine Silencing-Antwort zu beiden Genen detektiert werden. Eine Wiederholung der Agroinfiltration mit diesen TRV-Vektor-Konstrukten wäre notwendig um weitere Aufschlüsse hierzu zu erlangen.

Des Weiteren wurde VIGS mit einer anderen *Del/Ros1*-Expressionslinie der kultivierten Tomate durchgeführt. Diese Pflanzen besitzen einen erhöhten Anthocyan-Stoffwechsel und weisen deshalb violette Blätter auf. Es wurden TRV-Vektorkonstrukte mit Genfragmenten von Solyc01g104550 (WRKY Transkriptionsfaktor 32) und Solyc12g099260 (ATP Citrat Lyase α -Untereinheit) zusammen mit einem Genfragment von *Del/Ros1* kloniert und für die Agroinfiltration mit den verwendeten Agrobakterien transformiert. Nach Infiltration mit der Zahnstocher-Methode konnte eine Veränderung des Phänotyps erreicht werden. Durch Silencing von *Del/Ros1* erhält man grüne Bereiche auf den violetten Blättern der Pflanze. Um Sicherzustellen, dass gleichzeitig mit *Del/Ros1* Solyc01g104550 oder Solyc12g099260 stillgelegt wurden, müsste noch eine relative Quantifizierung mit qRT-PCR durchgeführt werden. Um zu bestimmen welche der beiden verwendeten Linien der kultivierten Tomate besser für VIGS geeignet ist, müssten noch mehr Vektorkonstrukte mit *Del/Ros1* kloniert und die VIGS-Versuche wiederholt werden. Im Zuge dieser Arbeit erwies sich die Klonierung solcher pTRV2-Vektoren wegen derselben vermittelten Antibiotikaresistenz des Golden Gate Level 1 Vektors als schwierig. Aufgrund von Zeitmangel konnte die geplante Klonierungsstrategie nicht entsprechend angepasst werden. Ein Vorteil dieser Markerlinie liegt im Gegensatz zur *yfp*-Expressionslinie von *S. lycopersicum* in einem leichten Erkennen der Bereiche des Silencings mit bloßem Auge. Allerdings bildet die *Del/Ros1*-Expressionslinie der kultivierten Tomate (*S. lycopersicum* cv. Micro Tom) aufgrund ihres anderen genetischen Hintergrunds weniger Trichome auf ihren Blättern im Gegensatz zur *yfp*-Expressionslinie (*S. lycopersicum* cv. MoneyMaker) aus. Dies könnte sich als nachteilig für VIGS trichom-spezifischer Gene erweisen.

Nach Vakuum-Infiltration der wilden Tomate *S. habrochaites* (LA1777) konnte Nekrose der infiltrierten Blätter bis zum Absterben der ganzen Pflanze beobachtet werden. Mit der Zahnstocher-Methode konnte dagegen bei einem Silencing-Versuch von *pds* keine verändertes Wachstum oder ein Ausbleichen der Blätter festgestellt werden. Dies könnte zusätzlich darauf hindeuten, dass das Anlegen eines Vakuums großen Stress für die Pflanze bedeutet. Zudem kann die auftretende Nekrose und fehlenden Silencing-Symptome nach Infiltration von *S. habrochaites* mit der stärkeren Abwehr gegen Virusinfektionen im Vergleich zu *S. lycopersicum* begründet sein. So ist *S. habrochaites* im Gegensatz zur kultivierten Tomate gegen eine Reihe anderer Viren resistent, wie TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) (Eybishtz et al. 2009) und ToLCV (*Tomato leaf curl virus*) (Shamprasad et al. 2015). Des Weiteren wurden für die Infiltration der wilden Tomate Vektoren verwendet, die aus *S. lycopersicum*-cDNA gewonnene Genfragmente als Insert enthielten. Dies könnte ein weiterer möglicher Grund für die fehlenden Silencing-Symptome nach Zahnstocher-Infiltration sein auch wenn die Sequenzidentität mit 95% sehr hoch ist. Da kein VIGS in der wilden Tomate möglich ist, kann ein Silencing der trichom-spezifischen Gene nur an der kultivierten Tomate untersucht werden. Jedoch unterscheidet sich die Trichom-Kopfform der glandulären Typ VI Trichome der wilden Tomate von den Trichomen der kultivierten Tomate. *S. habrochaites* besitzt Gene, die für den runden Phänotyp der Trichom-Köpfe verantwortlich sind und in *S. lycopersicum* nicht vorhanden sein sollten. Jedoch sind gerade die für die Trichom-Form verantwortlichen Gene von Interesse. Um diesen Nachteil des verwendeten Systems zu umgehen, könnte man VIGS von trichom-spezifischen Genen an Tomatenpflanzen einer Kreuzung von *S. habrochaites* mit *S. lycopersicum* durchführen. Diese F1 Hybride sollten einen intermediären Phänotyp der Trichom-Kopfform und Genkopien der wilden und kultivierten Tomate aufweisen.

Über Berechnung des Trichom-Scores von Trichomen auf neugebildeten Blättern nach der Agroinfiltration sollten Veränderungen der Trichom-Form ausgelöst durch VIGS der gewählten trichom-spezifischen Gene in der kultivierten Tomate festgestellt werden. Dafür wurden die Mittelwerte der bestimmten Trichom-Scores von infiltrierten und nicht infiltrierten Pflanzen der *yfp*-Expressionslinie von *S. lycopersicum* (LA4024) miteinander verglichen. Die Gegenüberstellung zeigte keine Veränderung in der Trichom-Kopfform der nach Infiltration neu entwickelten Blätter. Anhand qRT-PCR wurde die Transkriptmenge eines Gens in mehreren Proben vier Wochen nach Infiltration relativ zum Referenzgen Actin ermittelt. Anschließend werden die Blattproben nicht infiltrierter und infiltrierter Pflanzen miteinander verglichen. So konnte man erste Rückschlüsse auf die Effektivität des VIGS über die Verringerung der Transkriptmenge eines Gens zwischen den Proben ziehen. Hierbei zeigte sich das die

Transkriptmenge der Kontrollgene *pds* und *hdr* in den Blattproben der infiltrierten Pflanzenbereiche um 60 bis 90% reduziert werden konnte und somit ein teilweises Silencing dieser Gene erfolgte. Da jedoch keine Veränderung des Trichom-Scores von nicht infiltrierten und infiltrierten Pflanze festgestellt wurde, kann man bestätigen, dass die Enzyme PDS und HDR keinen Einfluss auf die Trichom-Form von glandulären Typ VI Trichomen haben. Zu den trichom-spezifischen Testgenen konnten dagegen keine aussagekräftigen qRT-PCR-Ergebnisse bestimmt werden. Es konnte kein Produkt unter Verwendung der (E)- β -Ocimen Synthase-spezifischen Primer aus den cDNA-Proben der mit pAGT2242 ((E)- β -Ocimen Synthase) infiltrierten Blätter amplifiziert werden und die Genexpressionslevel des WRKY Transkriptionsfaktors 32 unterschieden sich in den Proben im Vergleich zu den Kontrollen nicht wesentlich. Anhand dieser qRT-PCR-Ergebnisse und der ermittelten Trichom-Scores kann man nicht sicher annehmen, dass die Trichom-Form nach einem erfolgreichen Silencing der untersuchten Gene im Vergleich zu Trichomen der nicht infiltrierten Pflanzen unverändert bleibt. Daher sollte die Spezifität der zu verwendeten Primer erneut überprüft und die relative Quantifizierung der trichom-spezifischen Gene wiederholt werden um sicherzustellen, dass die Gene in den Trichomen stillgelegt wurden. Zudem zeigte sich, dass die beobachtete Verringerung der YFP-Fluoreszenz nach VIGS durch qRT-PCR nicht bestätigt werden konnte. Die erhaltene *yfp*-Transkriptmenge der infiltrierten Proben war höher als in den nicht infiltrierten Proben. Die Differenzen zwischen den einzelnen Werten erwiesen sich als statisch nicht signifikant. Selbst bei einer Wiederholung der qRT-PCR könnte es jedoch vorkommen, dass man erneut nicht verwertbare Ergebnisse erhält. Die Menge des in den glandulären Typ VI Trichomen produzierten YFP schwankte in sämtlichen Pflanzen dieser *yfp*-Expressionslinie von *S. lycopersicum*. Zwar wurde durch Betrachtungen unter dem Fluoreszenzmikroskop vor Infiltration sichergestellt, dass nur Pflanzen mit starker YFP-Fluoreszenz verwendet wurden, jedoch kann dadurch nicht dieselbe *yfp*-Expressionsstärke für alle verwendeten Pflanzen sichergestellt werden. Die natürlichen Schwankungen der Expressionsstärke dieses Gens in der transgenen Tomatenlinie könnten für die starken Unterschiede der einzelnen Werte verantwortlich sein. Um exaktere Aussagen treffen zu können, sollten die qRT-PCR-Messungen nicht mit Blattproben einer nicht infiltrierten Pflanze und einer infiltrierten Pflanze unternommen werden. Stattdessen kann man Blattproben von einer Pflanze mit starker YFP-Fluoreszenz vor Infiltration und vier Wochen nach Infiltration entnehmen und die erhaltenen Ergebnisse nach qRT-PCR miteinander vergleichen.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Trichome sind epidermale Auswüchse auf der Oberfläche von Pflanzen. Sie unterscheiden sich in glanduläre und nicht glanduläre Trichome. Glanduläre Trichome formen dabei einen Trichom-Kopf aus Sekretionszellen. Sie bilden eine Vielzahl von Metaboliten aus und können diese häufig ausgelöst durch Einflüsse der Umwelt abgeben. Aufgrund dieser gebildeten Stoffe sind glanduläre Trichome für die Wissenschaft von besonderem Interesse. Ziel der vorliegenden Arbeit war es an der Etablierung einer VIGS-Methode zur Bestimmung der Rolle von trichom-spezifischen Genen bei der Trichom-Entwicklung und Ausbildung der Trichom-Kopfform mitzuwirken. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Agroinfiltrationsmethoden mit unterschiedlichen Parametern an einer Tomatenlinie von *S. lycopersicum*, die *yfp* in den glandulären Typ VI Trichomen exprimiert, getestet um die geeignetste Methode mit den optimalsten Bedingungen zu ermitteln. Bei Vakuum-Infiltration erreicht man mit einem kleineren Exsikkator ein effektiveres Silencing. Jedoch zeigte sich, dass die verwendete optische Dichte der Agrobaktériensuspension keinen wesentlichen Einfluss auf die Stärke und Verteilung der Silencing-Antwort hat. Für die Untersuchung trichom-spezifischer Gene wurde die Zahnstocher-Infiltration angewandt um den ausgeübten Stress auf die Pflanzen im Vergleich zur Vakuum-Infiltration zu reduzieren, obwohl sich die stärksten Silencing-Symptome mit dieser Infiltrationsmethode erst nach einer längeren Inkubationszeit von über vier Wochen zeigten. Durch Infiltration der *yfp*-Expressionslinie von *S. lycopersicum* unter Verwendung von pAGT2374 oder pAGT1849 jeweils mit pAGT1848 konnte kein Co-Silencing von *pds* oder *hdr* zusammen mit *yfp* erreicht werden. Deshalb wurden pTRV2-Vektoren kloniert, die jeweils ein Genfragment für eines der trichom-spezifischen Zielgene oder der Kontrollgene, sowie ein *yfp*-Fragment enthielten. Nach anschließender Agroinfiltration konnte ein Silencing der kodierenden Gene von PDS, HDR, WRKY Transkriptionsfaktor 32 und der (E)- β -Ocimen Synthase zusammen mit *yfp* erreicht werden. Ein gemeinsames Silencing von *yfp* mit dem Gen des WD-40 Wiederholungsproteins durch pAGT238 gelang nicht.

Unter Verwendung einer *Del/Ros1*-Expressionslinie von *S. lycopersicum* (cv. Micro Tom) wurde ein VIGS von *Del/Ros1* zusammen mit Solyc01g104550 (WRKY Transkriptionsfaktor 32) oder Solyc12g099260 (ATP Citrat Lyase α -Untereinheit) auf einem pTRV2 Vektor durchgeführt. Sowohl unter Verwendung der Kontrollvektoren pTRV2-DR und pTRV2-GW-DR, also auch mit pAGT2239 (WRKY Transkriptionsfaktor 32) und pAGT2359 (ATP Citrat Lyase α -Untereinheit)

konnte eine Silencing von *Del/Ros1* erreicht werden. Nach VIGS mit pAGT2374 (PDS) in der wilden Tomate *S. habrochaites* konnte durch Zahnstocher-Infiltration kein Silencing von *pds* erreicht werden. Auch zeigten sich keine auffälligen, optischen Anzeichen von Einwirkungen des TRV auf die Pflanze, weshalb man wahrscheinlich kein VIGS mit Zahnstocher-Infiltration in der wilden Tomate erreichen kann.

Zur Bestimmung der Auswirkung der trichom-spezifischen Gene auf die Trichom-Form wurden Trichom-Scores neuentwickelter Blätter der *yfp*-Expressionslinie vier Wochen nach Infiltration ermittelt. Es konnte keine Veränderung der Trichom-Form durch Silencing der trichom-spezifischen Gene und Kontrollgene festgestellt werden. Mittels qRT-PCR sollte die Transkriptmenge der jeweiligen Gene in Blattproben der *yfp*-Expressionslinie nach Infiltration relativ zum kodierenden Gen von Actin quantifiziert werden. Es konnte eine Reduzierung der Transkriptmenge von *pds* und *hdr* in den infiltrierten Proben im Vergleich zu den nicht infiltrierten Kontrollen detektiert werden. Zu den anderen getesteten Genen konnten im Zuge dieser Arbeit keine eindeutigen Ergebnisse ermittelt werden. Um diese zu erhalten sollte die relative Quantifizierung durch qRT-PCR wiederholt werden.

Im Anschluss zu dieser Arbeit wird in der Arbeitsgruppe „Glanduläre Trichome und Isoprenoidsynthese“ am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie an der Entstehung einer weiteren Tomatenlinie für VIGS trichom-spezifischer Gene gearbeitet. Durch eine Kreuzung der *yfp*-Expressionslinie von *S. lycopersicum* mit der wilden Tomate *S. habrochaites* (LA1777) werden Tomatenpflanzen mit trichom-spezifischer *yfp*-Expression und einem gemischten Phänotyp der Trichome angestrebt. Die glandulären Typ VI Trichome der so entstandenen Tomatenlinie sollten eine Mischung der kultivierten und wilden Tomaten-Trichom-Form aufweisen. Durch die Verwendung dieser Tomatenlinie für VIGS könnte man Aufschlüsse über die Rolle der trichom-spezifischen Gene in *S. habrochaites* erhalten ohne das eine Infiltration der wilden Tomate notwendig ist. Für diese neue Tomatenlinie müssten die bereits unternommenen VIGS-Untersuchungen wiederholt werden. Um die optimale Agroinfiltrationsmethode zu ermitteln, sollten zudem neue Infiltrationsmethoden getestet um an der Verbesserung der bestehenden Methoden gearbeitet werden. Hierzu könnte man die Infiltration mittels Spritze erproben. Dabei wäre es sinnvoll die Veränderungen des Phänotyps nach unterschiedlichen Inkubationszeiten zu dokumentieren um den Zeitpunkt der stärksten Silencing-Antwort zu ermitteln. Anschließend sollte eine relative Quantifizierung mittels qRT-PCR durchgeführt werden um die optischen Silencing-Symptome zu bestätigen.

Literaturverzeichnis

- Arias, R. S., Dayan, F. E., Michel, A., Howell, J. L. and Scheffler, B. E.: Characterization of a higher plant herbicide-resistant phytoene desaturase and its use as a selectable marker, *Plant Biotechnology Journal*; 4, 2006, S. 263-273.
- Arimura, G., Ozawa, R., Kugimiya, S., Takabayashi, J. and Bohlmann, J.: Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)-beta-ocimene and transcript accumulation of (E)-beta-ocimene synthase in *Lotus japonicus*, *Plant Physiol*; 135(4), 2004, S. 1976-83.
- Bakshi, M. and Oelmüller, R.: WRKY transcription factors, *Plant Signaling & Behavior*; 9(2), 2014, S. e27700.
- Becker, A. and Lange, M.: VIGS--genomics goes functional, *Trends Plant Sci*; 15(1), 2010, S. 1-4
- Besser, K., Harper, A., Welsby, N., Schauvinhold, I., Slocombe, S., Li, Y., Dixon, R. A. and Broun, P.: Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species, *Plant Physiol*; 149(1), 2009, S. 499-514.
- Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B. and Dinesh-Kumar, S. P.: Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants, *Plant J*; 39(5), 2004, S. 734-46.
- Calisher, C. H., Horzinek, M. C.: 100 Years of Virology: The Birth and Growth of a Discipline, Springer Science + Business Media 2012, S. 195
- Dudareva, N.: (E)-beta-Ocimene and Myrcene Synthase Genes of Floral Scent Biosynthesis in Snapdragon: Function and Expression of Three Terpene Synthase Genes of a New Terpene Synthase Subfamily, *The Plant Cell Online*; 15(5), 2003, S. 1227-1241.
- Engler, C., Kandzia, R. and Marillonnet, S.: A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability, *PLoS One*; 3(11), 2008, S. e3647.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S. and Somssich, I. E.: The WRKY superfamily of plant transcription factors, *Trends Plant Sci*; 5(5), 2000, S. 1360-1385.

- Eybishtz, A., Peretz, Y., Sade, D., Akad, F., Czosnek, H.: Silencing of a single gene in tomato plant resistant to *Tomato yellow leaf curl virus* renders them susceptible to the virus, *Plant Mol Biol*; 71(1), 2009, S. 157-171.
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Teclé, I. Y., Strickler, S. R., Bombarely, A., Fisher-York, T., Pujar, A., Foerster, H., Yan, A. and Mueller, L. A.: The Sol Genomics Network (SGN)--from genotype to phenotype to breeding, *Nucleic Acids Res*; 43(Database issue), 2015a, S. D1036-41.
- Fernandez-Pozo, N., Rosli, H. G., Martin, G. B. and Mueller, L. A.: The SGN VIGS tool: user-friendly software to design virus-induced gene silencing (VIGS) constructs for functional genomics, *Mol Plant*; 8(3), 2015b, S. 486-8.
- Fragkostefanakis, S., Sedeek, K. E., Raad, M., Zaki, M. S. and Kalaitzis, P.: Virus induced gene silencing of three putative prolyl 4-hydroxylases enhances plant growth in tomato (*Solanum lycopersicum*), *Plant Mol Biol*; 85(4-5), 2014, S. 459-71.
- Glas, J. J., Schimmel, B. C., Alba, J. M., Escobar-Bravo, R., Schuurink, R. C. and Kant, M. R.: Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores, *Int J Mol Sci*; 13(12), 2012, S. 17077-103.
- Kim, J., Matsuba, Y., Ning, J., Schillmiller, A. L., Hammar, D., Jones, A. D., Pichersky, E. and Last, R. L.: Analysis of natural and induced variation in tomato glandular trichome flavonoids identifies a gene not present in the reference genome, *Plant Cell*; 26(8), 2014, S. 3272-85.
- Liu, Y., Schiff, M. and Dinesh-Kumar, S. P.: Virus-induced gene silencing in tomato, *Plant J*; 31(6), 2002, S. 777-786.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D.: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method, *Methods*, 25(4), 2001, S.402-408
- Mülhardt, C.: *Molekularbiologie/Genomics, Der Experimentator*, 7. Auflage, Springer Spektrum Heidelberg 2013, S. 147-149.
- Navia-Giné, W. G., Yuan, J. S., Mauromoustakos, A., Murphy, J. B., Chen, F. and Korth, K. L.: *Medicago truncatula* (E)- β -ocimene synthase is induced by insect herbivory with corresponding increases in emission of volatile ocimene, *Plant Physiology and Biochemistry*; 47(5), 2009, S. 416-425.
- Payne, W. W.: A Glossary Of Plant Hair Terminology, *Brittonia*; 30(2), 1978, S. 239-255.

Plant Gene Silencing: Methods and Protocols: Methods Mol Biol, Springer Science+Business Media New York 2015.

Purkayastha, A. and Dasgupta, I.: Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants, *Plant Physiol Biochem*; 47(11-12), 2009, S. 967-76.

Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X. W., Chen, Z. and Qu, L. J.: Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis, *Cell Res*; 17(5), 2007, S. 471-82.

Quadrana, L., Rodriguez, M. C., Lopez, M., Bermudez, L., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., Descalzo, A., Asis, R., Rossi, M., Asurmendi, S. and Carrari, F.: Coupling virus-induced gene silencing to exogenous green fluorescence protein expression provides a highly efficient system for functional genomics in *Arabidopsis* and across all stages of tomato fruit development, *Plant Physiol*; 156(3), 2011, S. 1278-91.

Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M. and Baulcombe, D. C.: Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing, *Plant J*; 25(2), 2001, S. 237-245.

Schilmiller, A., Shi, F., Kim, J., Charbonneau, A. L., Holmes, D., Daniel Jones, A. and Last, R. L.: Mass spectrometry screening reveals widespread diversity in trichome specialized metabolites of tomato chromosomal substitution lines, *Plant J*; 62(3), 2010, S. 391-403.

Schilmiller, A. L., Last, R. L. and Pichersky, E.: Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds, *Plant J*; 54(4), 2008, S. 702-11.

Schilmiller, A. L., Miner, D. P., Larson, M., McDowell, E., Gang, D. R., Wilkerson, C. and Last, R. L.: Studies of a biochemical factory: tomato trichome deep expressed sequence tag sequencing and proteomics, *Plant Physiol*; 153(3), 2010, S. 1212-23.

Schluttenhofer, C. and Yuan, L.: Regulation of specialized metabolism by WRKY transcription factors, *Plant Physiol*; 167(2), 2015, S. 295-306.

Shamprasad, P., Sadashiva, A. T., Ravishankar, K. V.: Validation of molecular markers linked to ToLCV resistance in tomato varieties/hybrids/lines, *IMPACT:IJRANSS*; 3(4), 2015, S. 9-16.

Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Hara, M. and Omura, M.: Isolation and characterization of (E)-beta-ocimene and 1,8 cineole synthases in *Citrus unshiu* Marc, *Plant Science*; 168(4), 2005, S. 987-995.

- Smith, T. F.: Diversity of WD-repeat Proteins. in: The Coronin Family of Proteins - Subcellular Biochemistry, (Hrsg.): Clemen, C. S., Eichinger, L. and Rybakin, V., Springer 2008, S. 20-30.
- Spyropoulou, E. A., Haring, M. A. and Schuurink, R. C.: RNA sequencing on *Solanum lycopersicum* trichomes identifies transcription factors that activate terpene synthase promoters, BMC Genomics; 15(402), 2014.
- Suganuma, T., Pattenden, S. G. and Workman, J. L.: Diverse functions of WD40 repeat proteins in histone recognition, Genes Dev; 22(10), 2008, S. 1265-8.
- Tian, J., Pei, H., Zhang, S., Chen, J., Chen, W., Yang, R., Meng, Y., You, J., Gao, J. and Ma, N.: TRV-GFP: a modified Tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function, J Exp Bot; 65(1), 2014, S. 311-22.
- Tissier, A.: Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags?, Plant J; 70(1), 2012a, S. 51-68.
- Tissier, A.: Trichome Specific Expression: Promoters and Their Applications. in: Transgenic Plants - Advances and Limitations, (Hrsg.): Ciftci, Y. O., InTech 2012b, S. 353-378.
- Unver, T. and Budak, H.: Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method, Int J Plant Genomics; 2009, 2009, S. 198680.
- Virus Induced Gene Silencing: Methods and Protocols: Methods Mol Biol, Springer Science+Business Media New York 2013.
- Wang, Y., Jiang, F., Zhuo, Z., Wu, X. H. and Wu, Y. D.: A method for WD40 repeat detection and secondary structure prediction, PLoS One; 8(6), 2013, S. e65705.
- Werker, E.: Trichome Diversity and Development, Advances in Botanical Research; 31, 2000, S. 1-30.

Quellenverzeichnis

Integrated DNA Technologies: OligoAnalyzer 3.1, „Online im Internet“, <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>, von 2016, Abfrage am 11.03.2016

IPB-Halle, Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie: Glanduläre Trichome und Isoprenoidsynthese, „Online im Internet“, <http://www.ipb-halle.de/forschung/stoffwechsel-und-zellbiologie/forschungsgruppen/glandulaere-trichome-und-isoprenoidbiosynthese/>, vom 18.02.2013, Abfrage am 11.03.2016

Sol Genomics Network: BLAST, „Online im Internet“, <https://solgenomics.net/tools/blast/>, Abfrage am 11.03.2016

Anhang

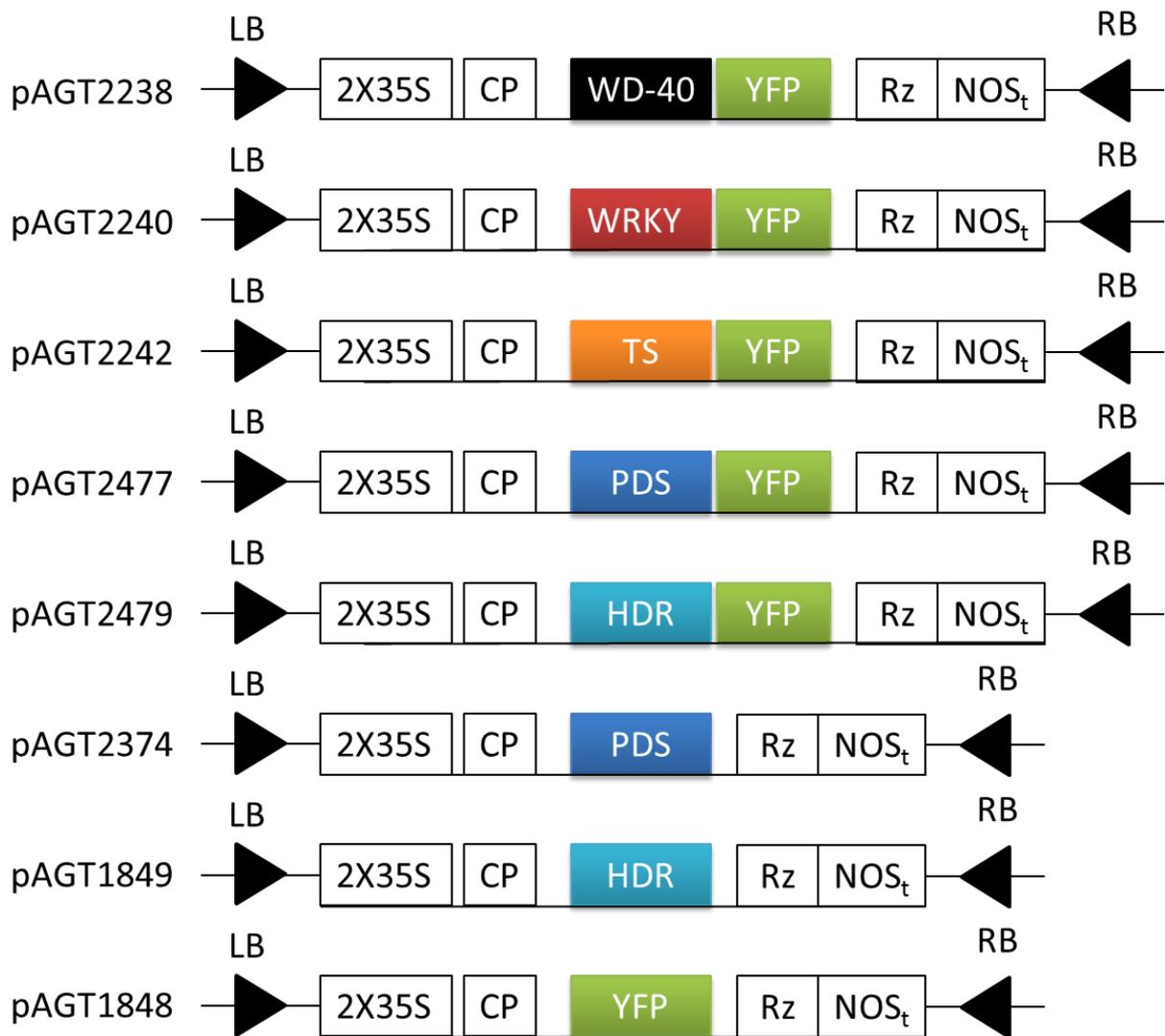


Abb. A1: Verwendete Vektoren für VIGS in *Solanum lycopersicum* und deren Bezeichnung (links). 2X35S steht hierbei für einen CaMV 35S Promotor, CP für das Kapsid-Protein, Rz für ein selbstspaltendes Ribozym von TRV und NOS_t für Nopalinsynthase Terminator. In der MCS befindet sich die Gateway-Kassette zur Kompatibilität der Vektoren mit dem Gateway-Klonierungssystem und ein Fragment eines GOI mit oder ohne einem *yfp*-Fragment, wobei WD-40 (WD-40 Wiederholungsprotein Solyc01g109120), WRKY (WRKY Transkriptionsfaktor 32), TS (die Terpensynthase (E)- β -Ocimensynthase) für die Zielgene der jeweiligen Enzyme stehen. Die Vektoren pAGT2477, pAGT2479, pAGT2374, pAGT1849, pAGT1848 mit den Genfragmenten von PDS, HDR und YFP in verschiedenen Kombinationen wurden als Kontrollen verwendet.

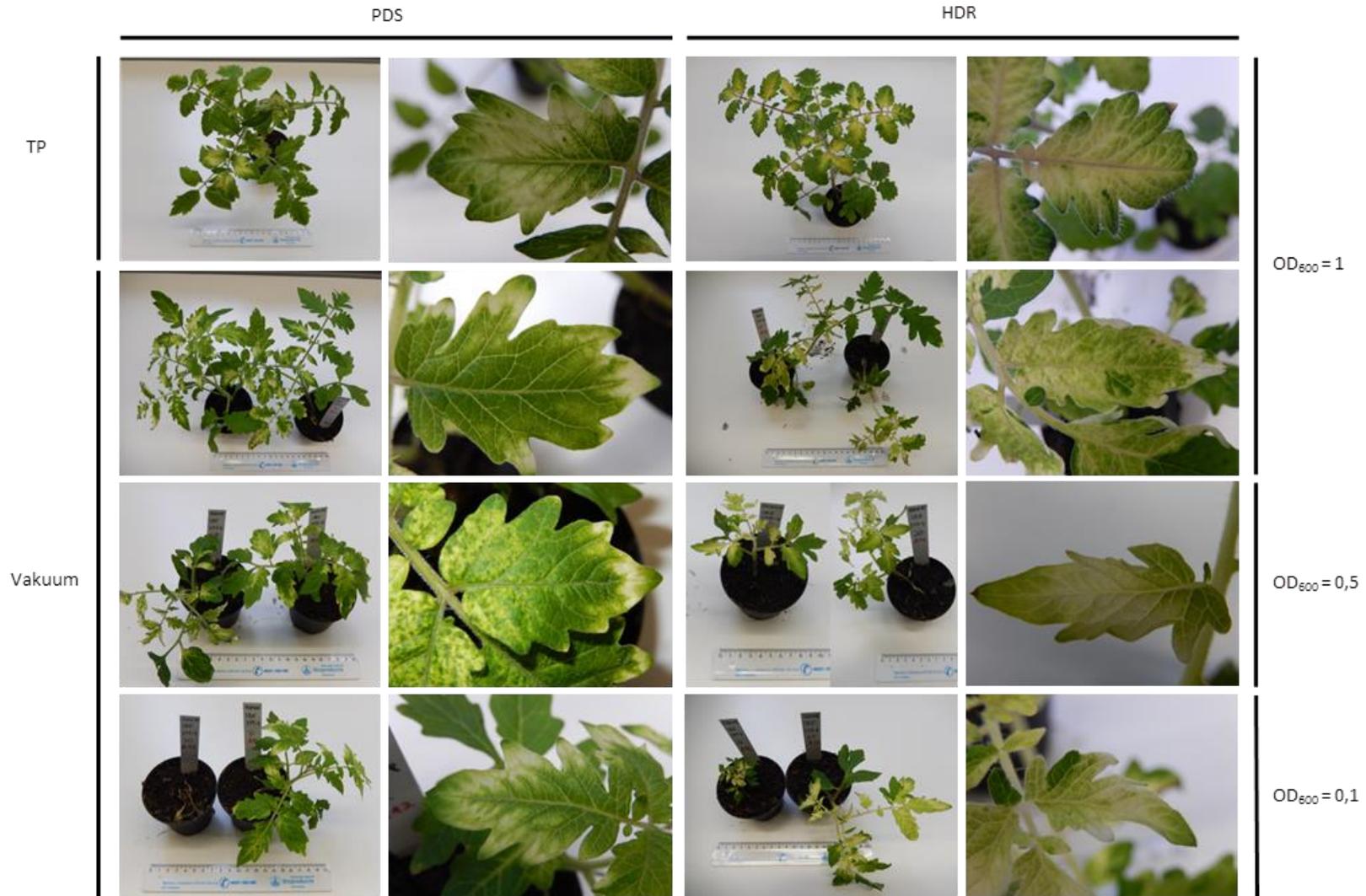


Abb. A2: Einige Phänotypen erhalten durch VIGS von Solyc01g10930 (HDR) und Solyc03g123760 (PDS). Vergleichend sind die unterschiedlichen Phänotypen erhalten durch Vakuum-Infiltration und Zahnstocher-Infiltration bei unterschiedlicher optischer Dichte der verwendeten Agrobacteriensuspension dargestellt.

kleiner Exsikkator (DN100)

großer Exsikkator (DN200)

OD₆₀₀ = 0,25



OD₆₀₀ = 0,5



Abb. A3: Einige Phenotypen erhalten durch VIGS von Solyc01g10930 (HDR). Vergleichend sind die unterschiedlichen Phänotypen erhalten durch Vakuum-Infiltration mit kleinem und großen Exsikkator bei unterschiedlicher optischer Dichte der verwendeten Agrobacteriensuspension dargestellt.

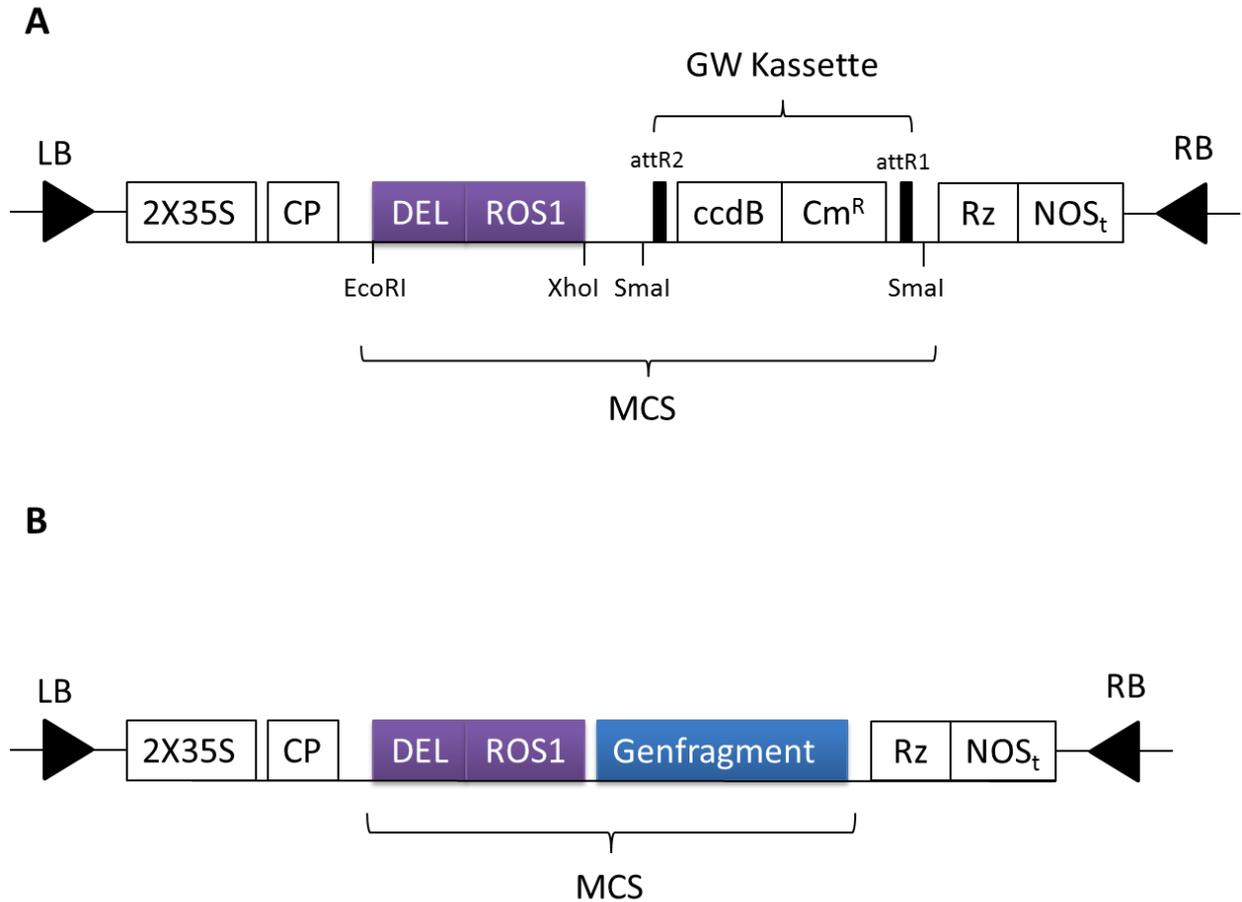


Abb. A4: TRV-Vektorkonstrukte für Agroinfiltration in eine *Del/Ros1*-Expressionslinie von *S. lycopersicum*. **A.** pTRV2-DR-GW, gateway-kompatibler TRV-Vektor mit den Genfragmenten für Delila/Roseal in der MCS; **B.** pTRV2-DR-GW mit einem zusätzlichen Fragment eines GOIs als Insert

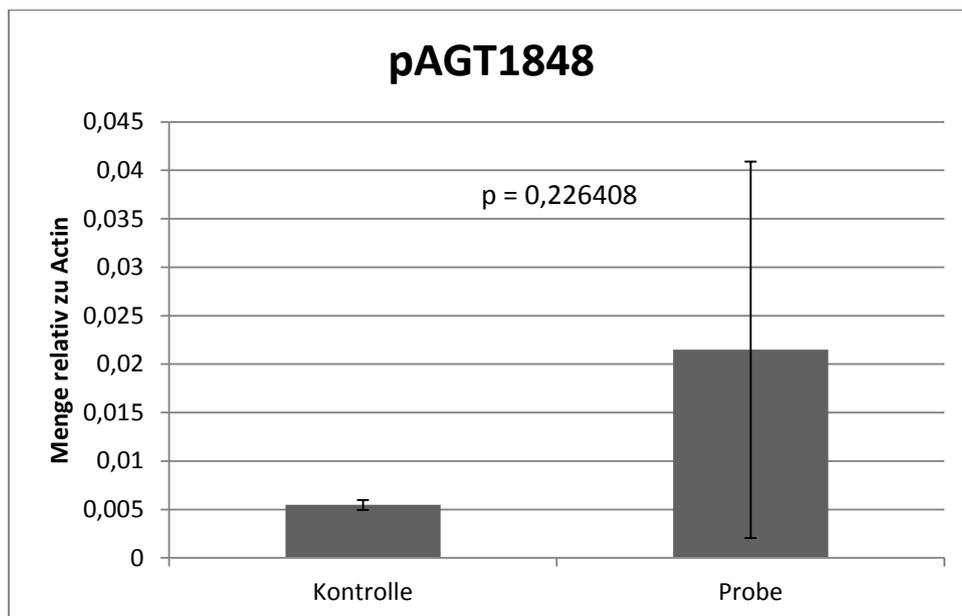


Abb. A5: Darstellung der Expressionslevel von *yfp* relativ zum Referenzgen Actin in den nicht infiltrierten Kontrollen und in den mit pAGT1848 (YFP) infiltrierten Proben.

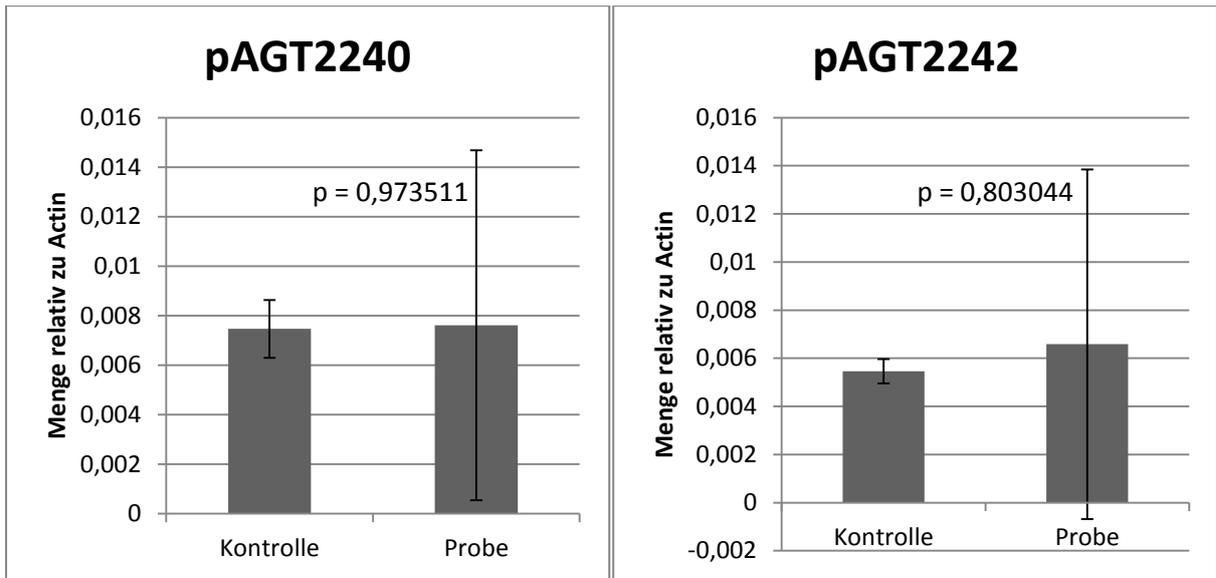


Abb. A6: Darstellung der Expressionslevel von *yfp* relativ zum Referenzgen Actin in den nicht infiltrierten Kontrollen und in den mit pAGT2240 (WRKY Transkriptionsfaktor 32) und pAGT2242 ((E)- β -Ocimen Synthase) infiltrierten Proben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Das bearbeitete Thema wurde nicht schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt und/oder anderswo als Prüfungsarbeit eingereicht.

Köthen, 11.05.2016