

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Pflanzenvermittelte Unterdrückung der Genexpression in  
*Blumeria graminis*  
Eine neuartige Methode zur Erzeugung von Resistenz**

Dissertation

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

vorgelegt von

Diplombiologin Daniela Nowara  
geb. am 08.08.1977 in Remscheid

Gutachter: Prof. Dr. Holger Deising  
Prof. Dr. Edgar Peiter  
Dr. habil. Patrick Schweizer

Verteidigung am 15. Dezember 2008

Halle/Saale, Juni 2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000014975**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014975>]



---

Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Getreidearten Weizen und Gerste in Wirtschaft und Wissenschaft.....	1
1.2 Phytopathogene Pilze .....	2
1.2.1 Das obligat biotrophe Pathogen <i>Blumeria graminis</i> .....	2
1.3 Resistenzen gegen <i>B. graminis</i> .....	5
1.3.1 Rassenspezifischen Resistenz.....	6
1.3.2 <i>mlo</i> -vermittelte Resistenz .....	7
1.4 Unterdrückung der Genexpression.....	7
1.4.1 RNA-vermitteltes Gen- <i>Silencing</i> .....	7
1.4.2 Anwendungsformen von RNAi .....	10
1.4.2.1 TIGS – <i>Transient-induced gene-silencing</i> .....	10
1.4.2.2 VIGS – <i>Virus-induced gene-silencing</i> .....	11
1.4.2.3 RNAi in transgenen Pflanzen.....	12
1.4.2.4 RNAi in transgenen Pilzen.....	12
1.4.3 Vor- und Nachteile von RNAi.....	13
1.4.3.1 Vorteile von RNAi.....	13
1.4.3.2 Nachteile von RNAi .....	14
1.5 Ziel dieser Arbeit.....	15
2. Material und Methoden .....	16
2.1 Biologisches Material.....	16
2.1.1 Pflanzensorten .....	16
2.1.1.1 Verwendete Getreidesorten .....	16
2.1.1.2 Kulturbedingungen von den Pflanzen .....	16
2.1.2 <i>Blumeria graminis</i> .....	16
2.1.2.1 Verwendete <i>Blumeria graminis</i> -Isolate.....	16
2.1.2.2 Kulturbedingungen von <i>B. graminis</i> .....	16
2.2 Allgemein angewendete Verfahren.....	17
2.2.1 Internet-Recherchen.....	17
2.2.1.1 Blast-Analysen.....	17
2.2.1.2 siRNA- <i>Scan</i> .....	17
2.2.1.3 Eclat-Software .....	17
2.2.2 DNA-Isolierung.....	18
2.2.2.1 Isolation genomischer DNA aus Pilzsporen.....	18

---

2.2.2.2 DNA-Isolation aus Pflanzenmaterial.....	19
2.2.3 Restriktionsverdau.....	19
2.2.4 Standard-PCR.....	20
2.2.5 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	21
2.2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	21
2.2.5.2 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	21
2.2.6 Allgemein verwendete Lösungen und Medien.....	22
2.2.6.1 Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	22
2.2.6.2 Medien für die Bakterienkultur.....	22
2.2.7 Chemikalien.....	22
2.3 <i>Transient-induced gene-silencing</i> – TIGS.....	23
2.3.1 Erstellung der RNAi-Haarnadel-Konstrukte.....	23
2.3.2 Transiente Expression von RNAi-Konstrukten in Getreideblättern.....	24
2.3.2.1 Herstellung der sterilen Goldsuspension.....	24
2.3.2.2 Beschichtung der Goldpartikel mit DNA.....	24
2.3.2.3 Biolistischer Gentransfer.....	24
2.3.3 Inokulation mit <i>B. graminis</i> .....	25
2.3.4 Färbung der transienten Zellen.....	25
2.3.5 Ermittlung der Anfälligkeit der transienten Zellen gegen <i>B. graminis</i> .....	26
2.3.5.1 Mikroskopische Auswertung der transienten Zellen.....	26
2.3.5.2 Statistische Auswertung der Mikroskopie-Daten.....	27
2.4 <i>Virus-induced gene-silencing</i> – VIGS.....	28
2.4.1 Die Kulturbedingungen der Weizenpflanzen.....	28
2.4.2 Klonierung der <i>Antisense</i> -Konstrukte.....	28
2.4.3 Infektion der Weizenpflanzen mit BSMV.....	30
2.4.3.1 Linearisierung der Plasmide.....	30
2.4.3.2 <i>in vitro</i> -Transkription.....	31
2.4.3.3 Infektion der Pflanzen mit BSMV.....	31
2.4.4 Test auf Anfälligkeit gegenüber <i>Bgt</i> .....	32
2.4.4.1 Ernte der BSMV-infizierten Blätter.....	32
2.4.4.2 Färbung des Pilzes.....	32
2.4.4.3 Auswertung der VIGS-Experimente.....	33
2.4.4.3.1 Mikroskopische Auswertung.....	33
2.4.4.3.2 Statistische Auswertung.....	34

---

2.5 Transgene Pflanzen.....	34
2.5.1 Herstellung der RNAi-Konstrukte .....	34
2.5.2 Herstellung der transgenen Pflanzen .....	35
2.5.3 Anzucht der transgenen Pflanzen .....	35
2.5.4 Test auf Anfälligkeit der transgenen Gersten gegen <i>Bgh</i> .....	35
2.5.4.1 Bonitur .....	35
2.5.4.2 Mikroskopische Auswertung .....	36
2.5.5 Ernte von <i>Bgh</i> von der Blattoberfläche .....	37
2.6 Transkriptanalyse in Einzelzellen der Gerstenepidermis .....	37
2.7 Analyse der Expression mit Hilfe der <i>Northern Blot</i> -Technik.....	38
2.7.1 RNA-Isolierung .....	38
2.7.2 Elektrophoretische Auftrennung der RNA .....	38
2.7.3 Aufbau des <i>Northern Blots</i> .....	38
2.7.4 Hybridisierung der RNA mittels radioaktiv-markierter Sonde .....	39
2.7.4.1 Radioaktive Markierung der Sonde .....	39
2.7.4.2 Hybridisierung der RNA .....	40
2.7.4.3 Waschung der Membran.....	40
2.8 Ernte der epiphytischen Pilzstrukturen von Getreideblättern.....	40
2.8.1 Pilzernte mit Zellulose-Acetatlösung .....	40
2.8.2 RNA-Isolation aus Pilzmaterial von Zellulose-Acetat-Streifen .....	41
2.9 <i>Real time</i> -PCR .....	41
2.9.1 PCR-Ansatz .....	41
2.9.2 Auswertung der <i>real time</i> -PCR .....	42
3. Ergebnisse.....	43
3.1 Klassifizierung der TIGS-Kandidaten mittels blast-Analysen .....	43
3.1.1 Kriterien zur Klassifizierung der Kandidaten.....	43
3.1.2 Resultate der blast-Analysen .....	44
3.1.3 Kandidaten für die TIGS-Experimente .....	46
3.2 TIGS-Experimente .....	48
3.2.1 Test der Kandidaten mittels TIGS im Gersten- <i>Bgh</i> -System .....	49
3.2.1.1 Experimente im Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘ .....	49
3.2.1.1.1 <i>Primärscreening</i> .....	49
3.2.1.1.2 Genauere Untersuchung einiger ausgewählter Kandidaten.....	51

---

3.2.1.1.3 Ausschluss von <i>off target</i> -Effekten durch zusätzliche RNAi-Konstrukte	53
3.2.1.1.3.1 Kandidat HIGS 25	54
3.2.1.1.3.2 Kandidat HIGS 47	55
3.2.1.2 Test einiger Kandidaten im Gersten-Kultivar ‚Pallas‘	56
3.2.2 TIGS-Experimente mit Weizen und <i>Bgt</i>	57
3.3 Suche nach <i>off target</i> -Effekten in pflanzlichen Genen mit Hilfe des ‚siRNA-Scans‘	59
3.3.1 Vergleich mit dem Genindex der Gerste	59
3.3.2 Vergleich mit dem Genindex des Weizens	61
3.4 Untersuchungen zum Ursprung der Kandidaten-Sequenzen	61
3.4.1 BlastN gegen die Genomsequenz von <i>Bgh</i>	61
3.4.2 Analyse des Ursprungs der Kandidaten mittels PCR	62
3.4.3 Zuordnung der Kandidatengene zum Transkriptom von <i>Bgh</i> bzw. <i>Bgt</i>	72
3.5 Transkriptanalyse in Einzelzellen der Gerste	73
3.6 Test dreier Kandidaten mit VIGS im Weizen- <i>Bgt</i> -System	75
3.6.1 Analyse der Anfälligkeit gegen <i>Bgt</i> durch Mikroskopie	76
3.6.1.1 Penetrationsrate	76
3.6.1.2 Wachstum des Pilzmyzels	77
3.6.2 Transkriptanalyse in <i>Bgt</i>	78
3.6.2.1 Qualitätsprüfung des mit Zellulose-Acetat geernteten Pilzmaterials	78
3.6.2.2 Expressionsanalyse von HIGS 47 in <i>Bgt</i> auf BSMV-infiziertem Weizen	80
3.7 Transgene Gerstenpflanzen	80
3.7.1 Analyse des RNAi-Konstruktes in transgenen Gersten-Linien	81
3.7.1.1 Nachweis des RNAi-Konstruktes mittels PCR	81
3.7.1.2 Analyse der Expression des Transgens	82
3.7.2 Makroskopische Analyse der Anfälligkeit der transgenen Pflanzen gegen <i>Bgh</i>	83
3.7.3 Analyse der Anfälligkeit gegen <i>Bgh</i> durch Mikroskopie	84
3.7.4 Expressionsanalyse von HIGS 47 in <i>Bgh</i> auf transgenen Gerstenpflanzen	86
4. Diskussion	89
4.1 HIGS – Eine neue Methode, um Genfunktionen in <i>B. graminis</i> zu untersuchen	89
4.1.1 Die Entdeckung von HIGS mittels eines transienten Einzelzell-Assays (TIGS)	89
4.1.1.1 Auswahl der Kandidaten für die TIGS-Experimente	90
4.1.1.1.1 Überprüfung der Kandidaten mittels blast-Analyse	90
4.1.1.1.2 Einordnung der Kandidaten aufgrund ihres Codon-Gebrauches	91

---

4.1.1.2 Test der Kandidaten mittels TIGS im Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘ .....	92
4.1.1.2.1 <i>Primärscreening</i> .....	92
4.1.1.2.2 Endergebnisse des TIGS .....	93
4.1.1.3 <i>Off target</i> -Effekte gegen pflanzliche Gene .....	94
4.1.1.4 Erneutes Überprüfen der Kandidaten auf ihren Ursprung .....	96
4.1.1.5 Zuordnung der Kandidatengene zum Transkriptom von <i>Bgh</i> bzw. <i>Bgt</i> .....	97
4.1.2 Bestätigung von HIGS in der Weizen- <i>Bgt</i> -Interaktion .....	98
4.1.3 HIGS basiert nicht auf DNA-Übertragung zwischen Wirt und Pathogen .....	100
4.1.4 Versuchter Nachweis einer veränderten Transkriptabundanz im Pilz .....	101
4.2 Die Kandidatengene .....	103
4.2.1 Kandidaten, welche das Gersten- <i>Bgh</i> -Systems signifikant beeinflusst hatten .....	103
4.2.2 Die Kandidaten HIGS 25 und HIGS 47 .....	105
4.3 Erkenntnisse über das <i>Host-induced gene-silencing</i> (HIGS) .....	107
4.3.1 Hypothesen zur Funktionsweise von HIGS .....	107
4.3.2 Vorerst keine Beweise für <i>Silencing</i> im Pilz .....	112
4.3.3. Ausblicke .....	113
4.3.4. Anwendungsmöglichkeiten von HIGS .....	114
5. Literaturverzeichnis .....	116
6. Anhang .....	139
6.1 blast-Resultate .....	139
6.2 Sequenzen der verwendeten Primer .....	160
6.3 bekannte Sequenzen der Kandidatengene .....	168
6.4 Beschreibungen der verwendeten Größenstandards .....	173
6.5 Expressionsdaten der ausgesuchter Kandidatengene .....	174
7. Zusammenfassung .....	175

## Abkürzungsverzeichnis

Acc.-Nr.	<i>Accession</i> -Nummer
AGT	<i>appressorial germ tube</i> (appressoriale Keimschlauch)
Ar	<i>Amorphotheca resinae</i>
as	Antisense
Bf	<i>Botryotinia fuckeliana</i>
Bg	<i>Blumeria graminis</i>
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>
<i>Bgt</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>
blast	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
cDNA	komplementäre DNA
Cp	<i>Cryphonectria parasitica</i>
Crest	<i>Crop</i> -EST-Datenbank des IPK
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang-RNA
ESH	elongierende sekundäre Hyphe
EST	<i>expressed sequence tag</i>
f. sp.	<i>forma speciales</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
Gm	<i>Gibberella moniliformis</i>
GUS	β-Glucuronidase
HI	Haustorialer Index
HIGS	<i>Host-induced gene-silencing</i>
hp-Konstrukt	<i>hairpin</i> (Haarnadel)-Konstrukt
Hpt <sup>r</sup>	Hygromycin-Phosphotransferase
Hv	<i>Hordeum vulgare</i>
ID	Identifikationskode
IPK	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung



miB	mittlere infizierte Blattoberfläche
Nc	<i>Neurospora crassa</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PGT	<i>primary germ tube</i> (primärer Keimschlauch)
Pt	<i>Pinus taeda</i>
rHI	relativer Haustorialer Index
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RvGS	RNA-vermitteltes Gen-Silencing
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Ss	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
T <sub>0</sub>	transgene Generation 0
T <sub>1</sub>	transgene Generation 1
Ta	<i>Triticum aestivum</i>
TC	Tentative Consensus
TIGS	<i>Transient-induced gene-silencing</i>
Tr	<i>Trichophyton rubrum</i>
VIGS	<i>Virus-induced gene-silencing</i>
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronic-Säure

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Getreidearten Weizen und Gerste in Wirtschaft und Wissenschaft

Zu den bedeutendsten Kulturpflanzen weltweit gehört neben dem Mais und dem Reis der Weizen (*Triticum aestivum*). Er wird als Grundnahrungsmittel und Tierfutter genutzt. Im Jahre 2006 wurden weltweit 606 Millionen Tonnen Weizen produziert (<http://faostat.fao.org/>). Die Hauptproduzenten von Weizen sind China (104 Millionen Tonnen), Indien (69 Millionen Tonnen) und die USA (57 Millionen Tonnen). Im Jahr 2006 wurden in Deutschland 22 Millionen Tonnen Weizen geerntet. Damit ist Weizen das meist angebaute Getreide in Deutschland. An zweiter Stelle steht die Gerste (*Hordeum vulgare*). Die Gerste spielt weltweit mit 139 Millionen Tonnen (im Jahr 2006) ebenfalls eine bedeutende Rolle. In Deutschland, welches nach der Russischen Föderation auf Platz zwei der weltweiten Gerstenproduktion steht, wurden 12 Millionen Tonnen Gerste im Jahr 2006 produziert. Die Gerste spielt als Grundnahrungsmittel keine große Rolle, sondern findet in erster Linie beim Brauen und als Tierfutter Verwendung.

Da die Gerste und der Weizen zum Stamm der *Triticeae* gehören (Sandhu & Gill, 2002; Stein, 2007), wird in der Wissenschaft die diploide Gerste auch als Modell für den nahe verwandten Weizen betrachtet. Dies ist hilfreich, da sich die Arbeit mit dem hexaploiden Weizen besonders im molekulargenetischen Bereich oft als schwierig gestaltet (Keller et al., 2005). Erst die Etablierung von RNA *interference* (RNAi) hat die Arbeit mit Weizen erleichtert (Fu et al., 2007), da RNAi auf mRNA-Ebene wirkt und unabhängig von der Kopienzahl eines Gens im Genom ist. Da allerdings die stabile Transformation von Weizenpflanzen sehr aufwendig ist, wurde RNAi bisher meist in transienten Systemen genutzt.

Für beide Getreidesorten laufen weltweit Projekte um ihre Genome zu sequenzieren. Das ‚Internationale Gersten-Sequenzier-Konsortium‘ (IBSC, <http://barleygenome.org>) wurde 2006 gegründet und verfolgt das Ziel der Etablierung einer physischen Karte des Gerstengenoms, mit deren Hilfe Gene und 5'-regulatorischen Sequenzen präzise lokalisiert und identifiziert werden sollen.

Für die Sequenzierung des Weizengenoms wurde ebenfalls ein internationales Konsortium gebildet (IWGSC, <http://www.wheatgenome.org/>). In Kooperation versuchen

Wissenschaftler, Züchter und Landwirte die Struktur und Funktion des Weizengenoms zu entschlüsseln.

## **1.2 Phytopathogene Pilze**

Wie alle Kulturpflanzen sind auch die Gerste und der Weizen durch eine Vielzahl von Krankheiten und Schädlingen bedroht. Die Ausbreitung der Pathogene und Schädlinge wird besonders durch die in Industrieländern verbreitete Monokultur und hohe Standdichte gefördert.

Zu den weit verbreiteten Phytopathogenen gehören die Pilze. Man unterscheidet phytopathogene Pilze nach ihrer Lebensweise. Es gibt zwei große Gruppen: nekrotroph und biotroph lebende Pilze. Die biotroph lebenden Pilze unterteilt man in obligat biotroph, fakultativ biotroph und hemibiotroph.

Nekrotrophe Pilze (z.B. *Cochliobolus heterostrophus*, *Botrytis cinerea*) töten die befallene Wirtszelle mittels toxischer Substanzen und lytischer Enzyme ab. Sie ernähren sich von abgestorbenem Pflanzenmaterial (van Kan, 2006).

Obligat biotrophe und fakultativ biotrophe Pilze benötigen den lebenden Wirt während ihres gesamten Lebenszyklus. Sie bilden spezielle Infektionsstrukturen, die Haustorien, aus, mit denen sie dem Wirt Nährstoffe entziehen. Sie sind fähig, den Stoffwechsel ihres Wirts zu ihren Gunsten zu beeinflussen (Panstruga, 2003). Die obligat biotrophen Pilze (echter und falscher Mehltau, viele Rost-Pilze wie z.B. *Uromyces sp.*) lassen sich nicht auf künstlichen Medien kultivieren. Dieser Umstand macht ihre Erforschung problematisch. Fakultativ biotrophe Pilze (*Ustilago maydis*, *Claviceps pupurea*) hingegen lassen sich auch *in vitro* kultivieren (Kahmann & Kämper, 2004; Tudzynski & Scheffer, 2004).

Hemibiotrophe Pilze (z.B. *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum spp.*) durchlaufen eine biotrophe Phase, die meist nur einige Stunden bis Tage andauert. Schließlich wird die Wirtszelle abgetötet und der Pilz bildet neue Infektionsstrukturen aus, um sich von der abgestorbenen Wirtszelle zu ernähren (Mendgen & Hahn, 2002).

### **1.2.1 Das obligat biotrophe Pathogen *Blumeria graminis***

*Blumeria graminis*, der Verursacher des echten Getreidemehltaus, gehört zur Klasse der Ascomyceten. Andere wirtschaftlich oder wissenschaftlich bedeutende Vertreter dieser Klasse sind *Saccaromyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Magnaporthe*

und *Septoria*. *B. graminis* gehört zur Familie der Echten Mehltaupilze, der *Erysiphaceae*. Es handelt sich um ein obligat biotrophes Pathogen.

*B. graminis* zeichnet sich durch eine hohe Wirtsspezifität aus. Die einzelnen *formae speciales* wachsen jeweils nur auf einer bestimmten Getreidegattung.

*B. graminis* fällt durch seinen charakteristischen Phänotyp auf. Sein weißes Myzel bildet runde Pusteln auf den Getreideblättern (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Weißes Mehltaumyzel (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) auf Gerstenblättern

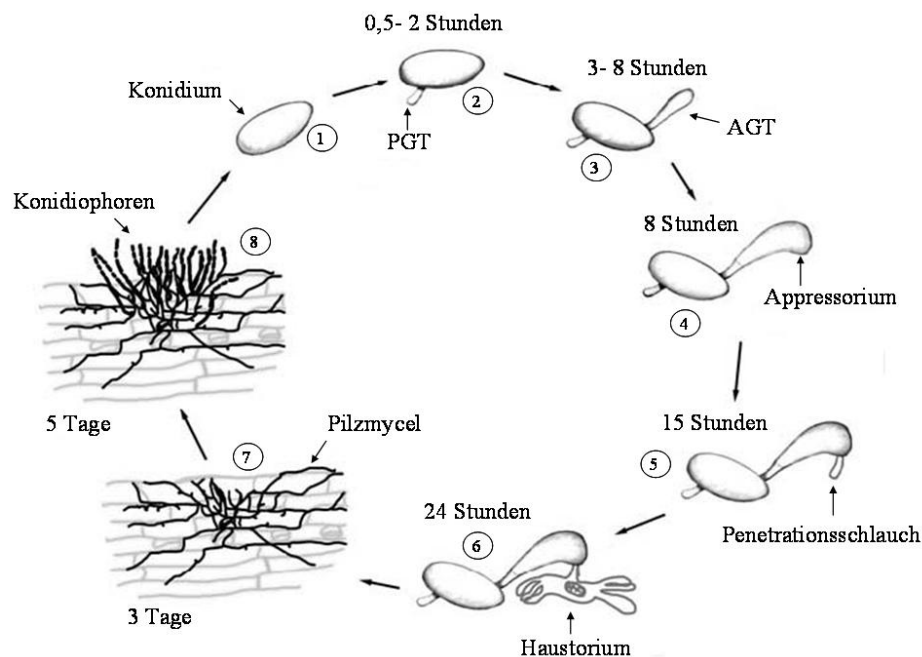
Das befallene Blattmaterial wird gelb und stirbt bei starkem Befall nach einiger Zeit ab. Die Photosyntheseleistung der Pflanze sinkt und die Transpirations- und Respirationrate steigen. Dadurch können Kornertrag, Korngewicht, Proteingehalt der Körner, die Anzahl von Seitentrieben und Ähren ebenso wie das Wurzelwachstum reduziert werden. Die Folge ist ein geringerer Ernteertrag von 5- 20%, manchmal sogar bis zu 40% (Johnston, 1997; Chaure et al., 2000). *B. graminis* ist weltweit verbreitet.

Die Verbreitung von *B. graminis* erfolgt über Konidien, asexuell entstandene Sporen, die durch den Wind verbreitet werden. Da eine einzelne Kolonie bis zu 200.000 Konidien produzieren kann, kommt es unter günstigen Bedingungen zu einer epidemischen Ausbreitung (McDonald & Linde, 2002, Zhang et al., 2005).

Nach der Landung eines Konidiums auf einem potentiellen Wirt (Abb. 1.2, (1)) beginnt es sofort mit der Produktion einer extrazellulären Matrix. Diese dient einerseits dazu, das Konidium an den Wirt anzuheften (Wright et al., 2002), andererseits wurden auch Hinweise darauf gefunden, dass sie zur Kommunikation zwischen Wirt und Pathogen beiträgt (Zhang et al., 2005).

Eine halbe Stunde nach dem ersten Kontakt zwischen Wirt und Pathogen beginnt sich der primäre Keimschlauch (PGT, *primary germ tube*) auszubilden (Abb. 1.2, (2)). Nach zwei Stunden ist der PGT vollständig entwickelt und hat eine Länge von etwa 5- 10 µm. Seine Funktion ist nicht vollständig erforscht. Es wird vermutet, dass er zur Wasseraufnahme aus dem Wirt und zur Erkennung des Wirts benötigt wird (Carver & Bushnell, 1983; Carver & Ingerson, 1987).

Der zweite Keimschlauch, der appressoriale Keimschlauch (AGT, *appressorial germ tube*) wird 3- 8 Stunden nach dem ersten Kontakt ausgebildet und wird 30- 40 µm lang (Abb. 1.2, (3)). Er ist durch ein Septum von dem Konidium getrennt. An seinem Ende entwickelt er eine hakenförmige Verdickung, das Appressorium. Aus dem Appressorium wächst etwa 15 Stunden nach Landung der Penetrationsschlauch, welcher die pflanzliche Zellwand durchbricht. Dabei spielen wahrscheinlich sowohl Turgorkraft als auch enzymatische Auflösung der Zellwand eine Rolle (Francis et al., 1996; Pryce-Jones et al., 1999). Unter den *Erysiphaceae* ist *Blumeria* sp. einzigartig in der Ausbildung von zwei Keimschläuchen.



**Abb. 1.2: Asexueller Lebenszyklus von *B. graminis*** (abgewandelt von Both et al., 2005a)

Nach der Landung des Konidiums auf dem Wirt bildet sich zuerst der primäre Keimschlauch (PGT) und anschließend der appressoriale Keimschlauch (AGT) aus. An der Spitze des AGT bildet sich das Appressorium, woraus der Penetrationsschlauch entsteht. Nachdem der Penetrationsschlauch die pflanzliche Zellwand durchbrochen hat, wächst das Haustorium aus. Nach erfolgreicher Etablierung des Haustoriums wächst die Pilzkolonie, und nach fünf Tagen entstehen Konidiophoren, von denen sich Konidien abschnüren.

Nach Durchdringen der pflanzlichen Zellwand beginnt das Haustorium sich aus dem Penetrationsschlauch zu entwickeln. Bei der Bildung des Haustorium wird die Plasmamembran der Wirtszelle eingestülpt, aber nicht durchbrochen. Es können jedoch Modifikationen der Membran beobachtet werden. Zwischen der Plasmamembran des Wirts und der haustorialen Zellwand bildet sich die extrahaustoriale Matrix (Panstruga, 2003).

Das Haustorium ist für die Aufnahme von Nährstoffen aus der Wirtszelle und somit für die Ernährung des Pilzes zuständig. Zuerst entsteht eine blasenförmige Ausbildung, der zentrale Körper des Haustoriums. Dann werden zur Oberflächenvergrößerung bis zu 10 fingerförmige Ausstülpungen an den beiden Polen des zentralen Körpers gebildet (Abb. 1.2, (6)), womit das Haustorium eine Gesamtoberfläche von 120– 150  $\mu\text{m}^2$  erhält (Zhang et al., 2005).

Die Nährstoffversorgung des Pilzes ist gesichert, wenn ein Haustorium erfolgreich in der Wirtszelle etabliert wurde. Jetzt fängt der Pilz an sich auf der Wirtsoberfläche auszubreiten. Das pilzliche Myzel besteht aus elongierenden sekundären Hyphen (ESH), die etwa 24 Stunden nach dem ersten Kontakt zwischen Wirt und Pathogen zu wachsen beginnen. Aus ihnen differenzieren sich erneut AGTs, aus denen sekundäre Haustorien entstehen.

Nach drei bis vier Tagen ist die Mehltau-Kolonie so groß, dass sie makroskopisch erkennbar ist. Die Kolonie beginnt mit der Produktion von Konidiophoren, von denen sich die reifen Konidien abschnüren (Abb. 1.2, (8)).

Während seiner gesamten Entwicklung verbleibt *B. graminis* auf der Oberfläche des Wirtes und in seinen Epidermiszellen. Er dringt nie in tiefer gelegene Zellschichten wie das Mesophyll vor. *B. graminis* befällt alle oberirdischen, vegetativen Pflanzenteile.

Eine sexuelle Vermehrung ist ebenfalls bekannt. Sie erfolgt durch Ascosporen, die in Kleistothecien gebildet werden. In dieser Form überdauert der Pilz bei ungünstigen Umweltbedingungen wie z.B. extreme Trockenheit (Johnston, 1997). Durch die intensive Landwirtschaft in den gemäßigten Breiten steht dem Pilz das ganze Jahr hindurch grünes Pflanzengewebe in Form von Sommer- bzw. Wintergetreide zur Verfügung. Dadurch ist es ihm möglich in der asexuellen als auch in der sexuellen Form zu überwintern.

### **1.3 Resistenzen gegen *B. graminis***

Neben dem Einsatz von Fungiziden werden Mehltau-resistente Getreidesorten verwendet, um den Befall durch *B. graminis* zu kontrollieren. Es gibt unterschiedliche

Resistenzmechanismen in Getreidepflanzen gegen Mehltau. Ausführlich untersucht sind diese im Gersten-*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*)-System.

Die bekannten Resistenzmechanismen lassen sich in sechs Klassen einteilen (Jørgensen, 1994): Rassenspezifische Resistenzen, *mlo*-vermittelte Resistenz, partielle Resistenz (Jørgensen, 1994), induzierte Resistenz (Jørgensen, 1994; Kogel & Langen, 2005), passive Resistenz (Jørgensen, 1994) und Nicht-Wirtsresistenz (Heath, 2000; Schweizer, 2007). Die rassenspezifische Resistenz und die *mlo*-vermittelte Resistenz sind gut untersucht und werden im Folgenden kurz erläutert.

### **1.3.1 Rassenspezifischen Resistenz**

Bei der rassenspezifischen Resistenz trägt der Wirt ein Resistenz (*R*)-Gen. Dieses dominante *R*-Gen vermittelt Resistenz gegen Pathogene, welche ein entsprechendes Avirulenz (*Avr*)-Gen tragen. Interagieren die Produkte beider Gene direkt oder indirekt miteinander, wird im Wirt die Abwehrreaktion eingeleitet (Dangl & Jones, 2001). Oft handelt es sich um eine hypersensitive Reaktion (HR), die mit dem Tod der attackierten Zelle endet.

In der Gerste wird der Locus, an dem sich das *R*-Gen befindet *Ml(Locus)* genannt (Jørgensen, 1994). Ein Beispiel für ein *R*-Gen ist *Mla*. Wird eine Epidermiszelle, die das *Mla12*-Gen trägt, von einem Mehltau-Konidium attackiert, welches das passende *Avr*-Gen trägt, wird der Zelltod ausgelöst. Das Pilzwachstum kann auch durch HR in den umgebenden Epidermis- und darunter liegenden Mesophyllzellen begrenzt werden, wenn das Konidium doch fähig war ein Haustorium zu etablieren und ESH auszubilden (Hückelhoven et al., 1999).

Ein Beispiel für *R*-Gene im Weizen gegen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) sind die *Pm*-Gene (Singrün et al., 2003; Yahiaoui et al., 2006; Wicker et al., 2007).

Während bereits über 85 *R*-Gene in der Gerste bekannt sind, wurden bisher nur etwa 25 *Avr*-Gene in *Bgh* identifiziert und nur wenige wurden bereits isoliert (Ridout et al., 2006). Die Erforschung von *Avr*-Genen im Getreide-*B. graminis*-System ist schwierig, da sich der Pilz nicht gentechnisch manipulieren lässt.

### **1.3.2 *mlo*-vermittelte Resistenz**

Die *mlo*-vermittelte Resistenz ist eine monogene Resistenz. Das dominante Wildtyp *Mlo*-Gen ist ein negativer Regulator der Abwehrreaktion gegen Mehltau (Büschges et al., 1997). Die Pflanze ist resistent gegen jedes bekannte Mehltausolat, wenn das *Mlo*-Gen durch Mutation in seiner Funktion gestört wird. Dies nennt man Breitbandresistenz (Jørgensen, 1992).

Während in der Regel rassenspezifische Resistenzen durch das Pathogen immer wieder überwunden werden, ist die *mlo*-vermittelte Resistenz dauerhaft. Bereits 1993- 94 trugen in Deutschland und Großbritannien 70% der eingesetzten Sommergerstensorten ein rezessives *mlo*-Allel (Lyngkjaer et al., 2000). Trotzdem ist bisher noch keine wesentliche Durchbrechung der *mlo*-Resistenz bekannt geworden.

Da das Wildtyp *Mlo*-Gen auch ein negativer Regulator des Zelltods ist, kommt es bei Kultivaren, die ein mutiertes *mlo*-Allel tragen, oft zu nekrotischen Flecken auf den Blättern, die nicht nur durch Pathogenbefall hervorgerufen werden (Wolter et al., 1993). Sie entstehen spontan durch eine beschleunigte Blattseneszenz (Piffanelli et al., 2002). Dies führt zu Minderung der Photosyntheseleistung und somit zu Ertragsminderung.

Das *Mlo*-Gen kommt sowohl in der Gerste als auch im Weizen vor (Elliott et al., 2002), und *mlo*-vermittelte Resistenz gegen Mehltau wurde ebenfalls in Tomaten und *Arabidopsis* entdeckt (Chen et al., 2006; Bai et al., 2008).

## **1.4 Unterdrückung der Genexpression**

Bei der Untersuchung von Genfunktionen bedient man sich oft eines reversen genetischen Ansatzes: Man unterdrückt die Expression eines Gens und beobachtet die Auswirkungen auf den Organismus. Dazu wird ein natürlicher Mechanismus genutzt: das RNA-vermittelte Gen-*Silencing*.

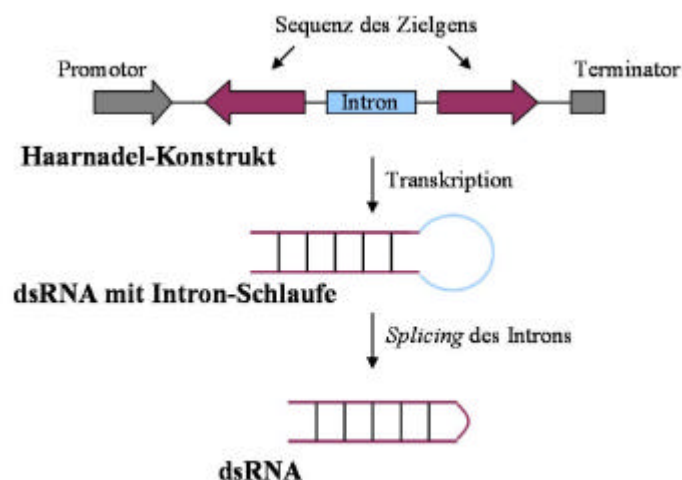
### **1.4.1 RNA-vermitteltes Gen-*Silencing***

RNA-vermitteltes Gen-*Silencing* (RvGS) wurde bereits in vielen unterschiedlichen Organismen gefunden und untersucht: Pflanzen (Napoli et al., 1990), Pilze (Romano & Macino, 1992), *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998), Insekten (Misquitta & Paterson, 1999), Menschen (Elbashir et al., 2001) und Tieren (McCaffrey et al., 2002). Es gibt unterschiedliche Varianten dieses *Silencing*-Weges, die sich aber sehr gleichen und



wahrscheinlich eng miteinander verwandt sind. Die Mannigfaltigkeit und das universelle Vorkommen weisen auf die große Bedeutung dieses Mechanismus hin (Fagard et al., 2000; Pickford & Cogoni, 2003; Brodersen & Voinnet, 2006). So spielt RvGS z.B. eine Rolle bei der Genregulation und bei der Abwehr gegen Viren und Transposons (Voinnet, 2001; Tijsterman et al, 2002; Baulcombe, 2004). Die Wirkungsweise kann ganz unterschiedlich sein: RvGS kann sich durch DNA-Methylierung auf die Transkription auswirken, die Stabilität von mRNA beeinflussen oder die Translation behindern (Tijsterman et al, 2002; Schramke & Allshire, 2004; Matzke & Birchler, 2005). Im Folgenden wird in erster Linie das posttranskriptionale Gen-Silencing (PTGS) durch mRNA-Abbau beschrieben.

Die unterschiedlichen Varianten von PTGS scheinen im Wesentlichen dem gleichen Ablauf zu folgen. Als Auslöser dient in der Regel doppelsträngige RNA (dsRNA; Meister & Tuschl, 2004). DsRNA wird auf natürliche Weise z.B. bei der Reproduktion von Viren kurzfristig in der Zelle gebildet (Angell & Baulcombe, 1997). Künstlich kann die Bildung von dsRNA z.B. durch das Einbringen von ‚Haarnadel‘-Konstrukten (Abb. 1.3) oder *Antisense*-Konstrukten in die Zelle erfolgen (Kumagai et al., 1995; Waterhouse et al., 1998; Douchkov et al., 2005).

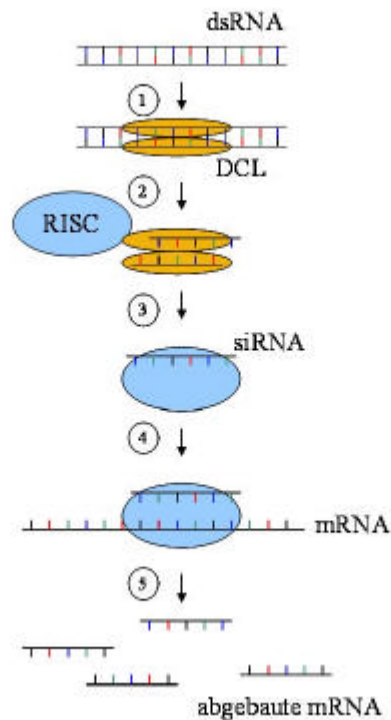


**Abb. 1.3: Formierung von dsRNA aus einem ‚Haarnadel‘-Konstrukt**

Ein Haarnadel-Konstrukt enthält neben einem Promotor und einem Terminator (grau) zweimal die Sequenz des Zielgens (lila). Die Wiederholung der Sequenz ist in umgekehrter Leserichtung in das Konstrukt eingebaut. Zwischen den beiden Wiederholungen liegt ein Intron (blau). Nach der Transkription schließen sich die beiden sequenzgleichen RNA-Stränge zu einem Doppelstrang (dsRNA) zusammen. Das Intron bildet eine Schleife am 3'-Ende. Durch *Splicing* wird das Intron entfernt (Wang et al., 1997; Smith et al., 2000).

Die Zelle ist darauf programmiert dsRNA abzubauen. Sie wird von dem Enzym Dicer, einem RNase III-ähnlichen Protein, welches ein oder zwei dsRNA-Bindedomänen und vermutlich RNA-Helikase-, RNaseIII- und PAZ (Piwi/ Argonaut/ Zwillie)-Domänen besitzt

(Bernstein et al., 2001), erkannt. An den unterschiedlichen RvGS-Wegen in Pflanzen sind unterschiedliche dicerähnliche (DCL) Enzyme beteiligt. DCL4 ist in erster Linie für RvGS induziert durch Haarnadel-Konstrukte verantwortlich (Dunoyer et al., 2005; Fusaro et al., 2006). DCL4 bindet die dsRNA und schneidet sie in 21 Nukleotide lange Stücke (Abb. 1.4, (2)), welche einen zwei Nukleotide-langen Überhang am 3'-Ende haben. Durch die Helikase-Aktivität von DCL4 werden die Doppelstränge gespalten und kurze RNA-Moleküle, auch *small interfering RNA* (siRNA) genannt, erzeugt (Susi et al., 2004).



#### Abb. 1.4: RNA-vermitteltes Gen-Silencing

dsRNA wird von einem dicerähnlichem Enzym (DCL) erkannt und in kurze RNA-Stücke (siRNA) gespalten. Ein siRNA-Strang wird an den Enzymkomplex RISC übergeben. Durch die Interaktion von RISC und siRNA werden homologe mRNA-Moleküle erkannt und abgebaut.

Ein Strang wird von einem Proteinkomplex, der *RNA-induced silencing complex* (RISC) genannt wird, übernommen (Abb. 1.4, (3)). Welcher Strang der doppelsträngigen siRNA als sogenannter Führungsstrang ausgewählt wird, hängt von der Sequenz und Struktur der siRNA ab. Der Führungsstrang wird verwendet, um komplementäre Einzelstrang-RNA aufzuspüren und abzubauen (Abb. 1.4, (4) und (5)). Verbleibt der Strang als Führungsstrang im RISC-Komplex, welcher komplementär zu der vom Experimentator ausgewählten Zielsequenz ist, wird die in der Zelle vorhandene mRNA abgebaut. Verbleibt der andere Strang im RISC-Komplex, hat dies keinen Einfluss auf die Expression des Gens, und das vom Experimentator eingebrachte Konstrukt ist unwirksam (Tomari and Zamore, 2005).

Von *C. elegans*, Pflanzen und Pilzen ist bekannt, dass sich das RvGS räumlich ausbreiten kann. Wie genau und in welcher Form die RNA durch den Organismus transportiert wird, ist noch nicht vollständig erforscht. In Pflanzen unterscheidet man zwischen systemischen *Silencing*, welches sich durch die gesamte Pflanze verbreitet und lokalem *Silencing*, welches sich nur von Zelle zu Zelle ausbreitet. Die dsRNA und die siRNA-Moleküle werden als mögliches Signalmolekül diskutiert (Waterhouse et al., 2001; Susi et al., 2004), wobei sich die Hinweise verdichten, dass es zumindest beim systemischen *Silencing* die siRNA-Moleküle sind (Kehr & Buhtz, 2008). Die RNA-Moleküle verbreiten sich beim systemischen *Silencing*, gebunden an ein kleines Protein, über das Phloem (Voinnet et al., 1998; Yoo et al., 2004). Die geringfügige Verbreitung bei lokalem *Silencing* läuft wahrscheinlich über die Plasmodesmata ab, wobei das Signalmolekül ebenfalls an ein kleines Protein gebunden zu sein scheint (Kobayashi & Zambryski, 2007).

RvGS wurde in vielen Organismen gefunden. Obwohl offenbar immer der gleiche Mechanismus zugrunde liegt, trägt der Vorgang viele Namen. In Pflanzen redet man gewöhnlich von *post-transcriptional gene-silencing* (PTGS). In Pilzen benutzt man den Begriff ‚*quelling*‘ und bei Tieren spricht man von *RNA interference* (RNAi).

Der Begriff RNAi wird im Allgemeinen benutzt, wenn man Haarnadel-Konstrukte in einen Organismus einbringt, um die Expression eines Gens zu unterdrücken.

## **1.4.2 Anwendungsformen von RNAi**

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die für RNAi benötigte dsRNA in einen Organismus einzuführen. Im Folgenden werden die drei in dieser Arbeit angewandten Methoden kurz vorgestellt.

### **1.4.2.1 TIGS – *Transient-induced gene-silencing***

TIGS stellt eine Möglichkeit da, in verhältnismäßig kurzer Zeit eine breite Palette verschiedenster Gene zu testen. Hierbei wird neben z.B. einem RNAi- oder *Antisense*-Konstrukt noch ein Vektor mit einem Reportergen (z.B. GUS oder GFP) auf Mikropartikel (meist Gold oder Wolfram) gebracht. Diese Partikel werden unter hohem Druck auf das zu untersuchende Gewebe geschossen (biolistischer Gentransfer). Tritt dabei ein Partikel in den Zellkern einer Zelle ein, kann die mit dem Partikel eingebrachte DNA in der Zelle

exprimiert werden. Anhand des Reportergens erkennt man, welche Zellen beim Beschuss getroffen und erfolgreich transformiert wurden (Panstruga, 2004). Anschließend kann die Auswirkung des RNAi-Konstruktes auf Einzelzellebene untersucht werden.

Diese Methode wird oft bei Untersuchungen der Interaktion von Getreide und Mehltau angewandt, da diese Interaktion während einer frühen Phase auf Einzelzellen der Epidermis beschränkt ist (Schweizer et al., 1999; Schultheiss et al., 2002; Douchkov et al., 2005; Zimmermann et al., 2006).

#### **1.4.2.2 VIGS – *Virus-induced gene-silencing***

TIGS ist zwar eine gute Methode, um schnell eine hohe Anzahl von Genen zu testen, allerdings ist es hier nur möglich einzelne Zellen zu untersuchen. VIGS liefert die Möglichkeit größere Bereiche von Pflanzen zu verändern. Mittels eines Virus wird ein Konstrukt in die Wirtspflanze eingeschleust. Über die Plasmodesmata und das Phloem breitet sich das Virus aus und mit ihm das eingebrachte Konstrukt. Somit wird die Expression des Zielgens fast in der gesamten Pflanze beeinflusst (Lu et al., 2003; Burch-Smith et al., 2004).

Bei der VIGS-Technologie macht man sich ein natürliches Phänomen zunutze. Wird eine Pflanze auf natürliche Weise von einem Virus infiziert, schaltet sich das auf RNA-Abbau basierende Verteidigungssystem ein. In der Pflanzenzelle wird die dsRNA, welche während der Virusvermehrung gebildet wurde, erkannt und wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben abgebaut. Das mit dem Virus eingeschleuste Konstrukt wird ebenfalls zu siRNA-Molekülen degradiert (Benedito et al., 2004), und der RNAi-Effekt setzt ein.

Für VIGS können sowohl *Sense*-, *Antisense* (as)- als auch Haarnadel (hp)-Konstrukte eingesetzt werden. Da während der Virusreplikation dsRNA entsteht, welche die Produktion von siRNA-Moleküle auslöst, wird auch durch ein *Sense*-Konstrukt RNAi gegen das Zielgen ausgelöst. Ein *Sense*-Konstrukt scheint aber ineffizienter als as- oder hp-Konstrukte zu sein (Lacomme et al., 2003).

VIGS wurde mittlerweile für viele verschiedene Pflanzen erfolgreich etabliert. Neben vielen Dikotyledonen wird VIGS inzwischen auch routinemäßig in Getreidearten angewandt (Holzberg et al., 2002; Scofield et al., 2005).

Bei der Untersuchung von Wirt-Pathogen-Beziehungen wird VIGS immer häufiger eingesetzt. Auch im Getreide-*B. graminis*-System findet VIGS Verwendung (Hein et al., 2005; Shen et al., 2007).

### 1.4.2.3 RNAi in transgenen Pflanzen

Mit der Erzeugung von transgenen Pflanzen hat man die Möglichkeit, die Expression eines Gens im gesamten Organismus über mehrere Generationen zu beeinflussen. Dazu wird ein entsprechendes Konstrukt z.B. mittels *Agrobacterium* oder mittels biolistischen Gentransfers in eine Zelle eingebracht (Shrawat & Lörz, 2006; Goedeke et al., 2007). Die transformierten Zellen werden mittels eines Resistenzmarkers selektiert, und durch den Einsatz von Phytohormonen zur Regeneration von Pflanzen angeregt. Diese Pflanzen werden auf das Vorhandensein des eingebrachten Konstrukts getestet und Folgegenerationen aus ihnen gezüchtet (Goedeke et al., 2007).

RNAi in transgenen Pflanzen wird sowohl in Dikotyledonen (Kerschen et al., 2004) als auch in Monokotyledonen z.B. zur Untersuchung potentieller Resistenzgene in Wirt-Pathogen-Beziehungen eingesetzt (Travella et al., 2006).

Im Gegensatz zu TIGS oder VIGS ist die Herstellung transgener Pflanzen sehr zeitaufwendig. Dafür erhält man Pflanzen, bei denen das eingebrachte Konstrukt fest in das Genom integriert ist. Durch die Wahl des Promotors kann man die Expression des Transgens auf ein bestimmtes Gewebe oder einen bestimmten physiologischen Zustand beschränken, oder durch einen konstitutiven Promotor in der gesamten Pflanze exprimieren lassen (Goedeke et al., 2007).

### 1.4.2.4 RNAi in transgenen Pilzen

Bei den Arbeiten mit vielen nekrotrophen oder hemibiotrophen Pilzen gehört die genetische Transformation zur Routine. Zur Untersuchung von Genfunktionen wurden bisher Methoden wie die Erzeugung von Mutationen durch Chemikalien oder die Genzerstörung durch DNA-Insertion (homologe Rekombination) bevorzugt (Oliver & Osbourn, 1995; Mullins & Kang, 2001; Olmedo-Monfil et al., 2004). Seit der Entdeckung von RNAi wird dieser Ansatz auch in Pilzen immer häufiger genutzt (Liu et al., 2002; Kadotani et al., 2003; Rappleye et al., 2004; Henry et al., 2007).

Der in dieser Arbeit eingesetzte Pilz *B. graminis* ist ein obligat biotrophes Phytopathogen. Das Konidium keimt zwar auf Glasplatten oder Agar, entwickelt hier aber nur PGTs. Daraus schließt man, dass der PGT Signale des Wirts aufnimmt, durch welche die Bildung des AGT stimuliert wird (Carver & Ingerson, 1987). Eine vollständige Entwicklung des Pilzes ist auf künstlichen Medien nicht möglich, wodurch eine Selektion von Transformanten oder die

Kultivierung von Mutanten schwierig wird. Die Untersuchung von Pathogenizitätsfaktoren ist auf diese Weise unmöglich. Zwar gab es Versuche, *B. graminis* zu transformieren (Chaure et al., 2000), aber dieses Verfahren ist zeitaufwendig und nur selten erfolgreich. Daher beschränkten sich molekulare Studien von *B. graminis* bisher auf Expressionsanalysen mittels cDNA-Arrays (Both et al., 2005a; Both et al., 2005b) und SAGE (*serial analysis of gene expression*; Thomas et al., 2002).

### **1.4.3 Vor- und Nachteile von RNAi**

RNAi ist eine mittlerweile routinemäßig in vielen Laboren angewandte Methode zur Analyse von Genfunktionen. Allerdings sollte man neben den zahlreichen Vorteilen auch die Nachteile bedenken.

#### **1.4.3.1 Vorteile von RNAi**

Im Folgenden werden einige Vorteile von RNAi aufgeführt.

Einen bedeutenden Vorteil bietet RNAi in Organismen, bei denen ein komplexes Genom (z.B. hexaploider Weizen, Travella et al., 2006) die Anwendung herkömmlicher Methoden wie Genmutation durch genetische Redundanz erschwert. Da RNAi auf RNA-Ebene wirkt, ist es unerheblich, ob mehrere Kopien eines Gens im Genom vorliegen, solange die Sequenzähnlichkeit zwischen den Kopien mindestens 88% beträgt (Parrish et al., 2000). Zudem entfällt die oft komplizierte und langwierige Erzeugung stabiler Mutanten.

RNAi ist sequenzspezifisch, und wählt man eine hochkonservierte Sequenz für das Konstrukt aus, kann man in einem Experiment die Expression einer ganzen Genfamilie unterdrücken.

Meist führt RNAi nur zu partiellem Abbau der mRNA. Deshalb ist es mit RNAi möglich, Gene zu untersuchen, deren völliger Verlust (z.B. durch Mutation) einen letalen Effekt auf den Organismus hätte.

RNAi wird dominant vererbt und lässt sich deshalb bereits in einer segregierenden T<sub>1</sub>-Generation untersuchen, da rund 75% der T<sub>1</sub>-Individuen *Silencing* zeigen sollte.

Diese Vorteile machen RNAi zu einer einfachen und kosteneffizienten Methode, die sie auch für groß angelegte Untersuchungen vieler Gene qualifiziert (Hilson et al., 2004; McGinnis et al., 2005).

### 1.4.3.2 Nachteile von RNAi

Wie jede Methode bringt auch RNAi einige Probleme mit sich.

Ein großes Problem bei RNAi ist das versehentliche *Silencing* anderer Gene neben dem Zielgen (*off target*-Effekt). Wie hoch die Übereinstimmung zwischen RNAi-Konstrukt und einer potentiellen *off target*-Sequenz sein muss, ist noch nicht vollständig erforscht. Bereits 88% Übereinstimmung auf einer Länge von 41 Nukleotiden der Sequenz des Konstrukts mit einer anderen mRNA scheint auszureichen, um *Silencing* zu erreichen (Parrish et al., 2000). Xu et al. (2006) berichten davon, dass eine unterschiedliche Base zwischen siRNA und der potentiellen *off target*-Sequenz bereits genügt, um *off target-Silencing* zu verhindern. Filichkin et al. (2007) berichten hingegen von einem *off target*-Effekt, obwohl keine 100% Übereinstimmung über 21 Nukleotide zwischen der Sequenz des Konstruktes und der Sequenz des *off target*-Gens bestand. Die Gefahr, dass neben dem eigentlichen Zielgen andere Gene (z.B. Mitglieder der gleichen Genfamilie) unbeabsichtigt ausgeschaltet werden, ist also gegeben. Es gibt die Möglichkeit durch Computerprogramme die Gefahr der Kreuzreaktion des RNAi-Konstrukts mit anderen Genen im Vorfeld zu überprüfen (Xu et al., 2006). Aber bei Organismen, deren Genom noch nicht vollständig sequenziert wurde, sind solche Resultate nur bedingt aufschlussreich.

Auch wenn man darauf achtet, dass das RNAi-Konstrukt nicht in einem hochkonservierten Genbereich liegt, kann die in *C. elegans*, Pflanzen und Pilzen gefundene RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) zu *off target*-Effekten führen. In *C. elegans* benutzt die RdRP siRNA-Moleküle als Primer und erstellt mit mRNA als Matrize dsRNA. Die Sequenz dieser dsRNA kann in 5'-Richtung über das eigentliche RNAi-Konstrukt hinausgehen (Sijen et al., 2001; Aoki et al., 2007). In Pflanzen scheint sich dieses Phänomen in 5'- und 3'-Richtung auszubreiten ohne die Zuhilfenahme von siRNA-Molekülen als Primer (Petersen & Albrechtsen, 2005). Dies kann ebenfalls zu unerwarteten Nebeneffekten führen.

Ineffiziente RNAi-Konstrukte können ein falsches Bild der Bedeutung des untersuchten Gens für den beobachteten Phänotyp hervorrufen. Dies kann z.B. an einer suboptimal gewählten Sequenz des Konstruktes liegen. Entweder wird die dsRNA verkehrt herum in den RISC eingeführt (siehe Kapitel 1.4.1) oder die siRNA-Moleküle können nicht an die mRNA binden, da der Zielbereich an Proteine gebunden oder durch sekundäre

Strukturen nicht zugänglich ist. Dies können auch Gründe für den oft beobachteten variablen Effekt von RNAi sein (Tomari & Zamore, 2005).

Aufgrund der Probleme, die bei RNAi-Experimenten auftreten können, sollte man zusätzliche Kontrollen einsetzen. Dies können z.B. mehrere Konstrukte mit unterschiedlichen Sequenzen gegen dasselbe Gen sein. Besteht die Möglichkeit, sind RT-PCR-Analysen oder Array-Experimente eine hervorragende Methode, um den Einfluss von RNAi auf die Expression des Zielgens und anderer Gene zu überprüfen.

### **1.5 Ziel dieser Arbeit**

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von RNAi-Konstrukten untersucht, die im pflanzlichen Wirt exprimiert wurden, aber gegen Gene aus *B. graminis* gerichtet sind.

Dieses Phänomen wurde im Verlauf einer TIGS-Versuchsreihe mit RNAi-Konstrukten gegen pflanzliche Gene, welche an der Gerste-*Bgh*-Interaktion beteiligt sein könnten, entdeckt. Die Zielgene für diese Experimente wurden aufgrund von Makroarraydaten ausgewählt (Zierold, 2005). Dieser Makroarray wurde aus einer cDNA-Bank, die auf mehltauinfizierter Gerstenepidermis basiert, erstellt. Daher waren auf dem Array sowohl cDNA-Klone der Gerste als auch aus *B. graminis* vorhanden. RNAi gegen einige dieser Gene aus *B. graminis* führte zu einer Reduktion der Infektionsrate im Gersten-*Bgh*-System.

Das Phänomen des Wirts-vermittelten Gen-*Silencing* (HIGS, *Host-induced gene-silencing*) wurde daraufhin an mehreren Zielgenen aus *B. graminis* im transienten Einzelzelltest (TIGS) im Gersten-*Bgh*-System getestet. Für ausgewählte Kandidatengene wurden HIGS-Effekte mittels VIGS in der Weizen-*Bgt*-Interaktion und mittels RNAi-exprimierender transgener Gerstenpflanzen reproduziert.

Mittels Einzelzell-Transkriptanalysen in *Bgh*-infizierten Gerstenzellen und quantitativer *real time*-PCR mit cDNA, erstellt aus RNA epiphytischer *Bgh*-Strukturen, wurde versucht, die Wirkungsweise des HIGS-Phänomens zu analysieren.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Biologisches Material

#### 2.1.1 Pflanzensorten

##### 2.1.1.1 Verwendete Getreidesorten

Es wurden die Sommergerste *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*, Kultivar ‚Golden Promise‘ und Kultivar ‚Pallas‘ und der Winterweizen *Triticum aestivum* subsp. *aestivum*, Kultivar ‚Kanzler‘ verwendet.

##### 2.1.1.2 Kulturbedingungen von den Pflanzen

Sowohl die Gersten- als auch die Weizen-Pflanzen wurden in IPK-Erde (ein Gemisch aus Komposterde und Sand) in Plastikpflanztöpfen (Ø 14 cm) angezogen. Die Töpfe wurden mit Erde gefüllt, ca. 100- 150 Getreidekörner darauf gegeben und mit Erde bedeckt. Die Pflanzen wuchsen in einer Klimakammer (SIMATIC OP7; Siemens, Deutschland) bei einer Temperatur von 20°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% und einem Licht/ Dunkel-Wechsel von 16/ 8 Stunden (Metallhalogenlicht). Sie wurden mit Leitungswasser gegossen. Für einige Experimente wurden die Pflanzen unter anderen Bedingungen angezogen. Dies wird in den entsprechenden Kapiteln gesondert erwähnt.

#### 2.1.2 *Blumeria graminis*

##### 2.1.2.1 Verwendete *Blumeria graminis*-Isolate

Es wurden der echte Gerstenmehltau *Blumeria graminis* D. C. Speer f. sp. *hordei* (*Bgh*), Isolat CH-4.8, und der echte Weizenmehltau *Blumeria graminis* D. C. Speer f. sp. *tritici* (*Bgt*), schweizer Feldisolat FAL 92315, verwendet.

##### 2.1.2.2 Kulturbedingungen von *B. graminis*

Der obligat biotrophe Pilz *Bgh* wurde auf Gerstenpflanzen des Kultivars ‚Golden Promise‘ kultiviert. Sieben Tage alte Gerstenpflanzen wurden mit Konidien von Pflanzen, welche

sieben Tage zuvor mit *Bgh* infiziert worden waren, inokuliert. Die infizierten Pflanzen wuchsen in Klimaschränken (TYP MLR 350; Sanyo, Tokio, Japan) bei 20°C und 16 Stunden Licht (Neonlicht). Ca. sieben Tage nach der Inokulation wurden die Sporen des Pilzes für die Experimente verwendet.

*Bgt* wurde auf *Triticum aestivum* subsp. *aestivum*, Kultivar ‚Kanzler‘ kultiviert. Die Kulturbedingungen entsprachen denen von *Bgh*.

## **2.2 Allgemein angewendete Verfahren**

### **2.2.1 Internet-Recherchen**

#### **2.2.1.1 Blast-Analysen**

Blast-Untersuchungen wurden in der Regel bei <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (‚NCBI‘, Altschul et al., 1997; Wheeler et al., 2007) durchgeführt.

Sollte nur gegen Sequenzen aus pilzlichen Organismen geblastet werden, wurde die Cogeme-Datenbank (<http://cogeme.ex.ac.uk/>) genutzt. Hier liegen Sammlungen von EST-Sequenzen verschiedener Pilze vor (Soanes et al., 2002).

#### **2.2.1.2 siRNA-Scan**

Um zu untersuchen, ob die verwendeten Konstrukte potentielle Zielgene im pflanzlichen Wirt haben, wurden sie mit dem Programm ‚siRNA-Scan‘ (<http://bioinfo2.noble.org/RNAiScan.htm>) analysiert. Für diese Arbeit wurden die Sequenzen in 21 Nukleotide lange Stücke zerlegt. Diese Stücke wurden entweder mit dem Gersten-Genindex 9.0 vom September 2004 oder mit dem Weizen-Genindex 10.0 vom Januar 2005 verglichen (Quackenbush et al., 2001; <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>). Für alle anderen Parameter wurden die vorgegebenen Einstellungen von ‚siRNA-Scan‘ belassen (Xu et al., 2006).

#### **2.2.1.3 Eclat-Software**

Unter <http://mips.gsf.de/proj/est/classify.jsp> ist ein Programm verfügbar, das den Codongebrauch innerhalb einer Sequenz überprüft. Es wurde speziell für die

Differenzierung zwischen Gersten- und *B. graminis*-Sequenzen geschrieben. Alle Parameter wurden wie vorgegeben gewählt (Friedel et al., 2005).

## 2.2.2 DNA-Isolierung

### 2.2.2.1 Isolation genomischer DNA aus Pilzsporen

Das Protokoll für die DNA-Isolierung aus Pilzsporen wurde von Zierold (2005) abgewandelt. Ausgangsmaterial für die Isolation genomischer DNA waren Konidien von *B. graminis*. Die Konidien wurden von den Pflanzen über Petrischalen abgeschüttelt, gesammelt und in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Bei 14000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5417R) wurden die Konidien in 10 Minuten pelletiert.

Etwa 50 mg Konidienmaterial wurden in 1 ml QBT-Puffer, 10 µg RNase A und 10 µg Proteinase K aufgenommen und dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und in heißem Wasser wieder aufgetaut. Anschließend wurde die Mischung fünf Minuten zentrifugiert (14000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde auf eine mit 2 ml QBT-Puffer equilibrierte Anionenaustauschersäule (Tipp-20, Qiagen) gegeben. Um die an die Anionenaustauschersäule gebundene DNA von den restlichen Bestandteilen zu trennen wurde mit 4 ml QC-Waschpuffer gewaschen. Dann wurde die DNA mit 2 ml QF-Puffer von der Säule gewaschen, mit dem 0,8-fachen Volumen Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (4600 rpm, 40 Minuten, Multifuge 3 S-R; Heraeus, Hanau, Deutschland). Anschließend wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, 10 Minuten getrocknet und in 10 µl TE-Puffer aufgenommen.

<u>QBT-Puffer</u>		<u>QC-Waschpuffer</u>	
750 mM	NaCl	1 M	NaCl
50 mM	MOPS	50 mM	MOPS
	pH 7,0	15% (v/v)	Isopropanol
15% (v/v)	Isopropanol		
0,15% (v/v)	Triton X-100		

<u>QF-Elutions-Puffer</u>		<u>TE-Puffer</u>	
1,25 M	NaCl	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
50 mM	Tris-HCl, pH 8,5	1 mM	EDTA
15% (v/v)	Isopropanol		

### 2.2.2.2 DNA-Isolation aus Pflanzenmaterial

Für die DNA-Isolation aus Pflanzenmaterial wurde das Protokoll von Stewart & Via (1993) abgeändert. Frisches Blattmaterial wurde im flüssigen Stickstoff gemörsert. Etwa 100 mg des Blattpulvers wurden mit 1,2 ml zweifachen CTAB-Puffer versetzt und gründlich mit einem Vortexer durchmischt. Die Mischung wurde bei 65°C für mindestens 30 Minuten inkubiert. Schließlich wurden 800 µl Dichlormethane/Isoamylalcohol (24/1; v/v) zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurde der Ansatz bei 20°C für 15 Minuten geschüttelt. Nach 15 Minuten zentrifugieren bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5417R) wurden 800 µl der oberen Phase abgenommen und mit 5 µl RNase A-Lösung versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die DNA mit 560 µl Isopropanol unter mehrfachem Invertieren gefällt. Anschließend wurde die DNA durch 20 Minuten zentrifugieren bei 13000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde erst mit 700 µl Waschlösung I und anschließend mit 700 µl Waschlösung II gewaschen. Nachdem jeglicher Überstand entfernt worden war, wurde das Pellet für 10 Minuten bei 37°C getrocknet und dann in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

#### 2 x CTAB-Puffer

2% (w/v)	CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)		<u>RNase A-Lösung</u>
200 mM	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mg/ml	RNase A
20 mM	EDTA	10 mM	Natriumacetat pH 5,2
1,4 M	NaCl	100 mM	Tris-HCl pH 7,4
1% (w/v)	PVP (Polyvinylpyrrolidone K30)		

#### Waschlösung I

76% (v/v)	Ethanol
200 mM	Natriumacetat

#### Waschlösung II

76% (v/v)	Ethanol
10 mM	Ammoniumacetat

### 2.2.3 Restriktionsverdau

Ein Kontroll-Restriktionsverdau wurde in dieser Arbeit in 20 µl durchgeführt. Es wurde ungefähr 1 µg DNA eingesetzt und 10 Units Enzym. Der Verdau lief ein bis zwei Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur.

Ein Restriktionsverdau, auf den eine weitere Reaktion wie zum Beispiel eine Ligation folgen sollte, lief in einem 50 µl Ansatz ab. Es wurden bis zu 10 µg DNA eingesetzt und 20 Units

Enzym zugegeben. Die Reaktion lief etwa 16 Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur.

Der Puffer wurde wie vom Hersteller empfohlen eingesetzt. Bei einem Verdau mit mehr als einem Restriktionsenzym wurde für Enzyme von Fermentas die Internetseite <http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html> oder für Enzyme von NEB die Internetseite <http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp> konsultiert und die empfohlenen Angaben befolgt.

### 2.2.4 Standard-PCR

Die PCR-Reaktion lief in einem Volumen von 10  $\mu$ l ab.

<u>PCR mit <i>Taq</i>-Polymerase</u>		<u>PCR mit <i>Pfu</i>-Polymerase</u>	
1 $\mu$ M	Primer I	1 $\mu$ M	Primer I
1 $\mu$ M	Primer II	1 $\mu$ M	Primer II
ca. 100 ng	DNA	ca. 100 ng	DNA
1 x	<i>Taq</i> -Mastermix (Qiagen)	1 x	Reaktionspuffer
		0,5 mM	dNTPs
		1,25 Units	<i>Pfu</i> -Polymerase

#### PCR-Programm

- 1) 95°C 5 Minuten
- 2) 95°C 30 Sekunden Schritt 2) bis 4)
- 3) T<sub>a</sub> 30 Sekunden wurden 29 Mal
- 4) 74°C 1 Minuten wiederholt
- 5) 75°C 10 Minuten
- 6) 4°C

Die *Annealing*-Temperatur (T<sub>a</sub>) wurde etwa 2- 4°C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der Primer gewählt.

## 2.2.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

### 2.2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

3 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* des Stammes DH10B angeimpft. Die Kultur wuchs für 16 Stunden bei 37°C unter schütteln (220 rpm). Mit 600 µl der Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium mit 250 mM MgSO<sub>4</sub> und 250 mM MgCl in einem 1 Liter-Kolben angeimpft. Die Kultur wuchs bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) für ca. zwei Stunden bis sie eine optische Dichte von  $A_{600nm} = 0,4$  (Eppendorf BioPhotometer) erreicht hatte. Dann wurde die Bakteriensuspension 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 3000 rpm bei 4°C abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R). Das Pellet wurde in 10 ml Transformationspuffer I resuspendiert. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut pelletiert (15 Minuten mit 3000 rpm bei 4°C, Heraeus Multifuge 3 S-R). Das Pellet wurde in 4 ml Transformationspuffer II resuspendiert und in 50 µl Aliquots bis zur Verwendung ein -80°C eingefroren.

<u>Transformationpuffer I</u>		<u>Transformationpuffer II</u>	
30 mM	Kaliumacetat	10 mM	MOPS
0,1 M	Rubidiumchlorid	10 mM	Rubidiumchlorid
50 mM	Manganchlorid	75 mM	Calciumchlorid
10 mM	Calciumchlorid	15% (w/v)	Glycerin
pH=5,8 mit verdünnter Essigsäure		pH=7,0	
Sterilfiltrieren (0,2 µm)		Sterilfiltrieren (0,2 µm)	

### 2.2.5.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Die DNA wurde zugegeben, der Ansatz mit der Pipette durchmischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde mit einem Hitzeschock von 20 Sekunden bei 42°C beendet. Nach 2 Minuten abkühlen auf Eis wurde dem Ansatz 200 µl SOC-Medium zugegeben und unter Schütteln für maximal eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agar-Platten ausplattiert, die ein Antibiotikum als Selektionsmarker enthielten, und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

## 2.2.6 Allgemein verwendete Lösungen und Medien

### 2.2.6.1 Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung von DNA

<u>1 x TAE-Laufpuffer</u>		<u>10 x Ladepuffer</u>	
400 mM	Tris-Puffer, pH 7,8	0,01% (w/v)	Bromphenolblau
100 mM	Na-Acetat	10% (v/v)	Glycerin
10 mM	EDTA	1 x	TAE

### 2.2.6.2 Medien für die Bakterienkultur

<u>LB-Medium</u>		<u>SOC-Medium</u>	
10 g/l	Trypton	20 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt	5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl	10 mM	NaCl
pH 7,4		2,5 mM	KCl
1,5% (w/v)	Agar		Autoklavieren
			Steril dazu filtrieren
		10 mM	MgCl <sub>2</sub>
		20 mM	Glukose

Verwendete Selektionsmarker:

Ampicillin-Resistenz: 100 µg Ampicillin /ml LB-Medium

Kanamycin-Resistenz: 50 µg Kanamycin /ml LB-Medium

Spectinomycin-Resistenz: 100 µg Spectinomycin /ml LB-Medium

### 2.2.7 Chemikalien

Chemikalien wurden von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen, sofern dies nicht anders beschrieben wurde.

Primer wurden bei der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) bestellt und sind im Anhang 6.2 aufgeführt.

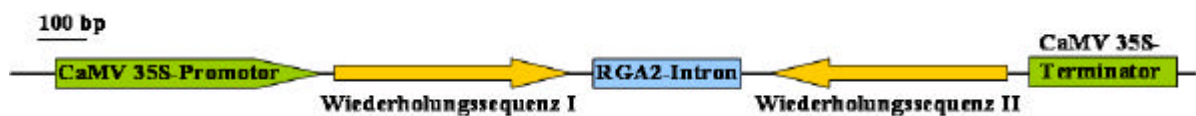
## 2.3 *Transient-induced gene-silencing* – TIGS

Das TIGS-System ist eine Methode, mit welcher die Expression eines Gens mittels RNAi auf Einzelzellebene beeinflusst werden kann. So kann z. Bsp. der Einfluss eines Gens auf das Gersten-Mehltau-System untersucht werden.

Dazu wurde das entsprechende Konstrukt neben dem Reporter-gen  $\beta$ -Glucuronidase (GUS), beide unter der Kontrolle von unterschiedlichen konstitutiv-exprimierenden Promotoren, an Goldpartikel gebunden und mittels biolistischem Gentransfer (Abb. 2.2) in die Epidermis von Getreideblättern gebracht (Kapitel 2.3.2). Drei Tage nach Beschuss fand die Inokulation der Blätter mit Mehltau statt (Kapitel 2.3.3). Der Pilz braucht etwa 48 Stunden um Haustorien und sekundäre Hyphen auszubilden. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Entwicklung des Pilzes untersucht. Die transienten Zellen wurden durch die GUS-Färbung kenntlich gemacht (Kapitel 2.3.4) und ihre Anfälligkeit mit Hilfe des Haustorialen Index bestimmt (Kapitel 2.3.5).

### 2.3.1 Erstellung der RNAi-Haarnadel-Konstrukte

Die Herstellung der RNAi-Haarnadel-Konstrukte wurde wie bei Douchkov et al. (2005) beschrieben mit einem auf dem Gateway-System basierenden Klonierungsverfahren durchgeführt. Für die PCR wurden meist cDNA-Klone (Tab. 6.4) aus der HO cDNA-Bank (Zierold et al., 2005) des IPK, Gatersleben (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/index.php>) eingesetzt. Als Zwischenvektor wurde pIPKTA38 und als Endvektor pIPKTA30N verwendet (Abb. 2.1).



**Abb.2.1: Schematische Darstellung der RNAi-Kassette des pIPKTA30N**

Die RNAi-Kassette wird durch den CaMV 35S-Promotor gesteuert. Die beiden Wiederholungssequenzen entsprechen einem ausgewählten Sequenzbereich des Zielgens. Sie haben beide die gleiche Basenabfolge, sind aber in gegenläufiger Leserichtung zueinander angeordnet. Die beiden Wiederholungssequenzen sind durch das RGA2-Intron aus *Triticum aestivum* verbunden. Der CaMV 35S-Terminator bildet das Ende der RNAi-Kassette.



## 2.3.2 Transiente Expression von RNAi-Konstrukten in Getreideblättern

### 2.3.2.1 Herstellung der sterilen Goldsuspension

27,5 mg Goldpulver (1 µm Korndurchmesser; Bio-Rad, Hercules, USA) wurde in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde gut durchmischt und 20 Sekunden im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde das Gold kurz pelletiert. Dieser gesamte Waschvorgang wurde erneut mit sterilem Wasser und danach mit 100% Ethanol wiederholt. Zum Schluss wurde das Goldpellet bei 50°C für 10 Minuten getrocknet und in sterilem 50%igem Glyzerin aufgenommen.

### 2.3.2.2 Beschichtung der Goldpartikel mit DNA

Zu einer Mischung aus 7 µg Reporter-gen-Vektor (pUbiGUS, Schweizer et al., 1999) und 7 µg Kontrollvektor (pIPKTA30, Douchkov et al., 2005) bzw. RNAi-Konstrukt wurden 2,4 mg sterile Goldpartikel (siehe Kapitel 2.3.2.1) gegeben. Bei den Experimenten mit Weizenblättern wurden außerdem noch 7 µg pU-MLO-Vektor (Überexpressionsvektor für das *HvMLO*-Gen; Shirasu et al., 1999) hinzugefügt. Unter ständigem Durchmischen mit dem Vortexer wurde  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (pH 10,0) tröpfchenweise hinzupipettiert bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Die Suspension wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Durchmischen inkubiert. Das Gold wurde durch kurzes Zentrifugieren (14000 rpm) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet erst mit 70% Ethanol und anschließend mit 100% Ethanol gewaschen. Zum Schluss wurde das Gold in 30 µl 100% Ethanol aufgenommen.

### 2.3.2.3 Biolistischer Gentransfer

Die Goldsuspension wurde gleichmäßig auf sieben Makrocarrier (Bio-Rad), die zuvor in dem Heptaadapter des biolistischen Transformationssystems (Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System; Bio-Rad; Abb. 2.2) eingesetzt worden waren, verteilt. Sieben Tage alte Getreideblätter, die in Petrischalen (9 cm Durchmesser) auf 0,5%igem (w/v) Phytoagar (Duchefa, Haarlem, Niederlande) mit 0,001% (w/v) Bezimidazol lagen (mit der adaxiale Seite nach oben), wurden in einem Abstand von etwa 6 cm zu den Makrocarriern platziert. In der Kammer in der sich die Getreideblätter befanden, wurde ein Vakuum von 27,5 mm Hg angelegt. Mit einem Druck von 900 psi (900 psi Zerrreißscheiben, Bio-Rad)

wurden Goldpartikel mit der daran haftenden DNA in die Epidermiszellen der Blätter eingebracht.

In geschlossenen Petrischalen wurden die Blätter bis zur Inokulation mit Mehltau bei 20°C an einem Nordfenster in einem klimatisierten Labor gelagert (ca.  $30 \mu\text{Mol} * \text{s}^{-2} * \text{m}^{-2}$  Licht). Das natürliche Tageslicht wirkte sich stark hemmend auf die Seneszenz der Blattsegmente aus.



**Abb. 2.2: Biolistisches Transformationssystem, Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System**

Die Zerreißscheibe sitzt in der Zerreißscheibenhalterung. Wenn sie bei einem bestimmten Druck zerreißt, wird die Pressluft durch die sieben ‚Arme‘ der Sprühkopfvorrichtung auf die sieben Makrocarrier im Heptaadapter geleitet. Durch den auftreffenden Druck werden die Makrocarrier, auf deren Unterseite ein Film aus Goldpartikeln haftet, gegen das Stoppgitter geschleudert. Das Gold verlässt die Makrocarrier und dringt in die Epidermiszellen der Getreideblätter ein.

### 2.3.3 Inokulation mit *B. graminis*

Die Gerstenblätter wurden drei Tage nach Beschuss mit *Bgh* inokuliert. Weizenblätter wurden 24 Stunden nach Beschuss mit *Bgt* inokuliert. Dazu wurden sie auf 1%igem (w/v) Phytoagar mit 0,002% (w/v) Benzimidazol in biologischen Testschalen (23 x 23 cm, Schütt, Göttingen, Deutschland) gelegt. Sie wurden mit einer Konidiendichte von ungefähr 150- 200 Konidien/mm<sup>2</sup> inokuliert. Bis zur Färbung wurden die Blätter in den geschlossenen biologischen Testschalen, die zur Belüftung Löcher im Deckel hatten, bei 20°C in einem klimatisierten Labor an einem Nordfenster gelagert.

### 2.3.4 Färbung der transienten Zellen

Ca. 45 Stunden nach der Inokulation mit Mehltau wurde die GUS-Färbung durchgeführt. Dazu wurde von den Blättern an beiden Enden ein halber Zentimeter abgeschnitten, um das Eindringen der X-Gluc-Färbelösung bei der Vakuuminfiltration in das Blatt zu erleichtern.

Die Blätter wurden mit der X-Gluc-Färbelösung in einem Exikator unter Vakuum infiltriert und anschließend bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Um die Färbereaktion zu stoppen und zur Kontrasterhöhung, wurde die X-Gluc-Färbelösung durch Trichloressigsäurelösung ersetzt. Die Blätter wurden für 10 Minuten inkubiert bis sie eine bräunliche Farbe bekamen. Anschließend wurden sie zwei Mal mit Wasser gewaschen und bei 4°C bis zur Auswertung aufgehoben.

#### X-Gluc-Färbelösung

0,1% (w/v)	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuron-Säure (X-Gluc)
20% (v/v)	Methanol
0,1 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,1 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
10 mM	Na-EDTA
0,0001% (v/v)	Triton-X 100
1,4 mM	Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat
1,4 mM	Kaliumhexacyanoferrat (III)
pH	~7,0

#### Trichloressigsäurelösung

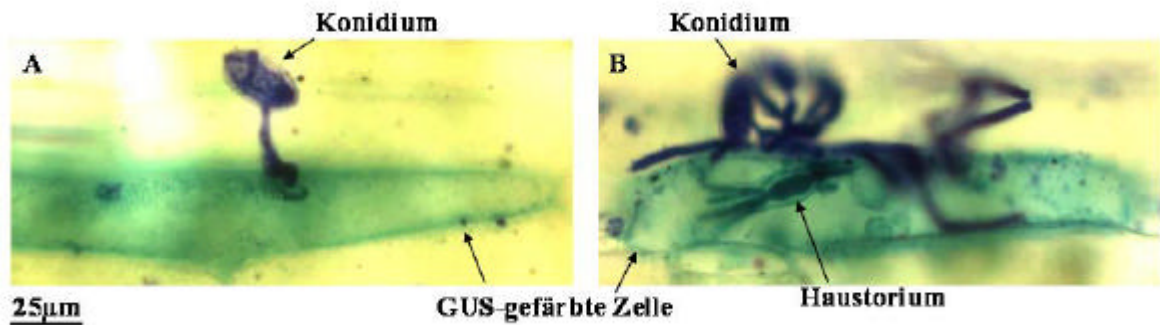
7,5% (w/v)	Trichloressigsäure
50% (v/v)	Methanol

### **2.3.5 Ermittlung der Anfälligkeit der transienten Zellen gegen *B. graminis***

#### **2.3.5.1 Mikroskopische Auswertung der transienten Zellen**

Die beschossenen Getreideblätter wurden unter dem Mikroskop (Axiostar plus; Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) bei 200-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden die GUS-gefärbten Zellen und die vorhandenen Haustorien in den GUS-Zellen gezählt (Abb. 2.3). Daraus wurde der Haustoriale Index berechnet.

$$\text{Haustorialer Index} = \frac{\text{Summe aller Haustorien}}{\text{Summe aller GUS-Zellen}}$$



**Abb. 2.3: Resistente und anfällige Interaktion zwischen Gerste und *Bgh***

A) zeigt eine Mehltau-resistente GUS-gefärbte Gerstenzelle. Das Konidium hat ausgekeimt, konnte aber die Zelle nicht penetrieren und kein Haustorium etablieren. B) zeigt eine anfällige Interaktion. *Bgh* konnte in die Gerstenzelle eindringen und ein Haustorium bilden.

Alle sieben Blätter eines Schusses wurden als eine Einheit ausgewertet. Alle GUS-Zellen bzw. Haustorien dieser sieben Blätter wurden zusammenaddiert und daraus der Haustoriale Index berechnet. Der Haustoriale Index wurde auf zwei Nachkommastellen genau berechnet. Aus allen Schüssen mit dem leeren Vektor eines Experiments (dies waren in der Regel vier Schüsse) wurde ein Mittelwert gebildet. Der Haustoriale Index der unterschiedlichen Konstrukte wurde dazu in Relation gesetzt und so der relative Haustoriale Index in Prozent ermittelt. Dieser gilt als normalisierter Messwert für die Anfälligkeit oder Infektionsrate der Zellen (Douchkov et al., 2005).

### 2.3.5.2 Statistische Auswertung der Mikroskopie-Daten

Lagen für ein RNAi-Konstrukt mindestens fünf unabhängige Experimente vor, wurde mittels Einproben-t-Test (Köhler et al., 2002) untersucht, ob der relative Haustoriale Index statistisch signifikant vom hypothetischen Wert ‚100‘ abwich. Zuvor wurde allerdings ein Ausreissertest nach Grubbs (Grubbs, 1969) durchgeführt. Es wurden nur Werte eliminiert, die nach Grubbs zu mindestens 95% als Ausreißer gewertet wurden.

$$d = y_i - x$$

d = Differenz zum Mittelwert  
 $y_i$  = zu prüfender Wert  
 $x$  = Mittelwert

$$PG = |d_{\max} / s|$$

PG = Prüfgröße als Absolutwert  
 $d_{\max}$  = größte Differenz zum Mittelwert  
 $s$  = Standardabweichung

Bei der statistischen Auswertung wurde mittels zweiseitigem t-Test überprüft, ob die Ergebnisse im Mittel signifikant von der leeren Vektorkontrolle (= 100) abwichen. Der t

Test wurde nur für Konstrukte durchgeführt, für welche auch nach dem Ausreißertest mindestens fünf Werte aus unabhängigen Versuchen vorlagen.

$$t = \frac{(x - 100)}{s / \sqrt{n}} \quad \text{d.f.} = n-1$$

x = Mittelwert  
 s = Standardabweichung  
 n = Anzahl Experiment

Als statistisch signifikant wurden Abweichungen mit einem p-Wert von = 0,05 angesehen.

## 2.4 *Virus-induced gene-silencing* – VIGS

VIGS wurde im Weizenkultivar ‚Kanzler‘ durchgeführt. Die jungen Weizenpflanzen wurden mit dem *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) infiziert (Kapitel 2.4.3). Die  $\gamma$ -RNA enthielt unterschiedliche *Antisense*-Konstrukte gegen pilzliche Gene (Kapitel 2.4.2).

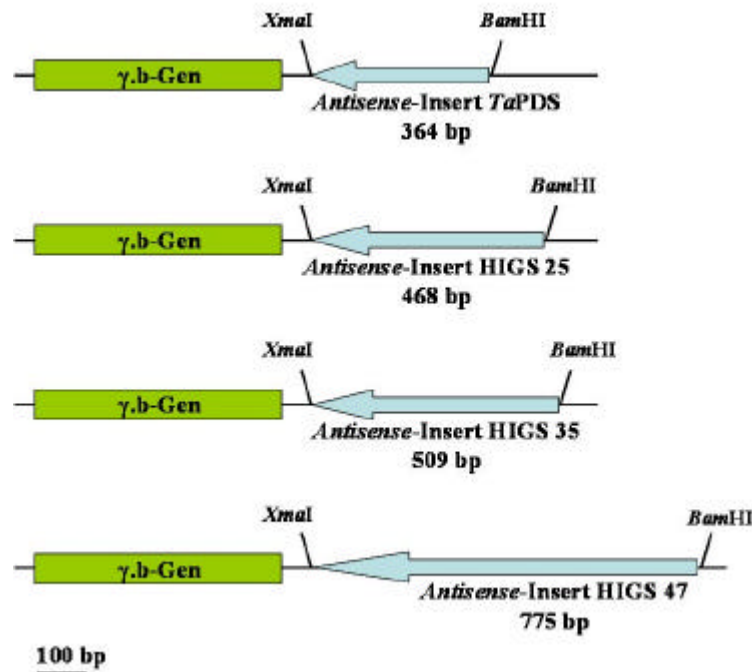
Nachdem BSMV sich in der Pflanze ausgebreitet hatte und die Pflanze die charakteristischen BSMV-Symptome aufwies, wurden die Blätter mit *Bgt* inokuliert. 48 Stunden nach Inokulation wurde mikroskopisch untersucht, ob *Bgt* sich in den Wirtszellen etabliert hatte und wie das Wachstum des Pilzes verlief (Kapitel 2.4.4).

### 2.4.1 Die Kulturbedingungen der Weizenpflanzen

Die Weizenpflanzen für die VIGS-Experimente wurden in Klimaschränken (TYP MLR 350H, Sanyo) in Plastikpflanztöpfen (11 cm x 11 cm x 12 cm) mit IPK-Erde kultiviert. In die nasse Erde wurden pro Topf vier ca. 1,5 cm tiefe Löcher gedrückt und in jede Vertiefung wurde ein Weizenkorn gelegt und mit Erde bedeckt. Die Pflanzen wuchsen während der 16-stündigen Lichtperiode bei 25°C. Die Temperatur während der Dunkelperiode betrug 20°C. In dem Klimaschrank herrschte eine relative Luftfeuchtigkeit von 60%.

### 2.4.2 Klonierung der *Antisense*-Konstrukte

Für die VIGS-Versuche mit BSMV und dem *Triticum aestivum* subsp. *aestivum* Kultivar ‚Kanzler‘ wurden für ausgewählte Kandidatengene *Antisense*-Konstrukte erstellt (Abb. 2.4).



**Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Antisense-Konstrukte im pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS-Vektor**

In 3'-Richtung hinter das  $\gamma$ .b-Gen wurde das Antisense-Insert des entsprechenden Konstrukts kloniert. Dafür wurden die *XmaI* und *BamHI*-Restriktionsstellen der *Multiple cloning site* des pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS-Vektor genutzt.

Der 5'-Primer wurde am 5'-Ende mit einem Adapter für eine *BamHI*-Schnittstelle versehen. Der 3'-Primer wurde am 5'-Ende mit einem Adapter für eine *XmaI*-Schnittstelle versehen. Die vollständige Primerliste ist in Tabelle 6.16 aufgeführt.

Es wurde eine Standard-PCR mit *Pfu*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.4). Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* (Fermentas) und *XmaI* (NEB, Ipswich, USA) im Puffer NEB 4 verdaut. Anschließend wurde der Restriktionsansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit dem ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers eluiert.

Der pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS-Vektor (Bruun-Rasmussen et al., 2007) wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* (Fermentas) und *XmaI* (NEB) verdaut und anschließend in einem 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt. Der linearisierte Vektor wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ (Qiagen) nach Anleitung aus dem Gel extrahiert.

Die Ligation des geschnittenen PCR-Produkts in den pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS-Vektor wurde nach Anleitung des Herstellers mit der T4-DNA-Ligase von Fermentas durchgeführt. Mit dem fertigen Ligationsprodukt wurden chemisch-kompetente *E. coli* vom Stamm DH10B transformiert (siehe Kapitel 2.2.5.2) und über die Ampicillin-Resistenz des pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS-Vektors selektiert.

## 2.4.3 Infektion der Weizenpflanzen mit BSMV

### 2.4.3.1 Linearisierung der Plasmide

Zuerst wurde die Vektor-DNA linearisiert. In Tabelle 2.1 sind die für den jeweiligen Vektor verwendeten Restriktionsenzyme aufgeführt.

**Tab. 2.1: Restriktionsenzyme zur Linearisierung der Plasmide**

Vektor	Restriktionsenzym
pT7-BSMV- $\alpha$ (Petty et al., 1989)	<i>Mlu</i> I
pT7-BSMV- $\beta$ . $\Delta\beta$ a (Petty et al., 1989)	<i>Spe</i> I
pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS	<i>Mlu</i> I
pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS25as (Abb.2.4)	<i>Mlu</i> I
pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS35as (Abb.2.4)	<i>Mlu</i> I
pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS47as (Abb.2.4)	<i>Mlu</i> I
pT7-BSMV- $\gamma$ .TaPDSas (Abb.2.4)	<i>Mlu</i> I

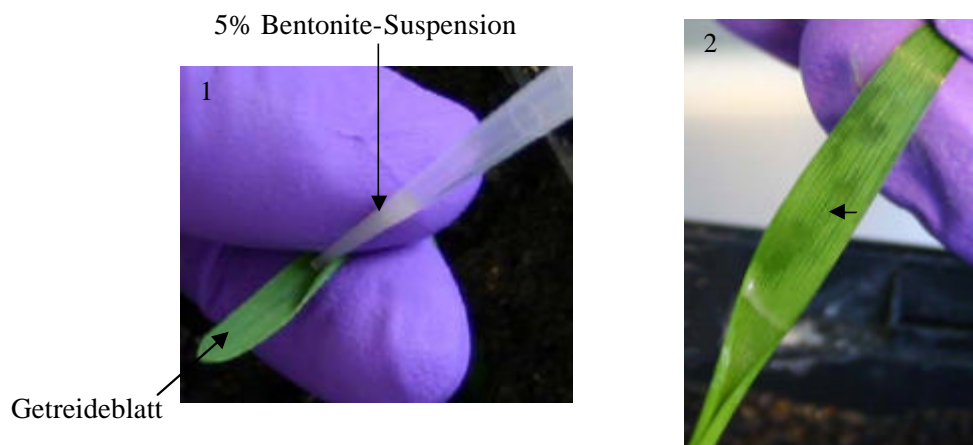
Um das Restriktionsenzym anschließend wieder aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde die DNA aufgereinigt. Der Restriktionsansatz wurde mit EDTA (Endkonzentration 25 mM), Natriumacetat (Endkonzentration 0,3 M) und Ethanol (Endkonzentration 50%) versetzt. Die DNA wurde bei -20°C für mindestens 15 Minuten gefällt und anschließend für 15 Minuten bei 14000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C für 10 Minuten getrocknet und in 10 mM Tris-Puffer, pH 8,0 resuspendiert und für die *in vitro*-Transkription eingesetzt.

### 2.4.3.2 *in vitro*-Transkription

Für die *in vitro*-Transkription wurde das ‚mMessage mMachine high yield capped RNA transcription T7 Kit‘ (Ambion, Austin, USA) verwendet und die *in vitro*-Transkription nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### 2.4.3.3 Infektion der Pflanzen mit BSMV

Die Weizenpflanzen waren zum Zeitpunkt der Infektion mit BSMV fünf Tage alt und durchschnittlich 6 cm groß. Das Primärblatt wurde zwischen Daumen und Zeigefinger gelegt (mit der adaxialen Seite nach oben). Unter den Daumen wurden 20  $\mu$ l 5% Bentonite-Suspension gegeben (Abb. 2.5, Bild 1). Das Blatt wurde mit der Suspension eingerieben bis dunkle Streifen auf dem Blatt entstanden (Abb. 2.5, Bild 2).



#### Abb. 2.5: Infektion der Getreidepflanzen mit BSMV

Zunächst wird die Bentonite-Suspension zwischen Daumen und Zeigefinger auf das Blatt gegeben (Bild 1). Nach dem Einreiben zeigen sich dunkle Streifen auf dem Blatt (Pfeil, Bild 2).

Die drei verschiedenen Virus-RNA-Sorten ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -RNA) wurden im Verhältnis 1:1:1 gemischt. 6  $\mu$ l des Virus-Gemisches wurden auf die mit Bentonite vorbehandelte Blattoberfläche verteilt und eingerieben. Das Blatt wurde kurz mit Wasser abgewaschen, um das restliche Bentonite zu entfernen.

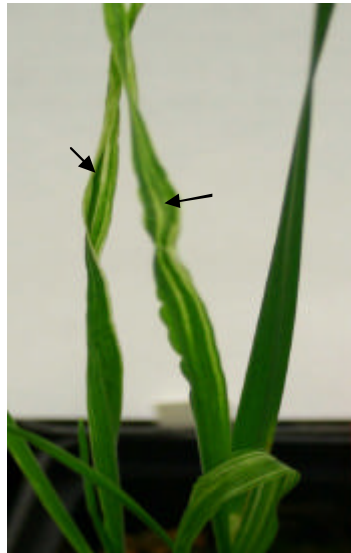
Bis zum Beginn der nächsten Lichtperiode wurden die Weizenpflanzen in den Kulturschränken im Dunklen gehalten. Anschließend wurden sie wieder unter den in Kapitel 2.4.1 genannten Bedingungen kultiviert.



## 2.4.4 Test auf Anfälligkeit gegenüber *Bgt*

### 2.4.4.1 Ernte der BSMV-infizierten Blätter

Es wurden nur Blätter von Pflanzen geerntet, die BSMV-typische Symptome aufwiesen (Abb. 2.6). Das Primärblatt und das Sekundärblatt wurden nicht verwendet. Die restlichen Blätter des Haupttriebes und der Seitentriebe wurden 17 bis 19 Tage nach der Virusinfektion geerntet. Die circa 6 cm langen Blattsegmente wurden auf 1%igem Phytoagar mit 0,002% Benzimidazol in biologische Testschalen (23 x 23 cm) gelegt und mit einer Sporendichte von etwa 10 bis 15 *Bgt*-Konidien pro Quadratmillimeter inokuliert. Bis zur Färbung wurden die Blätter in den biologischen Testschalen bei geschlossenem Deckel an einem Nordfenster bei 22°C gelagert. Zur Belüftung befanden sich Löcher im Deckel.



**Abb. 2.6: Weizenpflanze mit BSMV-Symptomen**

Die hellgrünen bis weißen Streifen (Pfeile) auf den Blättern sind typische Symptome, die durch BSMV hervorgerufen werden.

### 2.4.4.2 Färbung des Pilzes

Um die Färbbarkeit des Pilzes zu erhöhen, wurden die Blätter in einer Lösung aus 20% Methanol und 0,1% Triton X-100 unter Vakuum infiltriert. In dieser Lösung wurden sie für 24 Stunden bei 37°C inkubiert (Seiffert & Schweizer, 2005).

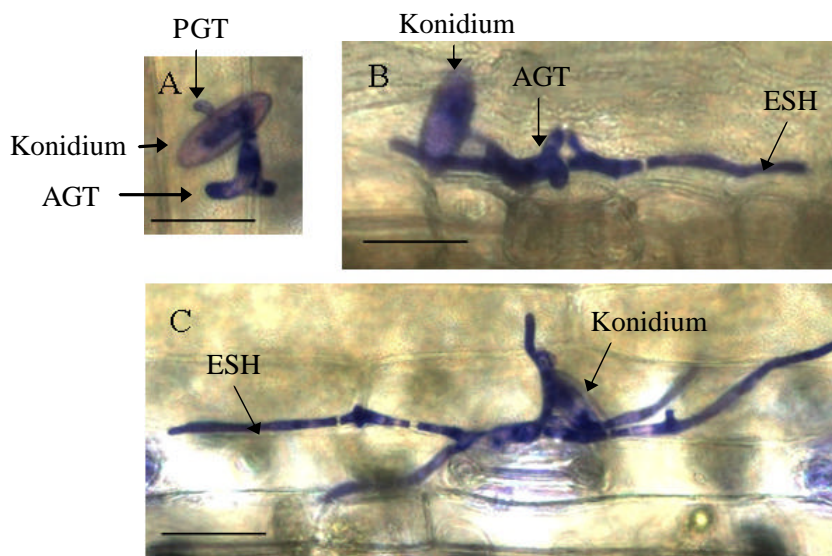
Vor der Coomassie-Färbung wurden die Blätter 10 Minuten in Trichloressigsäurelösung (siehe Kapitel 2.3.4) inkubiert. Dann wurden die Pilzstrukturen sieben Minuten mit Coomassie-Lösung gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde durch zweimaliges Waschen mit Wasser entfernt. Die Blätter wurden bis zur Auswertung bei 4°C in Wasser aufbewahrt.

Coomassie-Färbelösung

0,3% (w/v)	Coomassie R250
7,5% (w/v)	Trichloressigsäure
50% (v/v)	Methanol

**2.4.4.3 Auswertung der VIGS-Experimente****2.4.4.3.1 Mikroskopische Auswertung**

Über das Blatt verteilt wurden mehrere Gesichtsfelder bei 200facher Vergrößerung (Axiostar plus; Carl Zeiss AG) ausgewertet bis etwa 100 Konidien erfasst waren. Die gezählten Konidien wurden in drei Kategorien unterteilt: A) Konidien mit sekundärem Keimschlauch (AGT) aber ohne elongierende sekundäre Hyphe (ESH), B) Konidien mit kurzen ESH und C) Konidien mit langen ESH (Abb. 2.7). Dabei wurden ESH als kurz betrachtet, wenn sie maximal die fünffache Länge eines Mehltau-Konidiums aufwiesen.



**Abb. 2.7: Die Konidien wurden bei der Auswertung der VIGS-Experimente in drei Klassen eingeteilt.**

A: Das Konidium hat einen primären Keimschlauch (PGT) und einen sekundären Keimschlauch (AGT) ausgebildet. Es sind keine elongierende sekundäre Hyphe (ESH) entstanden. B: Das Konidium hat einen AGT ausgebildet. Davon gehen in mehrere Richtungen ESH aus. Diese haben eine Gesamtlänge, die etwa der fünffachen Konidienlänge entspricht. C: Es haben sich mehrere ESH gebildet, deren Gesamtlänge den Grenzwert der fünffachen Konidienlänge deutlich überschreitet. Der Messbalken in der linken unteren Ecke jedes Bildes entspricht etwa 25µm.

#### **2.4.4.3.2 Statistische Auswertung**

Pro Experiment wurde aus den Ergebnissen aller Blättern, die mit dem pT7-BSMV- $\gamma$ -MCS-Kontrollvektor infiziert waren, ein Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert entsprach 100%. Die Werte von jedem anderen Blatt wurden einzelnen dazu in Relation gesetzt. Für jede Kategorie wurde pro Konstrukt ein Mittelwert erstellt. Im Wilcoxon-Rangsummen-Test (Wilcoxon, 1945) wurde ermittelt, ob dieser Mittelwert signifikant von 100 abwich. Der Test wurde mit der GraphPad InStat-Software (Version 3.06 für Windows, GraphPad Software, San Diego USA) durchgeführt.

Als statistisch signifikant wurden Abweichungen mit einem p-Wert von  $\leq 0,05$  angesehen.

### **2.5 Transgene Pflanzen**

Gerstenpflanzen des Kultivars ‚Golden Promise‘ wurden mit einem RNAi-Konstrukt (Kapitel 2.5.1), welches unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus *Zea mays* (Himmelbach et al., 2007) steht, transformiert (Kapitel 2.5.2).

In der T<sub>1</sub>-Generation wurde bei mehreren transgenen Linien die Anfälligkeit gegen *Bgh* analysiert. Makroskopisch wurde das Pilzwachstum sieben Tage nach Inokulation betrachtet (Kapitel 2.5.4.1). Mikroskopisch wurde die Infektionsrate zwei Tage nach Inokulation untersucht (Kapitel 2.5.4.2).

#### **2.5.1 Herstellung der RNAi-Konstrukte**

Das für die Transformation eingesetzte Konstrukt gleicht dem in den TIGS-Experimenten verwendeten Konstrukt HIGS 47.2. Die RNAi-Haarnadel-Sequenz ist in beiden Fällen die gleiche, da beide Konstrukte basierend auf dem gleichen Zwischenvektorkonstrukt erstellt wurden. Als RNAi-Vektor wurde in diesem Fall der pIPKb007 mit der *Accession*-Nummer EU161573 (Himmelbach et al., 2007) verwendet und die LR-Reaktion wie bei Douchkov et al. (2005) beschrieben durchgeführt. Das für die Transformation verwendete Konstrukt bekam die ID pIPKb007\_HIGS 47.2 (Abb. 2.8).



**Abb. 2.8: Schematische Darstellung der RNAi-Kassette des Konstruktes pIPKb007\_HIGS 47.2**  
Die RNAi-Kassette wird durch den *ZmUbi1*-Promotor gesteuert. Die beiden Wiederholungssequenzen entsprechen einem ausgewählten Sequenzbereich des Gens HIGS 47 und haben jeweils eine Länge von 833 Basen. Sie haben beide die gleiche Basenabfolge, sind aber in gegenläufiger Leserichtung zueinander angeordnet. Die beiden Wiederholungssequenzen sind durch das RGA2-Intron aus *Triticum aestivum* verbunden. Der CaMV 35S-Terminator bildet das Ende der RNAi-Kassette.

## 2.5.2 Herstellung der transgenen Pflanzen

Die Herstellung der transgenen Pflanzen wurde von Dr. Götz Hensel aus der Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie am IPK, Gatersleben durchgeführt (Hensel und Kumlehn, 2004).

## 2.5.3 Anzucht der transgenen Pflanzen

Für alle Versuche wurden Pflanzen der T<sub>1</sub>-Generation verwendet. Das Saatgut der transgenen Pflanzen keimte auf feuchten Papiertüchern. Zuvor wurden die Samenkörner Oberflächensterilisiert. Dazu wurden sie erst fünf Minuten in 70%igem Ethanol, dann für 15 Minuten in 0,8%iger Natriumhypochloritlösung gewaschen und schließlich mehrfach mit Wasser gespült. Bevor das Saatgut auf die feuchten Papiertücher gelegt wurde, wurde es 16 Stunden bei 4°C in 10 µM Benzylaminopurin inkubiert. Nach drei bis vier Tagen auf Papiertüchern wurden die kleinen Pflanzen in Erde gesetzt. Danach wuchsen sie in Paletten zu 54 Pflanzen. Jede Pflanze hatte einen Topf mit dem Durchmesser von 5 cm zur Verfügung.

## 2.5.4 Test auf Anfälligkeit der transgenen Gersten gegen *Bgh*

### 2.5.4.1 Bonitur

Die Pflanzen wuchsen auf Paletten à 54 Pflanzen. Jede Pflanze hatte einen Topf mit 5 cm Durchmesser zur Verfügung. Für die Bonitur wurden die Pflanzen im Alter von 17 bis 18 Tagen in einem Inokulationsturm mit *Bgh* infiziert. Dabei wurden von vier Seiten Mehltau-Konidien jeweils von einem stark infizierten Blatt eingeblasen. Dies entsprach einer Konidiendichte von 10 bis 15 Konidien pro Quadratmillimeter. Die Bonitur wurde sieben Tage später am Tertiärblatt durchgeführt. Es wurde immer die stärker infizierte Seite des

Blattes bonitiert und nach dem Vier-Klassen-Boniturschema (Schweizer et al., 1995) bewertet.

<u>Klasse</u>	<u>mit Myzel bedeckte Blattoberfläche</u>
1	0 bis 5%
2	6 bis 25%
3	26 bis 50%
4	51 bis 100%

Anschließend wurde berechnet, wie groß der Anteil der durchschnittlich infizierten Blattoberfläche war.

#### mittlere infizierte Blattoberfläche

$$\text{miB} = (n_{\text{Klasse 1}} \times 2,5 + n_{\text{Klasse 2}} \times 15,5 + n_{\text{Klasse 3}} \times 38 + n_{\text{Klasse 4}} \times 75,5) / n_{\text{Gesamt}}$$

Dabei gibt n die Anzahl der Pflanzen in der entsprechenden Klasse bzw. die Gesamtzahl aller Pflanzen ( $n_{\text{Gesamt}}$ ) an.

Für den Vergleich der Daten aus den einzelnen Versuchen wurde die miB der Pflanzen einer Linie immer auf die miB der Wildtyp-Pflanzen normalisiert, die auf derselben Palette gewachsen waren.

Mit einem zweiseitigem t-Test wurde überprüft, ob die Ergebnisse wiederholter Inokulationsexperimente signifikant von der leeren Vektorkontrolle (= 100) abweichen. Als statistisch signifikant wurden Abweichungen mit einem p-Wert von = 0,05 angesehen (siehe auch Kapitel 2.3.5.2).

### **2.5.4.2 Mikroskopische Auswertung**

Für die Mikroskopie wurde von 17 bis 18 Tage alten Pflanzen das Sekundärblatt geerntet. Die circa sechs Zentimeter langen Blattsegmente wurden auf 1%igem Phytoagar mit 0,002% Benzimidazol in biologischen Testschalen (23 x 23 cm) gelegt und mit einer Sporendichte etwa 10 bis 15 *Bgh*-Konidien pro Quadratmillimeter inokuliert. Bis zur Färbung wurden die Blätter in den biologischen Testschalen bei geschlossenem Deckel an einem Nordfenster bei 22°C gelagert. Zur Belüftung befanden sich Löcher im Deckel.

Die Färbung des Pilzes wurde wie in Kapitel 2.4.4.2 beschrieben durchgeführt. Für die Auswertung wurden, ähnlich wie in Kapitel 2.4.4.3.1, über das Blatt verteilt wurden mehrere Gesichtsfelder bei 200facher Vergrößerung (Axiostar plus; Carl Zeiss AG) betrachtet bis

etwa 100 Konidien erfasst waren. Die gezählten Konidien wurden in zwei Kategorien unterteilt: A) Konidien mit sekundärem Keimschlauch (AGT) aber ohne elongierende sekundäre Hyphe (ESH) (Abb. 2.7, A) oder B) Konidien mit ESH (Abb. 2.7, B und C). Die statistische Auswertung erfolgte wie unter 2.4.4.3.2 beschrieben.

### **2.5.5 Ernte von *Bgh* von der Blattoberfläche**

Um den Einfluss des Transgens auf das Transkriptom des Pilzes zu untersuchen, wurden die epiphytischen Pilzstrukturen von den Gerstenblättern geerntet. Wurde der Pilz drei Tage nach Inokulation geerntet, wurden circa 6 cm langen Blattsegmente des Primärblattes auf 1%igem Phytoagar mit 0,002% Benzimidazol in biologischen Testschalen (23 x 23 cm) gelegt und mit einer Sporendichte mindestens 250 *Bgh*-Konidien pro Quadratmillimeter inokuliert. Bis zur Ernte wurden die Blätter in den biologischen Testschalen bei geschlossenem Deckel an einem Nordfenster bei 20°C gelagert. Zur Belüftung befanden sich Löcher im Deckel.

Wurde der Pilz dreizehn Stunden bzw. acht Tage nach Inokulation geerntet, wurde die gesamte Pflanze, die sich noch in der Erde befand, inokuliert. Die Pflanzen wurden mit einer Sporendichte von mindestens 250 *Bgh*-Konidien pro Quadratmillimeter inokuliert. Bis zur Ernte des Pilzes wurden die Pflanzen in einem klimatisierten Labor an einem Nordfenster bei 20°C weiter kultiviert.

Die Ernte des Pilzes und die anschließende RNA-Isolierung wurden wie in Kapitel 2.8 beschrieben durchgeführt.

### **2.6 Transkriptanalyse in Einzelzellen der Gerstenepidermis**

Gerstenpflanzen (Kultivar ‚Golden Promise‘) wurden im Alter von sieben Tagen mit *Bgh* inokuliert. Nach 48 Stunden wurde aus einzelnen Zellen Proben mit einer Glaskapillare ( $\varnothing$  0,1  $\mu$ m) genommen. Die Proben aus jeweils 10 Zellen wurden zusammen in 1  $\mu$ l RNAsin (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgenommen. Der gesamte Ansatz wurde zur cDNA-Synthese mit ‚Superscript II Reverse Transcriptase‘ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers eingesetzt (Brandt et al., 1999).

Die Hälfte der cDNA-Reaktion wurde in eine Vor-PCR eingesetzt, die bei einer Annealing-Temperatur von 57°C über 10 Zyklen lief. Ansonsten glich das Protokoll der Standard-PCR (siehe Kapitel 2.2.4). Dieser PCR-Ansatz wurde über eine QiaElute-Platte (Qiagen)

aufgereinigt, um die noch in dem Reaktionsansatz vorhandenen Primer zu entfernen. Mit *nested*-Primern wurden mit 1/10 Volumen der Vor-PCR eine Standard-PCR bei einer *Annealing*-Temperatur von 56°C durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.4).

## 2.7 Analyse der Expression mit Hilfe der *Northern Blot*-Technik

### 2.7.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus dem Pflanzenmaterial erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini-Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers.

### 2.7.2 Elektrophoretische Auftrennung der RNA

Für den *Northern Blot* wurde ein denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel (1% (w/v) Agarose in 1 x RB-Puffer) gegossen. Nach dem Aushärten wurde an das unbeladene Gel in 1 x RB-Puffer für etwa 5 Minuten eine Spannung von 6 Volt/ cm angelegt.

7 µg RNA wurden im Verhältnis 1/1 (v/v) mit Denaturierungspuffer versetzt und für 5 Minuten bei 65°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen im Eis wurden die Proben mit 2 µl Ladepuffer versetzt und das Gel damit beladen. Bei einer Spannung von 6 Volt/ cm wurden die Proben in 1 x RB-Puffer, versetzt mit 6% (v/v) Formaldehyd, elektrophoretisch aufgetrennt.

<u>10 x RB-Puffer</u>		<u>Denaturierungspuffer</u>	
200 mM	MOPS	4 mM	EDTA, pH 8,0
50 mM	Na-Acetat	2,6% (v/v)	Formaldehyd
10 mM	EDTA	31% (v/v)	Formamid
	pH 7,0	1 x	10 x RB-Puffer

### 2.7.3 Aufbau des *Northern Blots*

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA wurde das Gel mehrere Male mit Wasser abgespült. Anschließend wurde es für etwa 20 Minuten in 0,05 N NaOH unter leichtem Schwenken inkubiert und kurz mit 10 x SSC abgespült.

Die für den *Northern Blot* verwendete Hybond-N-Nylonmembran (Amersham, Buckinghamshire, UK) wurde kurz in DEPC-H<sub>2</sub>O angefeuchtet und dann mindestens 15 Minuten in 10 x SSC unter leichtem Schwenken inkubiert.

Für den *Northern Blot* wurde eine Brücke aus drei Lagen Blotting-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) angefertigt. Diese wurde auf ein Podest gelegt, so dass nur die beiden Enden in der Blotschale lagen. Dann wurde sie mit 10 x SSC befeuchtet. Auf die Brücke wurde das Gel mit der Unterseite nach oben gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich zwischen dem Gel und der Brücke keine Luftblasen befanden. Auf das Gel wurde luftblasenfrei die Membran und auf die Membran vier mit 10 x SSC befeuchtete Stücke Blotting-Papier, die die Größe der Membran hatten, aufgelegt. Darauf folgte ein Stapel trockener saugfähiger Papiertücher. Zum Beschweren wurde ein Gewicht (etwa 0,5 kg) auf den Blotaufbau gestellt. Die Blotschale wurde mit 10 x SSC als Übertragungspuffer gefüllt. Die Übertragung dauerte ca. 16 Stunden (Sambrook & Russel, 2001). Die Membran wurde kurz luftgetrocknet und anschließend für ca. zwei Stunden bei 80°C gebacken.

20 x SSC

3 M NaCl  
0,3 M Na-Citrat  
pH 7,0

## 2.7.4 Hybridisierung der RNA mittels radioaktiv-markierter Sonde

### 2.7.4.1 Radioaktive Markierung der Sonde

Der Einbau des <sup>32</sup>P-markierten dCTP (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) in die Sonde wurde mit dem ‚Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System‘ (GE Healthcare) nach Anleitung des Hersteller durchgeführt. Die radioaktiv-markierte Sonde wurde mit Hilfe der ‚illustra MicroSpin‘ Säulen (GE Healthcare) von nicht-integrierten Nukleotiden getrennt. Die gereinigte Sonde wurde für 5 Minuten denaturiert.

Die Membran wurde in Church-Puffer bei 65°C für mindestens eine Stunde mit 200 µg denaturiertem Lachssperma /ml Puffer vorhybridisiert.

1 M Natriumphosphat-Puffer

1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
mit 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6,8 einstellen



Church-Puffer

0,5 M	Natriumphosphat-Puffer
7% (w/v)	SDS
1 mM	Na-EDTA

**2.7.4.2 Hybridisierung der RNA**

Zu 7 ml Church-Puffer (mit 200 µg denaturiertem Lachssperma /ml Puffer) wurden 20 µl radioaktiv-markierte, denaturierte Sonde gegeben. Die Membran wurde für etwa 16 Stunden hybridisiert.

**2.7.4.3 Waschung der Membran**

Die Membran wurde 30 Minuten bei 65°C und zweimal 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

Waschpuffer

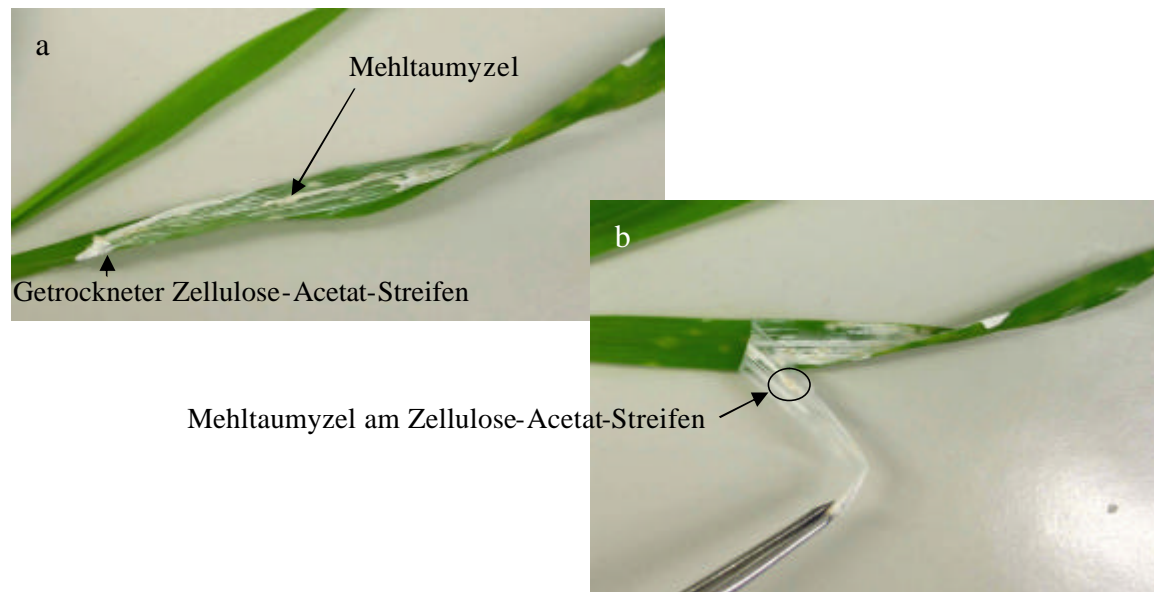
80 mM	Natriumphosphat-Puffer
1%	SDS
2 mM	EDTA (pH 8,0)

Die Membran wurde in der Regel zwei Wochen lang bei Raumtemperatur exponiert. Der Exponierfilm wurde im Phosphoimager BAS2000 (Fuji, Tokio, Japan) mit den Einstellungen 16 Bit pro Pixel und 50µm Pixelgröße eingescannt.

Anschließend wurde die Membran fünf Minuten in heißem 0,1%igem SDS gewaschen, um die Sonde wieder zu entfernen.

**2.8 Ernte der epiphytischen Pilzstrukturen von Getreideblättern****2.8.1 Pilzernte mit Zellulose-Acetatlösung**

Um aus dem Mehltau, der auf dem Pflanzen gewachsen war, RNA zu extrahieren, wurde er mit Zellulose-Acetat von den Blättern geerntet. Dazu wurde eine 5% Zellulose-Acetatlösung mit Aceton hergestellt und mit einem Pinsel auf die Blätter aufgetragen. Nach dem Trocknen wurden die Streifen abgezogen (Abb. 2.9) und in flüssigem Stickstoff eingefroren (Zhang and Gurr, 2001).



**Abb. 2.9: Pilzernte mit Zellulose-Acetat**

Nach dem Auftragen auf die Blattoberfläche trocknete das Zellulose-Acetat zu einem transparenten bis weißem Streifen (Bild a). Dieser Streifen ließ sich einfach mit einer Pinzette abziehen (Bild b) Das Pilzmyzel blieb am Zellulose-Acetat hängen.

### 2.8.2 RNA-Isolation aus Pilzmaterial von Zellulose-Acetat-Streifen

Für die RNA-Isolierung wurden die Zellulose-Acetat-Streifen mit dem anhaftenden Mehltaumyzel in flüssigem Stickstoff gemörsert. Aus dem Pulver wurde mit dem NucleoSpin RNA II-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers RNA isoliert. Die RNA wurde mit dem ‚iScript cDNA Synthesis‘ Kit (Bio-Rad) nach Anleitung des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

## 2.9 Real time-PCR

### 2.9.1 PCR-Ansatz

Die *real time*-PCR wurde mit dem *Power SYBR Green PCR Master Mix* im 7900HT *fast real time*-PCR System durchgeführt und mit der Software SDS 2.2.1 (alle Chemikalien und Software von Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgewertet.

Es wurde eine quantitative *real time*-PCR mit Standardkurven durchgeführt. Ein *real time*-PCR-Experiment bestand aus einer 384-Platte auf der sich neben den eigentlichen PCR-Reaktionen immer eine Standardkurve für jedes eingesetzt Primerpaar befand. Für die Standardkurven wurden Verdünnungsreihen in 1:2-Verdünnungsschritten angesetzt, wobei die erste Probe die unverdünnte cDNA enthielt und die letzte eine cDNA-Konzentration von

0,03125 aufwies. Alle Ansätze wurden in dreifacher Wiederholung pipettiert (Abb. 2.10). Dabei wurde die cDNA für jede Reaktion einzeln pipettiert und anschließend ein Mastermix bestehend aus 5  $\mu$ M 5'-Primer, 5  $\mu$ M 3'-Primer und einfach konzentriertem *Power SYBR Green PCR Master Mix* hinzugegeben. Die PCR wurde in einem 10  $\mu$ l Ansatz durchgeführt.

Standard-Kurve Gen 1	Gen 1 c = 1	Gen 1 c = 1	Gen 1 c = 1	Gen 1 c = 0,5	Gen 1 c = 0,5	Gen 1 c = 0,5	Gen 1 c = 0,25	Gen 1 c = 0,25	etc.
Standard-Kurve Gen 2	Gen 2 c = 1	Gen 2 c = 1	Gen 2 c = 1	Gen 2 c = 0,5	Gen 2 c = 0,5	Gen 2 c = 0,5	Gen 2 c = 0,25	Gen 2 c = 0,25	etc.
	Gen 1 cDNA 1	Gen 1 cDNA 1	Gen 1 cDNA 1	Gen 1 cDNA 2	Gen 1 cDNA 2	Gen 1 cDNA 2	etc.		
	Gen 2 cDNA 1	Gen 2 cDNA 1	Gen 2 cDNA 1	Gen 2 cDNA 2	Gen 2 cDNA 2	Gen 2 cDNA 2	etc.		

**Abb. 2.10:** Schema eines *real time*-PCR-Experiments

#### PCR-Programm

- 1) 50°C 2 Minuten
  - 2) 95°C 10 Minuten
  - 3) 94°C 15 Sekunden
  - 4) 56°C 30 Sekunden
  - 5) 72°C 30 Sekunden
  - 6) 95°C 15 Sekunden
  - 7) 60°C 15 Sekunden
  - 8) 95°C 15 Sekunden
- Schritt 3) bis 5)  
39 Mal wiederholen

Die Datenerfassung erfolgte während der Schritte 5) und 8) und zwischen Schritt 7) und 8).

### **2.9.2 Auswertung der *real time*-PCR**

Zunächst wurde mit den Messwerten der drei Wiederholungen eines Ansatzes ein Grubbs-Ausreißertest durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.5.2). Alle Werte, die nach Grubbs zu mindestens 95% ein Ausreißer waren, wurden eliminiert.

Die SDS 2.2.1-Software berechnete mittels der Standardkurven die Konzentration in den einzelnen Reaktionen. Aus den drei Replikaten eines Ansatzes wurde ein Mittelwert berechnet. Alle Werte der zu untersuchenden Gene wurden auf eine Monoglyceridlipase (*Accession*-Nummer AW788348) aus *B. graminis* normalisiert, da dieses Gen während des Verlaufs der Wirt-Pathogen-Interaktion eine stabile Transkriptabundanz zeigt (Both et al., 2005a).

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Klassifizierung der TIGS-Kandidaten mittels blast-Analysen

Für die Experimente im TIGS-System standen RNAi-Haarnadel-Konstrukte basierend auf 265 unterschiedlichen EST-Sequenzen der HO EST-Bank des IPK, Gatersleben (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/menu.php>; Künne et al., 2005) zur Verfügung. Die HO EST-Bank besteht aus cDNA-Klonen, die auf RNA-Sequenzen aus Blattepidermis von Gerstenpflanzen basieren, welche mit *Blumeria graminis f. sp. hordei* (Bgh) und *Blumeria graminis f. sp. tritici* (Bgt) infiziert worden waren (Zierold et al., 2005). Somit sind in dieser EST-Bank sowohl pilzliche als auch pflanzliche Transkripte enthalten. Um die Kandidaten für die TIGS-Experimente in pilzliche und pflanzliche Transkripte zu unterteilen, wurden megablast-Analysen gegen EST-Sequenzen (von allen Organismen außer Mensch und Maus: 'est\_others') bei <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (,NCBI', Wheeler et al., 2007) durchgeführt. Dies sollte in erster Linie zur Unterscheidung zwischen pilzlichen und pflanzlichen Transkripten beitragen und nicht dazu dienen dem Zielgen des RNAi-Konstrukts eine Funktion zuzuordnen. Daher sind nur die drei blast-Resultate mit den niedrigsten e-Werten für jeden Kandidaten aufgelistet, und es wird nur der e-Wert und der Organismus, aus dem die entsprechende EST-Sequenz stammt, betrachtet (Tab. 6.1 und 6.2). Neben den megablast-Analysen bei NCBI wurden auch blastN-Analysen bei <http://cogeme.ex.ac.uk/blast.html> (,Cogeme', Soanes et al., 2002) durchgeführt. Die blast-Resultate von Cogeme sollten die Erkennung der pilzlichen Gene erleichtern, besonders wenn NCBI nur Resultate aus Datenbanken aus pilzinfiziertem Pflanzengewebe lieferte.

#### 3.1.1 Kriterien zur Klassifizierung der Kandidaten

Alle Kandidaten, für die durch blast-Analysen bei NCBI oder Cogeme eine EST-Sequenz pilzlichen Ursprungs mit einem e-Wert von maximal  $1 \times 10^{-50}$  gefunden wurde, wurden dem pilzlichen Transkriptom zugeordnet, falls keines der drei signifikantesten Resultate bei NCBI aus einer cDNA-Bank von nichtinokulierten Pflanzen stammte.

Alle Kandidaten, bei denen durch megablast-Analysen bei NCBI Homologie mit einem e-Wert von maximal  $1 \times 10^{-20}$  zu mindestens einer Sequenz aus einer cDNA-Bank von nicht mit Pilz infiziertem pflanzlichem Gewebe gefunden wurde, wurden dem pflanzlichen

Transkriptom zugeordnet. Dabei war es gleichgültig, ob bei Cogeme eine EST-Sequenz pilzlichen Ursprungs gefunden wurde, die einen e-Wert kleiner gleich  $1 \times 10^{-50}$  hatte. Damit sollte sichergestellt werden, dass keine pflanzlichen Gene in die Kategorie ‚pilzliches Transkript‘ gelangten.

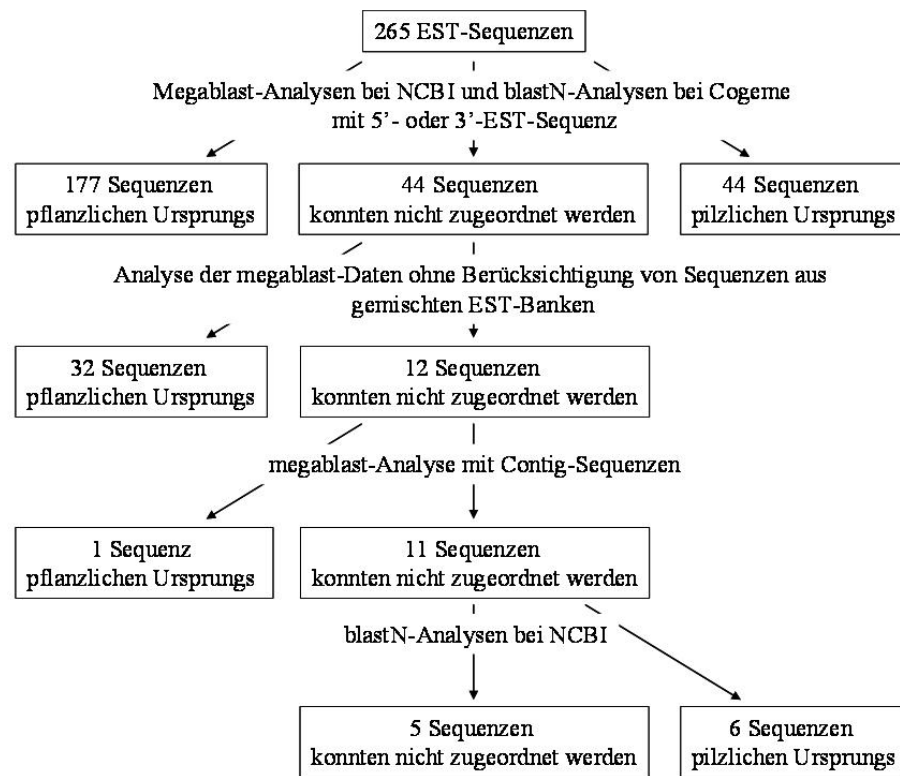
Für die einzelnen HO EST-Klone liegen in der Regel jeweils eine 5'-Sequenz und eine 3'-Sequenz vor. Die blast-Resultate (Tab. 6.1 und Tab. 6.2) beruhen sowohl auf 5'- als auch auf 3'-EST-Sequenzen. Zuerst wurden die blast-Analysen mit der 5'-EST-Sequenz durchgeführt, da in der Regel das RNAi-Konstrukt auf dieser EST-Sequenz beruht. Erbrachte dies kein Ergebnis, wurde die 3'-EST-Sequenz verwendet, welche schließlich für das gleiche Protein kodieren sollte.

### 3.1.2 Resultate der blast-Analysen

Bei NCBI wird die blast-Analyse auch gegen die HO EST-Bank des IPK und damit auch gegen die EST-Sequenzen der Kandidaten, durchgeführt. Daher handelte es sich bei der Sequenz mit dem niedrigsten e-Wert in der Regel um die 5'-HO EST-Sequenz, auf welcher das RNAi-Konstrukt basiert, und bei dem zweitsignifikantesten Resultat handelte es sich häufig um den dazugehörige 3'-EST. Beide wurden in den Tabellen mit den Resultaten gestrichen, da sie zur Klassifizierung der Kandidaten keinen Beitrag leisten können.

Die Tabellen mit allen blast-Resultaten sind im Anhang in Tab. 6.1 und Tab. 6.2 zu finden.

Es konnten 177 EST-Sequenzen der insgesamt 265 Kandidaten-Sequenzen dem pflanzlichen und 44 dem pilzlichen Transkriptom zugeordnet werden. Weitere 44 Sequenzen ließen sich weder durch blast-Analysen der 5'-EST-Sequenz noch der 3'-EST-Sequenz als pilzliches oder pflanzliches Transkript klassifizieren (Abb. 3.1). Bei ihnen lag entweder kein signifikantes blast-Resultat vor, oder die ersten drei Sequenzen stammten aus EST-Datenbanken von pilzinfiziertem Pflanzengewebe, sodass keine Zuordnung zu einem Transkriptom möglich war. Bei einer Sequenz aus einer cDNA-Bank aus pilzinfiziertem pflanzlichem Gewebe, könnte es sich um ein pflanzliches Gen handeln, welches z. Bsp. eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pilzen spielt. Es könnte sich aber auch um ein pilzliches Gen handeln.



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung der Vorgänge zur Klassifizierung der Kandidaten-Sequenzen

Durch blastN-Analysen bei Cogeme und megablast- und blastN-Analysen bei NCBI konnten von 265 EST-Sequenzen insgesamt 210 Sequenzen dem pflanzlichen Transkriptom und 50 Sequenzen dem pilzlichen Transkriptom zugeordnet werden. Für fünf Sequenzen konnte keine Klassifizierung vorgenommen werden.

Bei den 44 nicht klassifizierten Kandidaten wurden die megablast-Resultate genauer betrachtet. Alle Sequenzen aus EST-Datenbanken aus pilzinfiziertem Pflanzengewebe wurden ignoriert und die Kandidaten nach den obengenannten Kriterien dem pflanzlichen oder pilzlichen Transkriptom zugeordnet (Tab. 6.3). So konnten 32 weitere pflanzliche Transkripte aussortiert werden.

Von den verbleibenden 12 Kandidaten wurde nach Contigs in der Crest-Datenbank gesucht (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/index.php>; Künne et al., 2005). Nur für einen Kandidaten (EMBL-Accession-Nr. CD055756) wurde ein Contig (cl8913ct10550cn12007g02) gefunden. Der Consensus wurde ebenfalls für megablast in NCBI verwendet. Dadurch konnte dieses Gen als pflanzliches Transkript aussortiert werden, da eine mRNA aus *Triticum aestivum* mit einem e-Wert von  $2 \times 10^{-88}$  gefunden wurde.

Die restlichen 11 Kandidaten konnten auf Grund von megablast-Resultaten nicht klassifiziert werden. Für sie wurden entweder keine homologen Sequenzen gefunden,

welche aus EST-Datenbanken stammten, die nur aus pflanzlichem oder pilzlichem Gewebe erstellt wurden, oder die Homologie zu einer gefundenen Sequenz lag unter dem festgesetzten Schwellenwert. Diese Kandidaten wurden bei NCBI mittels blastN-Analyse überprüft. Sechs weitere Kandidaten konnten so dem pilzlichem Transkriptom zugeordnet werden (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: blastN-Resultate der verbliebenen 11 Kandidaten**

In dieser Tabelle sind von den verbleibenden 11 Kandidaten Auszüge der blastN-Resultate aufgeführt. Alle Sequenzen aus EST-Datenbanken, welche aus pilzinfiziertem pflanzlichem Gewebe erstellt wurden, wurden ignoriert. Es ist jeweils das signifikanteste Resultat aus einer EST-Datenbank aus rein pflanzlichem oder pilzlichem Gewebe aufgelistet. Die Erklärung der Abkürzungen, die für die verschiedenen Organismen verwendet wurden, ist im Abkürzungsverzeichnis zu finden.

EMBL- <i>Accession</i>	NCBI Organismen	e-Wert	Schluss- folgerung
CD053363	Nc	$4 \times 10^{-14}$	?
CD055418	Ss	$2 \times 10^{-81}$	Pilz
CD055449	Ar	$1 \times 10^{-103}$	Pilz
CD055955	Gm	$3 \times 10^{-20}$	?
CD056025	Tr	$6 \times 10^{-82}$	Pilz
CD056824	Ar	$1 \times 10^{-40}$	?
CD056876	kein Resultat		?
CD057434	Pt	$6 \times 10^{-12}$	?
CD058023	Ar	$3 \times 10^{-66}$	Pilz
CD058210	Bg	$4 \times 10^{-50}$	Pilz
CD058282	Gm	$4 \times 10^{-85}$	Pilz

Die fünf Kandidaten, welche auch durch blastN-Analysen nicht klassifiziert werden konnten, wurden zunächst in die Liste der endgültigen Kandidaten aufgenommen. Diese Kandidaten werden später mit weiteren Methoden noch einmal auf ihren Ursprung überprüft.

**3.1.3 Kandidaten für die TIGS-Experimente**

Alle 55 Kandidaten der endgültigen Liste wurden mittels der Eclat-Software getestet (Friedel et al., 2005). Diese Software unterscheidet nach *Codon*-Gebrauch, ob es sich um ein pilzliches oder ein pflanzliches Gen handeln könnte. Alle als ‚Gerste‘ klassifizierten Kandidaten wurden aussortiert.

Alle 47 durch die Eclat-Software als ‚*Blumeria*‘ klassifizierten Kandidaten bekamen eine interne Kandidaten-ID (Tab. 3.2).

**Tab 3.2: Ergebnisse der Eclat-Software und endgültige Liste der Kandidaten für die TIGS-Experimente**

Die Tabelle enthält alle 55 Kandidaten, welche durch blast-Analysen nicht dem pflanzlichen Transkriptom zugeordnet werden konnten. Mit der Eclat-Software wurden sie auf den Codon-Gebrauch getestet und so entweder dem Gersten- oder dem *B. graminis*-Transkriptom zugeordnet. Kandidaten, die sich dem *B. graminis*-Transkriptom zuordnen ließen, bekamen eine Kandidaten-ID. Die Erklärung der Abkürzungen, die für die verschiedenen Spezies verwendet wurden, ist im Abkürzungsverzeichnis zu finden.

EMBL	Kandidaten	blastN-Resultate			Eclat
<i>Accession</i>	ID	Organismus	Annotation	e-Wert	
CD053363	HIGS 1		kein Resultat		<i>Blumeria</i>
CD053367	HIGS 2	Bg	Riboflavin-Aldehyde-formendes Enzym	$4 \times 10^{-86}$	<i>Blumeria</i>
CD053606	HIGS 3	Bg	Schwermetall-Ionen Transporter	$1 \times 10^{-147}$	<i>Blumeria</i>
CD053651					Gerste
CD054201	HIGS 4	Bg	unbekannt	$1 \times 10^{-145}$	<i>Blumeria</i>
CD054214	HIGS 5	Bg	Fruktose 1,6-bisphosphat Adolase	0	<i>Blumeria</i>
CD054488	HIGS 6	Bg	Ubiquitin/ ribosomales Protein S27a	$1 \times 10^{-175}$	<i>Blumeria</i>
CD054508	HIGS 7	Bg	unbekannt	$1 \times 10^{-136}$	<i>Blumeria</i>
CD054714	HIGS 8	Bg	Enolase (2-Phosphoglycerat-Dehydratase)	0	<i>Blumeria</i>
CD054762	HIGS 9	Bg	3-oxo-5-a-Steroid 4-Dehydrogenase	$1 \times 10^{-158}$	<i>Blumeria</i>
CD054892	HIGS 10	Bg	unbekannt	$1 \times 10^{-94}$	<i>Blumeria</i>
CD055083	HIGS 11	Bg	Glykosidase der Zellwand	0	<i>Blumeria</i>
CD055120	HIGS 12	Bg	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	0	<i>Blumeria</i>
CD055129	HIGS 13	Bg	unbekannt	$1 \times 10^{-177}$	<i>Blumeria</i>
CD055171	HIGS 14	Bf	ribosomale RNA	0	<i>Blumeria</i>
CD055316	HIGS 15	Bg	unbekannt	0	<i>Blumeria</i>
CD055387	HIGS 16	Bg	NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase Untereinheit	$2 \times 10^{-83}$	<i>Blumeria</i>
CD055418	HIGS 17	Ss	unbekannt	$2 \times 10^{-81}$	<i>Blumeria</i>
CD055422	HIGS 18	Bg	extrazelluläre Chitinase	$1 \times 10^{-115}$	<i>Blumeria</i>
CD055449					Gerste
CD055491	HIGS 19	Bg	Protein der äußeren mitochondrialen Membran	$1 \times 10^{-140}$	<i>Blumeria</i>
CD055533	HIGS 20	Bg	Serin-Carboxypeptidase	0	<i>Blumeria</i>
CD055753	HIGS 21	Bg	Serin-Protease	$1 \times 10^{-132}$	<i>Blumeria</i>
CD055827	HIGS 22	Bg	Egh16H1	$3 \times 10^{-68}$	<i>Blumeria</i>



**Fortsetzung von Tab.3.2**

CD055955	HIGS 23		kein Resultat		<i>Blumeria</i>
CD056025					Gerste
CD056032	HIGS 24	Bg	Transporter	$1 \times 10^{-157}$	<i>Blumeria</i>
CD056316	HIGS 25	Bg	1,3- $\beta$ -Glukanosyltransferase	0	<i>Blumeria</i>
CD056824	HIGS 26		kein Resultat		<i>Blumeria</i>
CD056876	HIGS 27		kein Resultat		<i>Blumeria</i>
CD057020	HIGS 28	Cp	unbekannt	$6 \times 10^{-55}$	<i>Blumeria</i>
CD057130	HIGS 29	Bg	kleines nukleares Ribonukleoprotein	$1 \times 10^{-109}$	<i>Blumeria</i>
CD057269	HIGS 30	Bg	vakuoläre ATPase	$7 \times 10^{-69}$	<i>Blumeria</i>
CD057347	HIGS 31	Bg	Hitzeschock-Protein 70	$1 \times 10^{-140}$	<i>Blumeria</i>
CD057434					Gerste
CD057580	HIGS 32	Bg	ADP-ATP Translokase	$6 \times 10^{-63}$	<i>Blumeria</i>
CD057758	HIGS 33	Bg	Disulfid-Isomerase	$1 \times 10^{-164}$	<i>Blumeria</i>
CD057794	HIGS 34	Bg	unbekannt	$1 \times 10^{-144}$	<i>Blumeria</i>
CD057965	HIGS 35	Bg	Serin-Protease	$1 \times 10^{-111}$	<i>Blumeria</i>
CD058023	HIGS 36	Ar	unbekannt	$3 \times 10^{-66}$	<i>Blumeria</i>
CD058204	HIGS 37	Bg	langkettige Fettsäuren-verlängerndes Enzym	$1 \times 10^{-179}$	<i>Blumeria</i>
CD058210	HIGS 38	Bg	unbekannt	$4 \times 10^{-50}$	<i>Blumeria</i>
CD058262					Gerste
CD058282	HIGS 39	Gm	unbekannt	$4 \times 10^{-85}$	<i>Blumeria</i>
CD058283	HIGS 40	Bg	14-3-3-ähnliches Protein	$8 \times 10^{-93}$	<i>Blumeria</i>
CD055456					Gerste
CK565938					Gerste
CK565951	HIGS 41	Bg	unbekannt	$4 \times 10^{-56}$	<i>Blumeria</i>
CK566233	HIGS 42	Bg	C1 Tetrahydrofolat-Synthase	0	<i>Blumeria</i>
CK567256	HIGS 43	Bg	unbekannt	$1 \times 10^{-70}$	<i>Blumeria</i>
CK567743	HIGS 44	Bg	Bleomyzin-Hydrolase	0	<i>Blumeria</i>
CK567886	HIGS 45	Bg	3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase	$1 \times 10^{-125}$	<i>Blumeria</i>
CK568225					Gerste
CD056846	HIGS 46	Bg	unbekannt	0	<i>Blumeria</i>
CK570147	HIGS 47	Bg	1,3- $\beta$ -Glukanosyltransferase	0	<i>Blumeria</i>

**3.2 TIGS-Experimente**

Bei den TIGS-Experimenten wurden je ein RNAi-Konstrukt, welches gegen eines der 47 Kandidatengene gerichtet war, sowie das Reportergen (GUS) durch Beschuss der Gerstenblätter mit an Goldpartikel gebundener Plasmid-DNA in einzelne Zellen

eingebraucht. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurden die Blätter mit Mehltau inokuliert und die Infektionsrate bestimmt. Der relative Haustoriale Index (HI) wurde in diesen Experimenten als Maß für die Infektionsrate genommen (siehe Kapitel 2.3.5). In jedem Experiment wurden vier Schüsse mit dem leeren RNAi-Vektor (pIPKTA30N) durchgeführt, um die natürliche Schwankung der Anfälligkeit zwischen den einzelnen Schüssen zu kompensieren.

Neben dem Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘ wurde das Gerstenkultivar ‚Pallas‘ und das Weizenkultivar ‚Kanzler‘ untersucht.

### **3.2.1 Test der Kandidaten mittels TIGS im Gersten-*Bgh*-System**

#### **3.2.1.1 Experimente im Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘**

##### **3.2.1.1.1 *Primärscreening***

Für die TIGS-Experimente mit dem Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘ wurden zunächst 47 RNAi-Konstrukte verwendet, die auf den 47 verschiedenen, ausgewählten EST-Sequenzen basieren (Tab. 3.2). Sie wurden nach einem ersten TIGS-Experiment (*Primärscreening*) zunächst in drei Gruppen eingeteilt.

Die erste Gruppe bildeten Konstrukte, welche den relativen Haustorialen Index von 100% (Kontrolle mit dem leeren RNAi-Vektor pIPKTA30N) auf wenigstens 50% reduzierten, also die Anfälligkeit des Gersten-*Bgh*-Systems verringerten (Tab. 3.3). Die Konstrukte der zweiten Gruppe veränderten die Anfälligkeit in Bezug auf die Kontrolle kaum (Tab. 3.4). Der relative Haustoriale Index lag zwischen 51 und 149%. Die Konstrukte in der dritten Gruppe erhöhten die Anfälligkeit der Gerste gegenüber *Bgh* (Tab. 3.5). Der relative Haustoriale Index lag über 150%.

**Tab. 3.3: Konstrukte, die die Anfälligkeit reduzierten**

In dieser Tabelle sind die Konstrukte aufgeführt, welche im ersten Experiment den relativen Haustorialen Index (rHI) gegenüber der Kontrolle mit dem leeren RNAi-Vektor (pIPKTA30N) verringert hatten. Der Mittelwert der vier Parallelschüsse mit pIPKTA30N wurde auf 100% gesetzt.

Konstrukt-ID	rHI [%]
HIGS 20.1	22,2
HIGS 30.1	27,3
HIGS 35.1	27,8
HIGS 36.1	36,4
HIGS 1.1	45,5
HIGS 32.1	50,0
HIGS 47.1	50,0

**Tab. 3.4: Konstrukte, die kaum Einfluss auf die Anfälligkeit hatten**

In dieser Tabelle sind die Konstrukte aufgeführt, welche im ersten Experiment den relativen Haustorialen Index (rHI) gegenüber der Kontrolle mit dem leeren RNAi-Vektor (pIPKTA30N) nicht erheblich verändert hatten. Der Mittelwert der vier Parallelschüsse mit pIPKTA30N wurde auf 100% gesetzt.

Konstrukt-ID	rHI [%]	Konstrukt-ID	rHI [%]
HIGS 12.1	52,6	HIGS 2.1	83,3
HIGS 9.1	54,5	HIGS 3.1	90,9
HIGS 27.1	54,5	HIGS 17.1	90,9
HIGS 37.1	54,5	HIGS 22.1	90,9
HIGS 13.1	61,1	HIGS 33.1	94,7
HIGS 29.1	62,5	HIGS 34.1	91,7
HIGS 19.1	63,6	HIGS 38.1	91,7
HIGS 4.1	66,7	HIGS 18.1	100
HIGS 43.1	66,7	HIGS 31.1	100
HIGS 45.1	66,7	HIGS 40.1	105,6
HIGS 7.1	70	HIGS 46.1	109,1
HIGS 10.1	72,7	HIGS 44.1	112,5
HIGS 39.1	72,7	HIGS 42.1	122
HIGS 28.1	75	HIGS 15.1	125
HIGS 14.1	77,8	HIGS 24.1	125
HIGS 25.1	80	HIGS 41.1	125
HIGS 16.1	81,8	HIGS 5.1	127,3
HIGS 23.1	81,8	HIGS 21.1	133,3

**Tab. 3.5: Konstrukte, die die Anfälligkeit erhöhten**

In dieser Tabelle sind die Konstrukte aufgeführt, welche im ersten Experiment den relativen Haustorialen Index (rHI) gegenüber der Kontrolle mit dem leeren RNAi-Vektor (pIPKTA30N) erhöht hatten. Der Mittelwert der vier Parallelschüsse mit pIPKTA30N wurde auf 100% gesetzt.

Konstrukt-ID	rHI [%]
HIGS 11.1	150
HIGS 8.1	158,3
HIGS 6.1	166,7
HIGS 26.1	172,7

76,6% aller getesteten RNAi-Konstrukte hatten im ersten Experiment kaum Einfluss auf die Anfälligkeit des Gersten-*Bgh*-Systems (Tab. 3.4). Der Anteil der Konstrukte, die im ersten Experiment die Anfälligkeit erhöhten (8,5%, Tab. 3.5) war nur geringfügig niedriger als der Anteil der Konstrukte, welche die Anfälligkeit verringerten (14,9%, Tab. 3.3).

**3.2.1.1.2 Genauere Untersuchung einiger ausgewählter Kandidaten**

Mit Konstrukten, die den rHI auf mindestens 50% reduzierten (Tab. 3.3), wurden wenigstens vier weitere Experimente durchgeführt. Von den Konstrukten bei denen der rHI zwischen 51 und 149% lag (Tab. 3.4), wurden einige für weitere Experimente ausgewählt. Eines der Konstrukte, die den rHI über 150% erhöht hatten (Tab. 3.5), wurde für weitere Experimente ausgesucht.

**Tab. 3.6: Kandidaten, für die mindestens fünf Experimente vorliegen**

Von diesen Konstrukten liegen mindestens fünf unabhängige Experimente vor. Der relative Haustoriale Index (rHI) wird als Mittelwert aus allen Experimenten angegeben. N gibt die Anzahl der unabhängigen Experimente an. Der zweiseitige p-Wert des t-Testes zeigt die statistische Signifikanz der Effekte. Signifikante Effekte sind mit einem roten X gekennzeichnet.

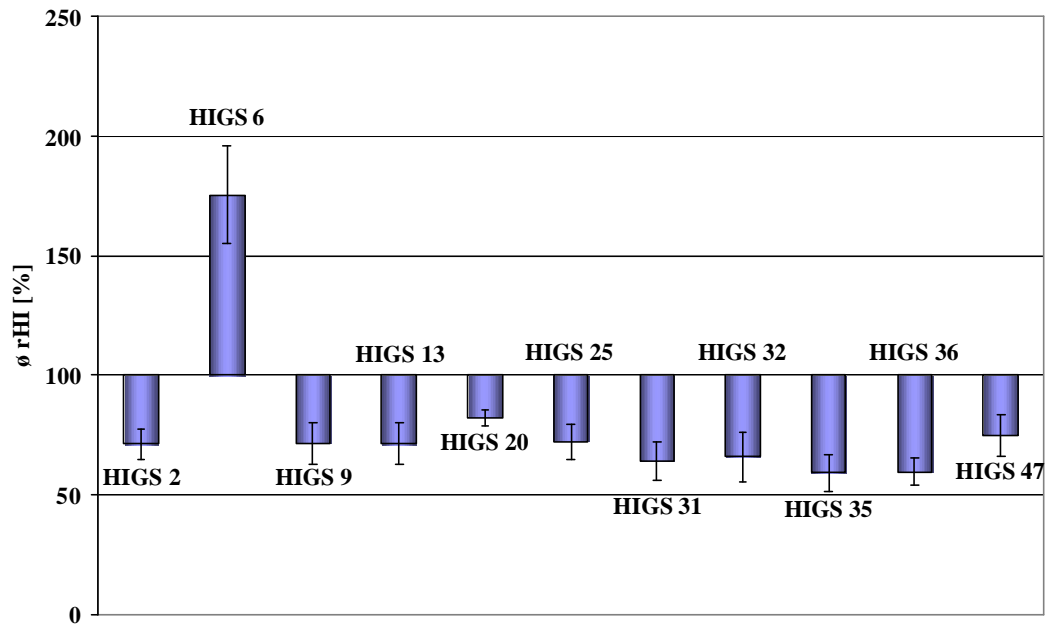
Konstrukt-ID	ø rHI [%]	n	Anzahl transformierter Zellen	p-Wert	
HIGS 1.1	75	6	2159	0,2	
HIGS 20.1	82,3	5	2580	0,01	X
HIGS 30.1	73,8	6	2266	0,1	
HIGS 32.1	65,8	5	2363	0,05	X
HIGS 35.1	59,1	7	4291	0,002	X
HIGS 36.1	59,6	11	2721	0,001	X
HIGS 47.1	74,9	20	7991	0,01	X

**Fortsetzung von Tab. 3.6**

HIGS 2.1	71,2	7	3577	0,005	<b>X</b>
HIGS 9.1	71,5	12	3625	0,01	<b>X</b>
HIGS 13.1	71,3	5	1689	0,05	<b>X</b>
HIGS 14.1	78,5	5	2773	0,5	
HIGS 15.1	85,8	8	2284	0,5	
HIGS 25.1	72,1	7	3316	0,02	<b>X</b>
HIGS 27.1	83,3	5	1693	0,5	
HIGS 28.1	78,0	5	2700	0,2	
HIGS 29.1	91,0	5	2616	0,5	
HIGS 31.1	64,4	8	3540	0,005	<b>X</b>
HIGS 33.1	101,9	5	2504	>0,5	
HIGS 37.1	80,1	5	1815	0,1	
HIGS 40.1	83,5	5	2249	0,5	
HIGS 6.1	175,6	5	2184	0,05	<b>X</b>

Es wurden sieben Konstrukte mehrfach geschossen, bei denen der erste Schuss einen rHI unter 50% aufwies (Tab. 3.6, Zeile 1 bis 7). Fünf dieser Konstrukte (71,4%) verringerten den rHI statistisch signifikant. Von den 13 Konstrukten, bei denen der erste Schuss einen relativen Haustorialen Index zwischen 51 und 149% aufwies (Tab. 3.6, Zeile 9 bis 21), veränderten fünf Konstrukte (38,5%) nach mehrfacher Wiederholung die Anfälligkeit des Systems signifikant. Das eine Konstrukt, welches im ersten Experiment die Anfälligkeit auf über 150% erhöhte, zeigte auch nach vier weiteren Experimenten eine statistisch signifikante Erhöhung der Anfälligkeit der Gerstenblätter gegen *Bgh* (Tab. 3.6, Zeile 23).

Insgesamt verringerten 10 von 21 RNAi-Konstrukten die Anfälligkeit signifikant (Tab. 3.6). Das entspricht 48% aller RNAi-Konstrukte, für die mindestens fünf Experimente vorliegen. Nur ein Konstrukt von insgesamt 21 untersuchten Konstrukten erhöhte die Anfälligkeit signifikant (Tab. 3.6, HIGS 6.1). Das sind fünf Prozent aller RNAi-Konstrukte, für die mindestens fünf Experimente vorliegen.



**Abb. 3.2: Kandidaten, welche die Anfälligkeit des Gersten-Bgh-Systems signifikant beeinflussten**

Das Diagramm zeigt den mittleren relativen Haustorialen Index ( $\bar{\phi}$  rHI) der Konstrukte, welche nach dem  $t$ -Test einen statistisch signifikanten Effekt in TIGS-Experimenten mit dem Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘ bewirken. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler. Die Werte sind in Tab. 3.6 aufgeführt. Der Mittelwert der Experimente mit dem leeren RNAi-Vektor (pIPKTA30N) wurde auf 100% gesetzt.

HIGS 6.1 zeigte von den Konstrukten, für welche mindestens fünf Experimente vorliegen, den stärksten Effekt und nur dieses Konstrukt bewirkte eine Erhöhung der Anfälligkeit (Abb. 3.2). Die anderen 10 Konstrukte, deren Einfluss statistisch signifikant war, bewirkten alle eine Reduktion der Anfälligkeit. In keinem Fall wurde die Anfälligkeit im Mittel stärker als 40% reduziert. HIGS 20.1 reduzierte die Anfälligkeit in Bezug auf pIPKTA30N im Mittel nur um 18%. Den stärksten Effekt zeigte das Konstrukt HIGS 35.1, welches die Anfälligkeit um 40,9% senkte (Abb. 3.2). HIGS 36.1 verursachte mit einer Reduktion der Anfälligkeit um 40,6% den zweitstärksten Effekt. Mit einem  $p$ -Wert von = 0,001 zeigte dieser Effekt die höchste statistische Signifikanz (Tab. 3.6).

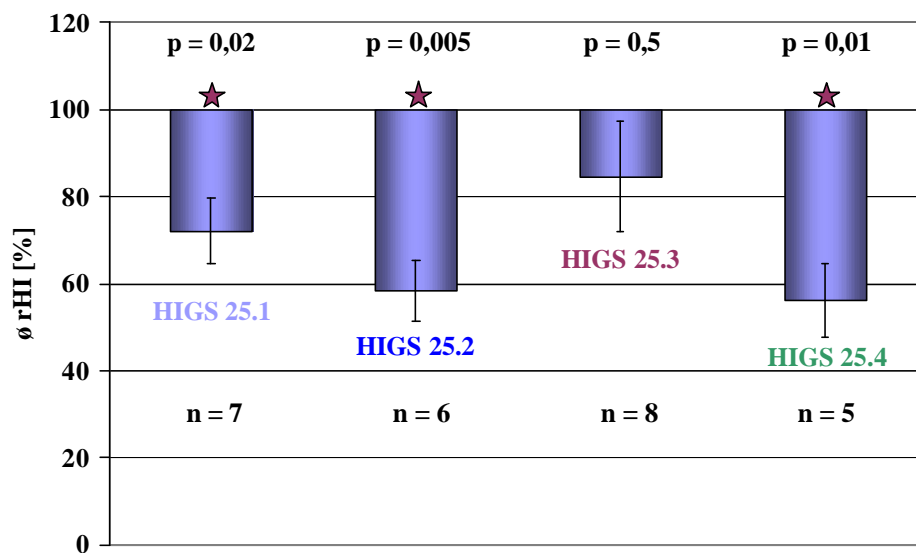
### 3.2.1.1.3 Ausschluss von *off target*-Effekten durch zusätzliche RNAi-Konstrukte

Für zwei der Kandidaten (HIGS 25 und HIGS 47) wurden weitere RNAi-Haarnadel-Konstrukte erstellt. Dabei handelte es sich um Konstrukte basierend auf dem gleichen Gen, die aber zu unterschiedlichen Bereichen der Sequenz homolog waren. Die neue Konstrukte wurden ebenfalls fünfmal in das Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘ geschossen. Mit den

zusätzlichen Konstrukten würde man ähnliche Effekte erwarten wie mit dem Originalkonstrukt. Handelte es sich bei dem durch das Originalkonstrukt erzielten Effekt um einen *off target*-Effekt, sollten zusätzliche Konstrukt keinen oder einen anderen, eventuell sogar einen gegenläufigen Effekt verursachen.

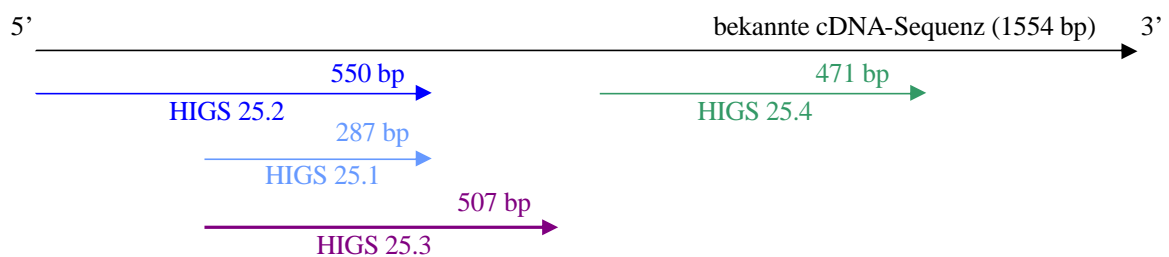
### 3.2.1.1.3.1 Kandidat HIGS 25

Für den Kandidaten HIGS 25 wurden weitere RNAi-Konstrukte erstellt. Sie basierten alle auf der bekannten Sequenz dieses Gens, repräsentiert durch die cDNA-Klone HO09P14, HO11N21 und HO14N04 (Anhang 6.3).



**Abb. 3.3: RNAi-Konstrukte gegen HIGS 25**

Das Diagramm zeigt den mittleren relativen Haustorialen Index ( $\bar{\text{rHI}}$ ) für vier verschiedene RNAi-Konstrukte, die alle gegen das Kandidatengen HIGS 25 gerichtet sind. HIGS 25.1 ist bereits aus Abb. 3.2 bekannt. Der Mittelwert der Experimente mit dem leeren RNAi-Vektor (pIPKTA30N) wurde auf 100% gesetzt. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler. N gibt die Anzahl der unabhängigen Experimente an. P gibt den zweiseitigen p-Wert des t-Testes an. Rote Sterne markieren die signifikanten Resultate.



**Abb. 3.4: Unterschiedlichen Konstrukte gegen HIGS 25**

Die bekannte cDNA-Sequenz des Kandidaten HIGS 25 (schwarzer Pfeil; Anhang 6.3) beträgt 1554 Basenpaare (bp). Bei HIGS 25.1 bis HIGS 25.4 handelt es sich um unterschiedliche Konstrukte

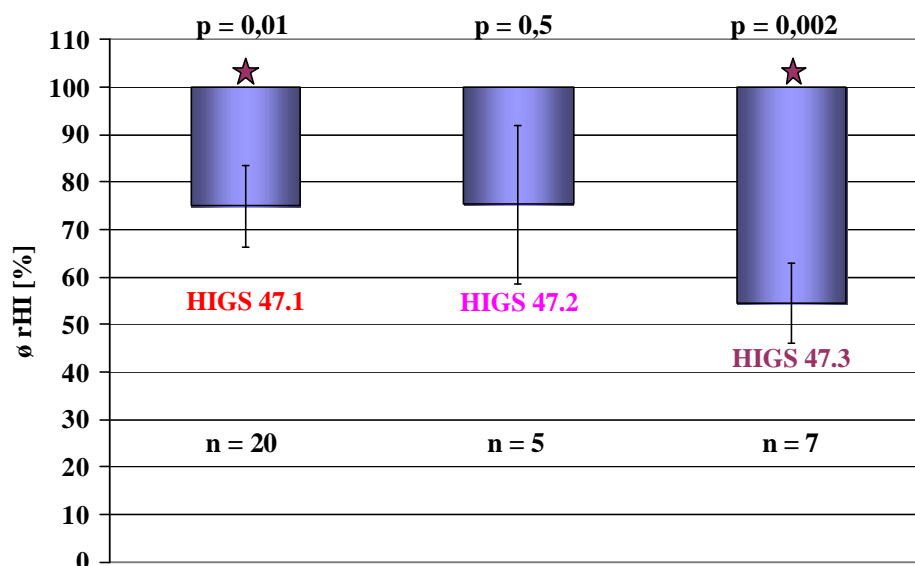
basierend auf dieser Sequenz. Die Länge des entsprechenden Konstrukts ist rechts über den RNAi-Zielbereichen in Basenaaren (bp) angegeben.

Für den Kandidaten HIGS 25 wurden insgesamt vier Konstrukte getestet (Abb. 3.3 und Abb. 3.4). Alle vier Konstrukte reduzierten die Anfälligkeit der Gerstenblätter gegen *Bgh*, aber der durch HIGS 25.3 verursachte Effekt war nicht signifikant. Weshalb dieses Konstrukt keinen signifikanten Effekt verursachte, kann nur vermutet werden. Das Konstrukt HIGS 25.3 stimmte in seiner Sequenz weitgehend mit der von HIGS 25.1 überein. HIGS 25.3 war allerdings am 3'-Ende um 220 Basenpaare länger als HIGS 25.1. Möglicherweise wurde durch diese zusätzlichen 220 Basenpaare die Bildung einer dsRNA erschwert, da innerhalb dieser Region vielleicht leichter sekundäre Strukturen entstanden.

Die Konstrukte HIGS 25.2 und HIGS 25.4 waren gegen völlig unterschiedliche Bereiche des Gens gerichtet, verursachten aber beinahe eine identische Reduktion der Anfälligkeit (um 41,5% bzw. 43,8%, Abb. 3.3). Dieses Ergebnis ist ein wichtiges Indiz dafür, dass der Effekt von HIGS 25.1 aus den ersten TIGS-Experimenten (Abb. 3.2) nicht auf *Silencing* eines anderen, möglicherweise pflanzlichen Gens beruhte.

### 3.2.1.1.3.2 Kandidat HIGS 47

Für den Kandidaten HIGS 47 wurden weitere RNAi-Konstrukte erstellt. Sie basierten alle auf einer partiellen cDNA-Sequenz dieses Gens (Anhang 6.3).

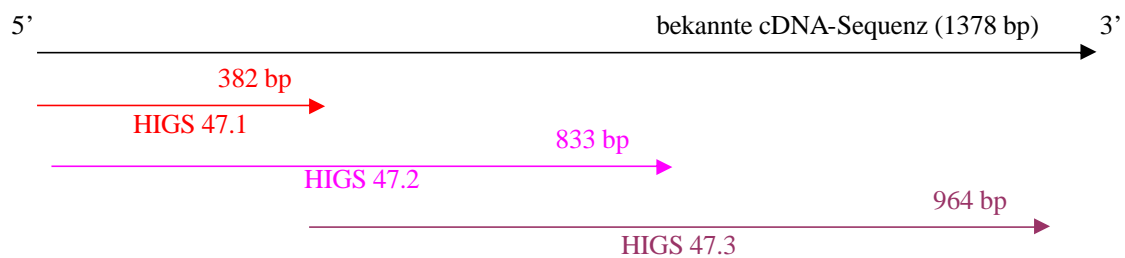


**Abb. 3.5: RNAi-Konstrukte gegen HIGS 47**

Das Diagramm zeigt den mittleren relativen Haustorialen Index (ø rHI) für drei verschiedene RNAi-Konstrukte, die alle gegen das Kandidatengen HIGS 47 gerichtet sind. HIGS 47.1 ist bereits aus Abb. 3.2 bekannt. Der Mittelwert der Experimente mit dem leeren RNAi-Vektor (pipkta30N)



wurde auf 100% gesetzt. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler. N gibt die Anzahl der unabhängigen Experimente an. P gibt den zweiseitigen p-Wert des t-Testes an. Rote Sterne markieren die signifikanten Resultate.



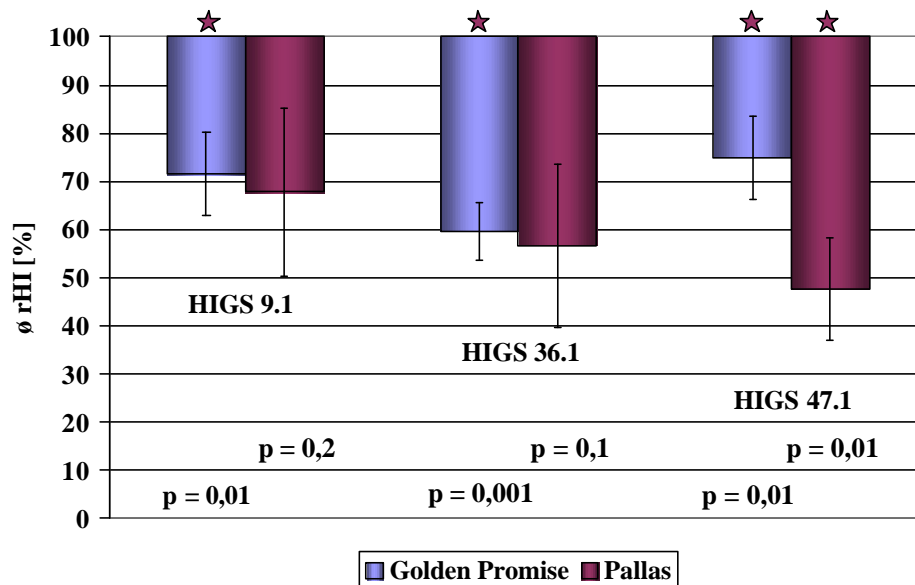
### Abb. 3.6: Unterschiedlichen Konstrukte gegen HIGS 47

Die bekannte cDNA-Sequenz des Kandidaten HIGS 47 (schwarzer Pfeil; Anhang 6.3) ist 1378 Basenpaare (bp) lang. HIGS 47.1 bis HIGS 47.3 sind Konstrukte, die auf dieser Sequenz entstanden sind. Die Länge des entsprechenden Konstrukts ist rechts über den RNAi-Zielbereichen in Basenpaaren (bp) angegeben.

Gegen den Kandidaten HIGS 47 wurden drei unterschiedliche RNAi-Konstrukte getestet (Abb. 3.6). Die verschiedenen Konstrukten verursachten alle eine Reduktion der Anfälligkeit. Die Stärke der durch HIGS 47.1 und HIGS 47.2 verursachten Effekte war mit einer Reduktion des rHI um 25,1% bzw. 24,7% beinahe identisch (Abb. 3.5). Allerdings war der durch HIGS 47.2 verursachte Effekt statistisch nicht signifikant. Der durch HIGS 47.3 verursachte Effekt war mit einer Reduktion des rHI um 45,5% deutlich stärker (Abb. 3.5). Man kann auch hier davon ausgehen, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf dem Ausschalten der Expression von HIGS 47 und nicht auf dem zufälligen Ausschalten der Expression eines Gerstengens basierten, da alle Konstrukte eine Reduktion der Anfälligkeit bewirkten.

#### 3.2.1.2 Test einiger Kandidaten im Gersten-Kultivar ‚Pallas‘

Neben dem Gersten-Kultivar ‚Golden Promise‘ wurde das Gersten-Kultivar ‚Pallas‘ getestet. Hier wurden drei Konstrukte ausgewählt, die in den Experimenten mit ‚Golden Promise‘ die Anfälligkeit des Gersten-*Bgh*-Systems statistisch signifikant herabgesetzt hatten und gegen *Bgh*-Gene gerichtet waren (siehe Kapitel 3.4.3).



**Abb. 3.7: Vergleich zwischen den Kultivaren ‚Golden Promise‘ und ‚Pallas‘**

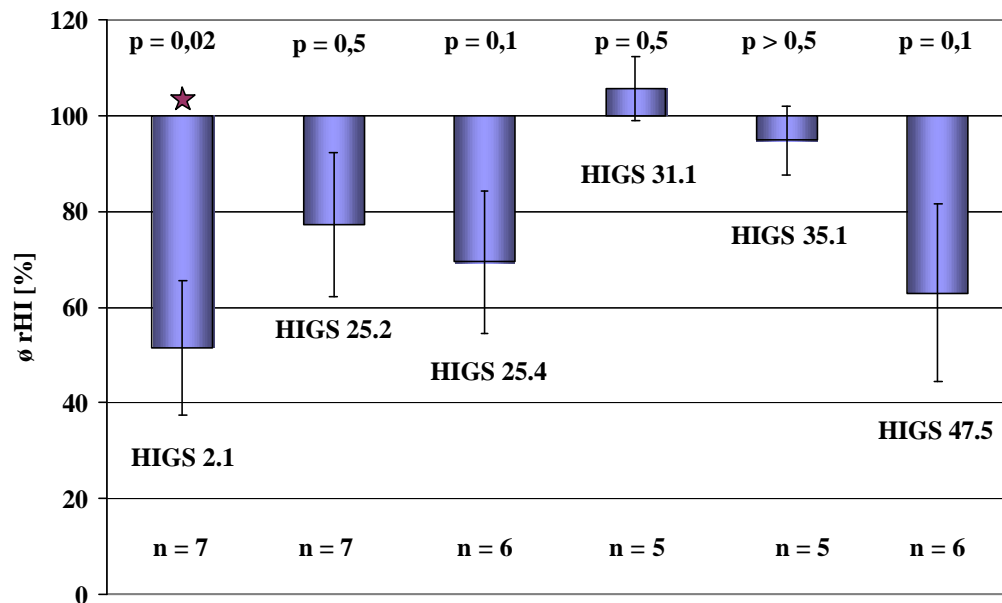
Das Diagramm zeigt den mittleren relativen Haustorialen Index (ø rHI) von drei RNAi-Konstrukte in den Gerstenkultivaren ‚Golden Promise‘ (blau) und ‚Pallas‘ (rot). Der Mittelwert aus den Experimenten mit dem leeren RNAi-Vektor (pIPKTA30N) wurde auf 100% gesetzt. Der zweiseitige p-Wert des t-Tests zeigt die statistische Signifikanz der Effekte. Statistisch signifikante Effekte sind mit einem roten Stern gekennzeichnet. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler. Die Daten zu ‚Golden Promise‘ sind bereits aus Abb. 3.2 bekannt.

Die RNAi-Konstrukte HIGS 9.1 und HIGS 36.1 reduzierten in ‚Golden Promise‘ die Anfälligkeit signifikant (Abb. 3.2 und 3.7). In ‚Pallas‘ reduzierten diese Konstrukte zwar im Mittel über sechs Experimente den rHI, diese Effekte waren aber im zweiseitigen t-Test statistisch nicht signifikant (Abb. 3.7).

HIGS 47.1 war das einzige Konstrukt, das die Anfälligkeit in beiden Kultivaren signifikant reduzierte (Abb. 3.7). In ‚Pallas‘ war der Effekt mit einem rHI von 47,7% aber beinahe doppelt so stark wie in ‚Golden Promise‘ (rHI 74,9%). Beide Effekte waren mit einem p-Wert < 0,01 signifikant.

### 3.2.2 TIGS-Experimente mit Weizen und *Bgt*

Bei den TIGS-Experimenten im Weizenkultivar ‚Kanzler‘ wurden sechs verschiedene RNAi-Konstrukte getestet, welche gegen *Bgt*-Gene gerichtet waren (siehe Kapitel 3.4.3).



**Abb. 3.8: Daten der TIGS-Experimente in Weizen**

Das Diagramm zeigt den mittleren relativen Haustorialen Index (rHI) für RNAi-Konstrukte, die alle gegen verschiedene *Bgt*-Gene gerichtet sind. Der Mittelwert aus den Experimenten mit dem leeren RNAi-Vektor (pIPKTA30N) wurde auf 100% gesetzt. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler. N gibt die Anzahl der unabhängigen Experimente an. P ist der zweiseitige p-Wert des t-Testes. Rote Sterne markieren die signifikanten Resultate.

Weizen reagiert auf den durch Beschuss verursachten Stress mit schnell zunehmender Resistenz, weshalb er meistens schon vier Stunden nach Beschuss mit Mehltau inokuliert wird (Schweizer et al., 1999). Um sicher zu stellen, dass zum Zeitpunkt der Penetration von *Bgt* genügend dsRNA bzw. siRNA in der Wirtzelle vorhanden war, um ein *Silencing* im Pilz zu erreichen, wurde erst einen Tag nach Beschuss inokuliert. Durch die Expression des *HvMlo*-Gens wurden die transienten Zellen anfällig gehalten (Elliott et al., 2002).

Die Konstrukte HIGS 2.1, HIGS 25.2, HIGS 25.4, HIGS 31.1 und HIGS 35.1 waren bereits im Gersten-Screening zum Einsatz gekommen (Abb. 3.2 und 3.3). Für den Kandidaten HIGS 47 wurde ein neues *Bgt*-spezifisches Konstrukt erstellt, welches dem Konstrukt HIGS 47.3 glich. Das *Bgt*-spezifisches Konstrukt HIGS 47.5 war allerdings am 3'-Ende um 240 Basenpaar kürzer als HIGS 47.3.

RNAi mit den Konstrukten HIGS 2.1, HIGS 25.2, HIGS 25.4 und HIGS 47.5 reduzierte den rHI im Schnitt über sechs bzw. sieben Experimente (Abb. 3.8). Allerdings war dieser Effekt nur im Fall von HIGS 2.1 statistisch signifikant. Die Konstrukte HIGS 31.1 und HIGS 35.1 beeinflussten die Anfälligkeit kaum. Ihre rHI-Werte lagen keine 10% über bzw. unter dem Mittelwert aus den Experimenten mit pIPKTA30N (Abb. 3.8).

### 3.3 Suche nach *off target*-Effekten in pflanzlichen Genen mit Hilfe des ‚siRNA-Scans‘

Die Konstrukte, die in den TIGS-Versuchen die Anfälligkeit des Getreide-Mehltau-Systems signifikant verändert hatten, wurden auf eventuelles *Cross Silencing* mit pflanzlichen Genen untersucht. Dazu wurde ‚siRNA-Scan‘, ein öffentlich verfügbares Internet-Programm, verwendet (Xu et al., 2006). Die Sequenzen der RNAi-Konstrukte wurden vom dem Programm in 21 Nukleotide lange siRNA-Moleküle zerlegt und gegen den Genindex von Gerste (Version 9.0, 2004) bzw. Weizen (Version 10.0, 2005) getestet (Quackenbush et al., 2001; <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>).

#### 3.3.1 Vergleich mit dem Genindex der Gerste

Mit dem Computerprogramm ‚siRNA-Scan‘ wurde überprüft, ob es für die RNAi-Konstrukte, welche in den TIGS-Experimenten mit Gerstenblättern einen signifikanten Effekt verursacht hatten, Sequenzen im Gerstentranskriptom gibt, die als *off target*-Zielgene in Frage kommen könnten.

**Tab. 3.7: Ergebnisse des siRNA-Scans gegen den Genindex von Gerste**

Die Sequenz des Konstruktes wurde in das Programm ‚siRNA-Scan‘ eingegeben und mit dem Genindex von Gerste verglichen. Die ID-Nummern entsprechen dem ‚gene index assembly‘-Nummern der Gerste bzw. stehen für EST-IDs.

Konstrukt-ID	Ergebnis des ‚siRNA-Scans‘	
	ID	EST-Sequenz aus:
HIGS 2.1	TC144080	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
HIGS 2.2	TC144080	
HIGS 6.1	BI953074	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
	BJ449103	Blatt
	TC138654	<i>Fusarium</i> -infizierte Ähre
	TC145695	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
	TC153361	Wurzel
HIGS 9.1	TC151223	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
HIGS 13.1	CD057904	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
	TC142726	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
	TC152341	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
HIGS 20.1	TC152549	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
HIGS 25.1	TC144593	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
HIGS 25.2	TC144593	

**Fortsetzung von Tab. 3.7**

HIGS 25.4	TC144593	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
	TC151540	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
HIGS 31.1	TC136002	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
HIGS 32.1	CD057580	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
	TC153766	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
HIGS 35.1	CK565652	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
	TC142981	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
HIGS 36.1	TC153831	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
HIGS 47.1	CD057592	<i>B. graminis</i> -infiziertes Blatt
HIGS 47.3	CD057592	
		CK570147

Für die RNAi-Konstrukte HIGS 2.1 und HIGS 2.2 wurde eine Homologie zu dem *Cluster* TC144080 gefunden, welches aus EST-Sequenzen aus *B. graminis*-infiziertem Blattmaterial aufgebaut ist (Tab. 3.7). Für die Konstrukte HIGS 9.1, HIGS 13.1, HIGS 20.1, HIGS 25.1, HIGS 25.2, HIGS 25.4, HIGS 31.1, HIGS 32.1, HIGS 35.1, HIGS 36.1, HIGS 47.1 und HIGS 47.3 fand das Programm ebenfalls Übereinstimmungen zwischen der Sequenz des Konstrukts und entweder einem TC-Cluster oder einer einzelnen EST-Sequenz basierend auf *B. graminis*-infiziertem Blattmaterial. Diese Ergebnisse weisen nicht auf *off target-Silencing* von pflanzlichen Genen hin.

Für das Konstrukt HIGS 6.1 wurden in der Gerste fünf EST-Contigs gefunden. Die Resultate eins, drei und vier stammten aus pilzinfiziertem Pflanzenmaterial. Das zweite (BJ449103) und das fünfte (TC153361) Resultat hingegen wiesen auf Wurzel- bzw. auf Blattmaterial hin, welches nicht mit Pilzen infiziert wurde (Tab. 3.7). Es bestand aber die Möglichkeit, dass das zur Erstellung der cDNA-Banken verwendete Pflanzengewebe durch Pilze kontaminiert war. So zeigte die EST-Sequenz BJ449103 mit einem e-Wert von  $1 \times 10^{-75}$  Homologie zu einer EST-Sequenz von *Botryotinia fuckeliana* und das Cluster TC153361 mit einem e-Wert von 0 sehr hohe Homologie zu einer EST-Sequenz von *Ustilago maydis* in blastN-Analysen. Daher wurde noch ein megablast bei NCBI mit der Sequenz des Konstruktes HIGS 6.1 durchgeführt. Dabei wurden neben vielen cDNA-Sequenzen pilzlichen Ursprungs auch Sequenzen aus *Oryza sativa* gefunden. Diese Sequenzen (z.B. Acc.-Nr. AK288943) enthalten einen Bereich von 28 Nukleotiden, welcher zu 100% mit der Sequenz von HIGS 6.1 übereinstimmte. Es wurden allerdings keine homologen Gerstengene gefunden. Aufgrund der Analysen mit dem siRNA-Scan-Programm konnte nicht geklärt

werden, ob der durch HIGS 6.1 verursachte Effekt auf *Silencing* von pflanzlichen oder pilzlichen Genen beruhte.

### **3.3.2 Vergleich mit dem Genindex des Weizens**

Das Konstrukt HIGS 2.1 war das einzige, welches die Anfälligkeit im Weizen-*Bgt*-System signifikant verändert hatte. Allerdings wurde mit ‚siRNA-Scan‘ kein *off target* im Weizentranskriptom gefunden.

## **3.4 Untersuchungen zum Ursprung der Kandidaten-Sequenzen**

Für alle Kandidaten, die in den TIGS-Experimenten die Anfälligkeit relativ zu der Kontrolle statistisch signifikant beeinflusst hatten, wurden nochmals überprüft, ob es sich wirklich um pilzliche und nicht um pflanzliche Gene handelte. Einerseits wurde dies mittels blastN gegen die bislang unveröffentlichte Genomsequenz von *Bgh*, zum anderen mittels PCR mit verschiedenen Primer-Kombinationen überprüft. Außerdem wurde die Zugehörigkeit zu den *formae speciales* von *B. graminis* untersucht.

### **3.4.1 BlastN gegen die Genomsequenz von *Bgh***

In Kooperation mit Dr. Spanu (Imperial College, London) wurde überprüft, ob die Sequenzen der Kandidaten, welche in den Experimenten in ‚Golden Promise‘ die Anfälligkeit statistisch signifikant beeinflusst hatten, homolog zu Genen von *Bgh* waren. Für den blastN wurden die im Anhang 6.3 aufgeführten Sequenzen eingesetzt.

**Tab. 3.8: Resultate aus blastN gegen das *Bgh*-Genom**

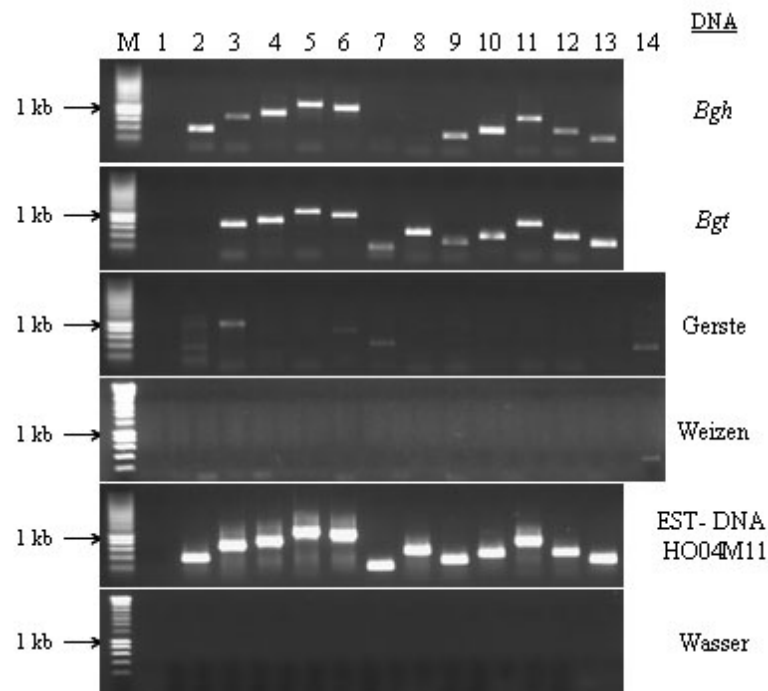
Die Tabelle zeigt die Resultate von blastN gegen das *Bgh*-Genom. Es sind der Score, die Identität zwischen Ausgangs- und Zielsequenz und der e-Wert angegeben.

Kandidat	Score	Identität [%]	e-Wert
HIGS 2	1471	89	0
HIGS 6	585	94	$1 \times 10^{-166}$
HIGS 9	1781	96	0
HIGS 13	674	96	0
HIGS 20	957	100	0
HIGS 25	998	93	0
HIGS 31	1231	90	0
HIGS 32	1112	92	0
HIGS 35	942	87	0
HIGS 36	632	94	$1 \times 10^{-180}$
HIGS 47	1542	99	0

Alle Kandidaten zeigten sehr niedrige e-Werte und hohe Scores (Tab. 3.8). Bei einem e-Wert unter  $1 \times 10^{-50}$  wurde eine Zuordnung zum Genom von *B. graminis* bestätigt. Alle Sequenzen konnten somit dem Genom von *B. graminis* zugeordnet werden.

### 3.4.2 Analyse des Ursprungs der Kandidaten mittels PCR

Die Primer wurden auf der gesamten EST-Sequenz des Kandidatengens erstellt und unterschiedliche Kombinationen der verschiedenen 5'- und 3'-Primer wurden bei PCR-Reaktionen auf genomischer DNA aus *Bgh*, *Bgt*, Gerste (Kultivar ‚Golden Promise‘) und Weizen (Kultivar ‚Kanzler‘) eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden bei einer *Annealing*-Temperatur von 58°C durchgeführt. Diese Temperatur sollte die unspezifische Bindung der Primer minimieren. Als Kontrolle wurden alle Primer-Kombinationen außerdem auf der entsprechenden EST-DNA bzw. auf Wasser getestet. Zusätzlich wurde ein PCR-Ansatz mit der jeweiligen DNA, aber ohne Primer durchgeführt. Bei den Reaktionen mit pflanzlicher DNA wurde noch eine Kontrolle mit Gersten- bzw. Weizen-spezifischen GAPDH-Primer eingefügt. Alle Primersequenzen sind im Anhang unter 6.2.2 zu finden.



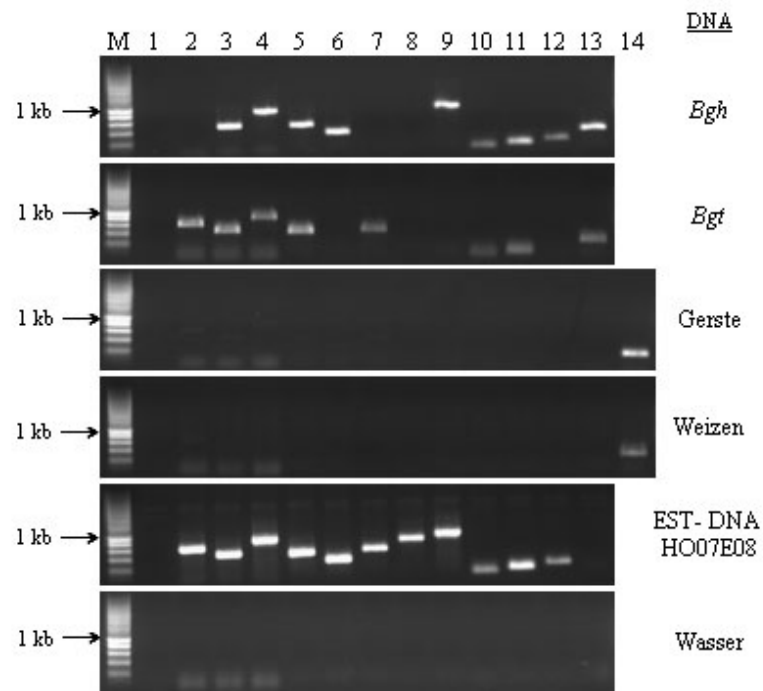
**Abb. 3.9: PCR-Analyse für HIGS 2**

Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec (SERAING, Belgien) befindet sich in Spalte M. In Spalte 1 befindet sich ein PCR-Ansatz mit DNA, aber ohne Primer. In Spalte 2 bis 13 wurden die PCR-Ansätze mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen aufgetragen. Der PCR-Ansatz mit Primern gegen pflanzliche GAPDH befindet sich in Spalte 14.

Für den Kandidaten HIGS 2 konnten mit *Bgh*-DNA mit 10 von 12 Primer-Kombinationen PCR-Produkte erzeugt werden (Abb. 3.9, Zeile 1). Die Produktgrößen stimmten mit der Kontroll-PCR auf EST-DNA überein (Abb. 3.9, Zeile 5). Mit *Bgt*-DNA ergaben 11 Primer-Kombinationen die erwarteten PCR-Produkte (Abb. 3.9, Zeile 2).

Auch die PCR auf Gersten-DNA zeigte mit vier unterschiedlichen Primer-Kombination Banden (Abb. 3.9; Zeile 3, Spalte 2, 3, 6 und 7). Die PCR-Reaktionen mit Weizen-DNA ergaben keine Produkte mit Ausnahme der Positivkontrolle mit *TaGAPDH*-Primern (Abb. 3.9, Zeile 4). Die Wasser-Kontrolle zeigte kein PCR-Produkt (Abb. 3.9, Zeile 6).





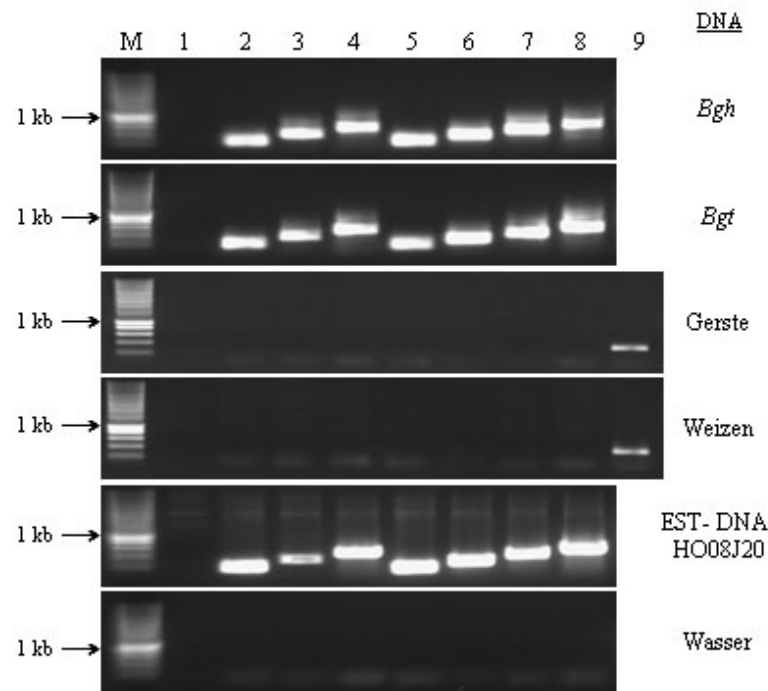
**Abb. 3.10: PCR-Ergebnisse für HIGS 9**

Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec befindet sich in Spalte M. In Spalte 1 befindet sich ein PCR-Ansatz mit DNA, aber ohne Primer. In Spalte 2 bis 13 wurden die PCR-Ansätze mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen aufgetragen. Der PCR-Ansatz mit Primern gegen pflanzliche GAPDH befindet sich in Spalte 14.

Für den Kandidaten HIGS 9 zeigte die PCR mit der EST-DNA HO07E08, dass mit allen Primer-Kombinationen, mit Ausnahme von Kombination 13 (Abb. 3.10, Zeile 5, Spalte 13), die entsprechenden PCR-Produkte amplifiziert werden konnten. Mit der *Bgh*-DNA konnten mit neun von 12 Primer-Kombinationen PCR-Produkte amplifiziert werden (Abb. 3.10, Zeile 1). Mit *Bgt*-DNA konnten mit sechs Primer-Kombinationen PCR-Produkte amplifiziert werden (Abb. 3.10, Zeile 2). Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass es sich hier um ein Gen aus *Bgh* handelt.

Auf Gersten-DNA bzw. Weizen-DNA ergaben nur die Primer der GAPDH-Kontrollen die erwarteten PCR-Produkte (Abb. 3.10, Zeile 3 bzw. 4). Die Wasser-Kontrolle zeigte keine PCR-Produkte (Abb. 3.10, Zeile 6).

Diese PCR-Resultate sind ein weitere Indiz dafür, dass es sich bei dem Kandidatengen HIGS 9 um ein Gen aus *B. graminis* handelt.



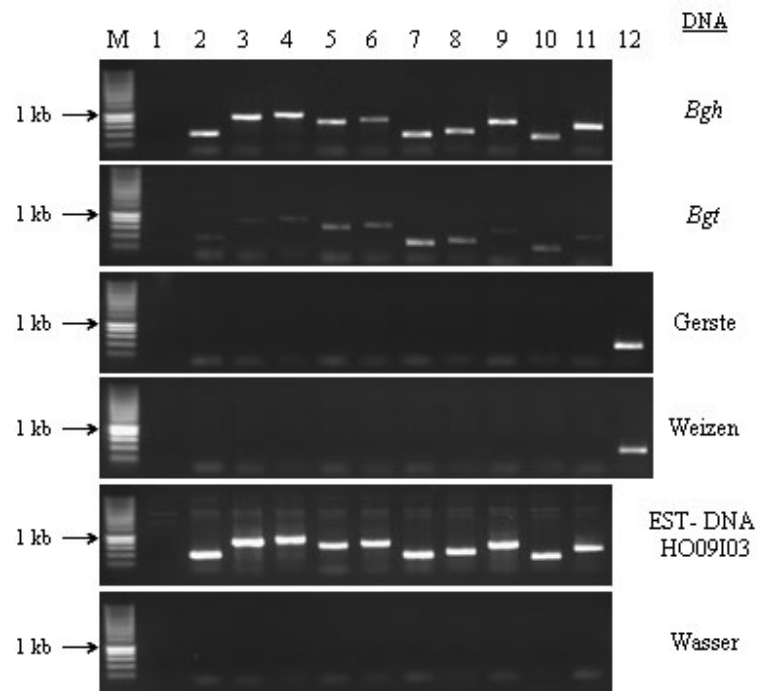
**Abb. 3.11: PCR-Ergebnisse für HIGS 13**

Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec befindet sich in Spalte M. In Spalte 1 befindet sich ein PCR-Ansatz mit DNA, aber ohne Primer. In Spalte 2 bis 8 wurden die PCR-Ansätze mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen aufgetragen. Der PCR-Ansatz mit Primern gegen pflanzliche GAPDH befindet sich in Spalte 9.

Bei Kandidat HIGS 13 ergaben bei *Bgh*- und *Bgt*-DNA alle Primer-Kombinationen die erwarteten PCR-Produkte (Abb. 3.11, Zeile 1 bzw. 2). Der Vergleich mit der EST-DNA-Kontrolle zeigte, dass alle Banden die erwartete Größe hatten (Abb. 3.11, Zeile 5).

Bei den PCR-Reaktionen mit Gersten- bzw. Weizen-DNA ließen sich nur in den Kontrollen mit GAPDH-Primern die erwarteten PCR-Produkte amplifizieren (Abb. 3.11, Zeile 3 bzw. 4). Die Wasser-Kontrolle zeigte keine PCR-Produkte (Abb. 3.11, Zeile 6).

Diese PCR-Resultate sind ein weitere Indiz dafür, dass es sich bei dem Kandidatengen HIGS 13 um ein Gen aus *B. graminis* handelt.



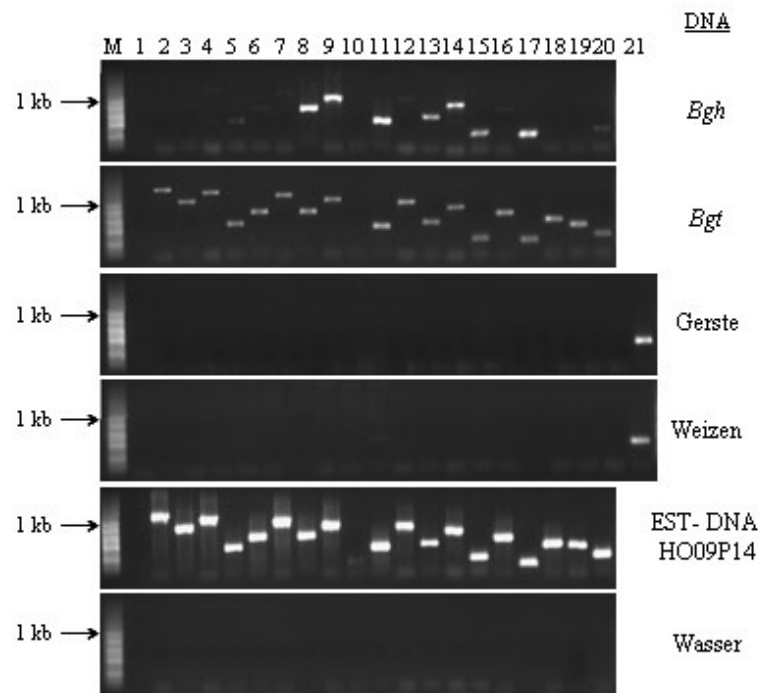
**Abb. 3.12: PCR-Ergebnisse für HIGS 20**

Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec befindet sich in Spalte M. In Spalte 1 befindet sich ein PCR-Ansatz mit DNA, aber ohne Primer. In Spalte 2 bis 11 wurden die PCR-Ansätze mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen aufgetragen. Der PCR-Ansatz mit Primern gegen pflanzliche GAPDH befindet sich in Spalte 12.

Mit *Bgh*-DNA konnten für den Kandidaten HIGS 20 mit allen Primer-Kombinationen PCR-Produkte erzeugt werden (Abb. 3.12, Zeile 1). Auch bei der PCR mit *Bgt*-DNA ergaben alle PCR-Reaktionen Produkte, teilweise jedoch mit geringer Intensität (Abb. 3.12, Zeile 2).

Mit keiner pflanzlichen DNA konnte ein PCR-Produkt amplifiziert werden mit Ausnahme der GAPDH-Kontrollen (Abb. 3.12, Zeile 3 bzw. 4). Die PCR-Reaktionen auf EST-DNA zeigten, dass die bei den Reaktionen mit *B. graminis*-DNA amplifizierten Produkte die richtige Größe hatten (Abb. 3.12, Zeile 5). Die Wasser-Kontrolle zeigte keine PCR-Produkte (Abb. 3.12, Zeile 6).

Diese PCR-Resultate sind ein weitere Indiz dafür, dass es sich bei dem Kandidatengen HIGS 20 um ein Gen aus *B. graminis* handelt.



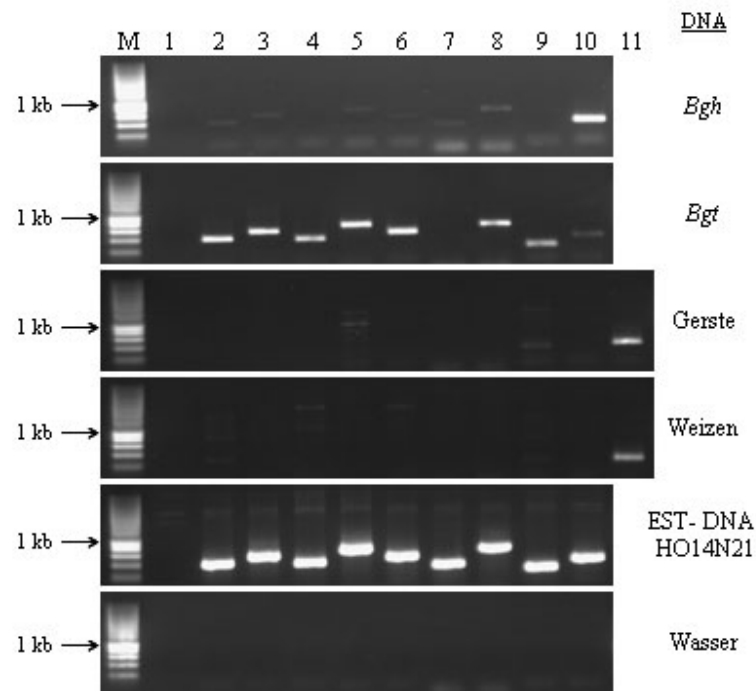
**Abb. 3.13: PCR-Ergebnisse für HIGS 25**

Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec befindet sich in Spalte M. In Spalte 1 befindet sich ein PCR-Ansatz mit DNA, aber ohne Primer. In Spalte 2 bis 20 wurden die PCR-Ansätze mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen aufgetragen. Der PCR-Ansatz mit Primern gegen pflanzliche GAPDH befindet sich in Spalte 21.

Dreizehn der 19 Primer-Kombinationen ergaben bei dem Kandidaten HIGS 25 auf *Bgh*-DNA die gewünschten PCR-Produkte, obwohl einige eine geringe Intensität aufwiesen (Abb. 3.13, Zeile 1). Mit *Bgt*-DNA konnten mit Ausnahme der Primer-Kombination in Spalte 10 mit allen Primer-Kombinationen die entsprechenden PCR-Produkte amplifiziert werden (Abb. 3.13, Zeile 2). Die Kontrolle mit EST-DNA HO09P14 zeigte, dass diese Primer-Kombination allgemein kein Produkt ergab (Abb. 3.13, Zeile 5, Spalte 10).

Mit Gersten- bzw. Weizen-DNA ergaben nur die GAPDH-Kontrollen die gewünschten PCR-Produkte (Abb. 3.13, Zeile 3 bzw. 4). Die Wasser-Kontrolle zeigte keine PCR-Produkte (Abb. 3.13, Zeile 6).

Diese PCR-Resultate sind ein weitere Indiz dafür, dass es sich bei dem Kandidatengen HIGS 25 um ein Gen aus *B. graminis* handelt.



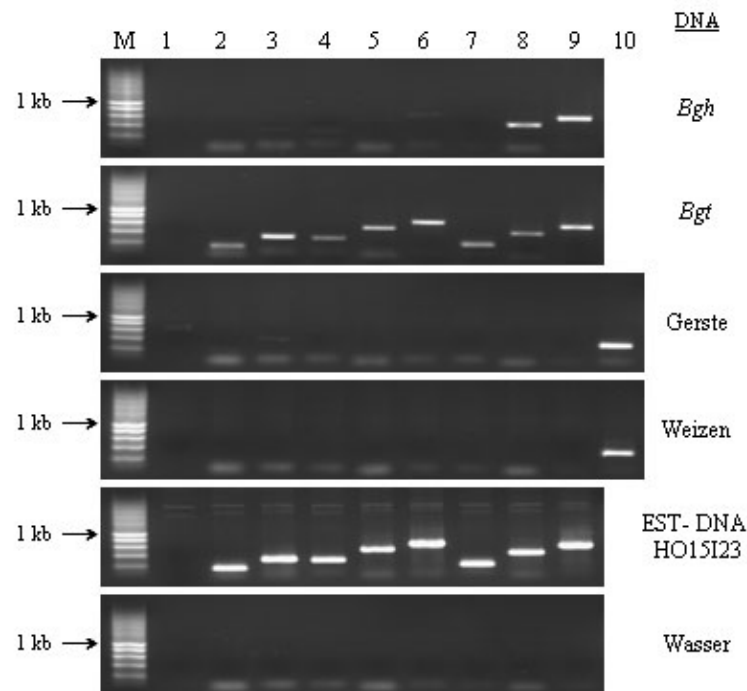
**Abb. 3.14: PCR-Ergebnisse für HIGS 31**

Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec befindet sich in Spalte M. In Spalte 1 befindet sich ein PCR-Ansatz mit DNA, aber ohne Primer. In Spalte 2 bis 10 wurden die PCR-Ansätze mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen aufgetragen. Der PCR-Ansatz mit Primern gegen pflanzliche GAPDH befindet sich in Spalte 11.

Für den Kandidat HIGS 31 ergaben sieben Primer-Kombinationen mit *Bgh*-DNA die erwarteten PCR-Produkte (Abb. 3.14, Zeile 1, Spalten 2, 3, 5 bis 8 und 10). Allerdings zeigten alle bis auf ein PCR-Produkt (Abb. 3.14, Zeile 1, Spalte 10) nur geringe Intensität. Mit *Bgt*-DNA ergaben acht Primer-Kombinationen ein PCR-Produkt, und das Produkt in Spalte 10 (Abb. 3.14, Zeile 2) zeigte nur geringe Intensität. Die PCR-Reaktionen mit EST-DNA bestätigten die Größen der Produkte, welche bei den Reaktionen mit *B. graminis*-DNA entstanden waren (Abb. 3.14, Zeile 5).

Die PCR-Reaktionen mit den Primer-Kombinationen 5 und 9 ergaben mit Gersten-DNA im Verhältnis zur *HvGAPDH*-Kontrolle Produkte mit geringer Intensität (Abb. 3.14, Zeile 3). Die Primer-Kombinationen 2, 4 und 6 zeigten auf Weizen-DNA PCR-Produkte (Abb. 3.14, Zeile 4). Die multiplen Banden, die hier entstanden waren, ließen auf unspezifische Produkte schließen und gelten daher nicht als Hinweis auf *Cross Silencing* von Gerstengeneten. Die Wasser-Kontrolle zeigte keine PCR-Produkte (Abb. 3.14, Zeile 6).

Diese PCR-Resultate sind ein weitere Indiz dafür, dass es sich bei dem Kandidatengen HIGS 31 um ein Gen aus *B. graminis* handelt.



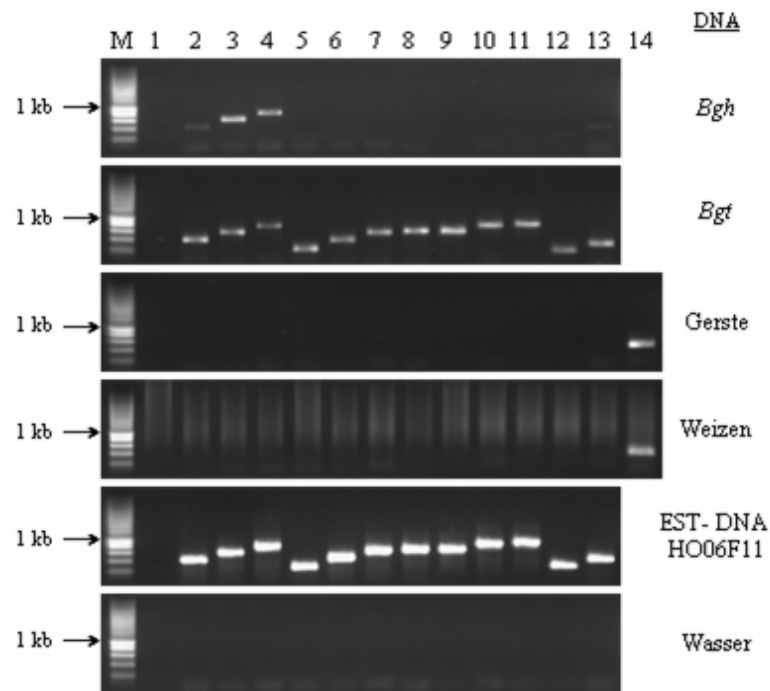
**Abb. 3.15: PCR-Ergebnisse für HIGS 32**

Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec befindet sich in Spalte M. In Spalte 1 befindet sich ein PCR-Ansatz mit DNA, aber ohne Primer. In Spalte 2 bis 9 wurden die PCR-Ansätze mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen aufgetragen. Der PCR-Ansatz mit Primern gegen pflanzliche GAPDH befindet sich in Spalte 10.

Bei der PCR auf *Bgh*-DNA für den Kandidaten HIGS 32 ergaben nur zwei von acht Primer-Kombinationen PCR-Produkte (Abb. 3.15, Zeile 1). Mit *Bgt*-DNA konnten mit allen Primer-Kombinationen die entsprechenden PCR-Produkte amplifiziert werden (Abb. 3.15, Zeile 2). Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass es sich hier um ein Gen aus *Bgt* handelt. Die PCR-Reaktionen mit EST-DNA bestätigten die Größen der Produkte, welche bei den Reaktionen mit *B. graminis*-DNA entstanden waren (Abb. 3.15, Zeile 5).

Die PCR auf Gersten-DNA in Spalte 3 (Abb. 3.15, Zeile 3) zeigte im Vergleich zur *HvGAPDH*-Kontrolle (Abb. 3.15, Zeile 3, Spalte 10) eine Bande von nur schwacher Intensität. Daher ist dieses PCR-Ergebnis kein Beweis für *Cross Silencing* eines Gerstengens. Mit Weizen-DNA ergab die PCR mit keiner der HIGS 32-spezifischen Primer-Kombinationen Produkte (Abb. 3.15, Zeile 4, Spalte 2 bis 9). Die Wasser-Kontrolle zeigte keine PCR-Produkte (Abb. 3.15, Zeile 6).

Diese PCR-Resultate sind ein weitere Indiz dafür, dass es sich bei dem Kandidatengen HIGS 32 um ein Gen aus *B. graminis* handelt.



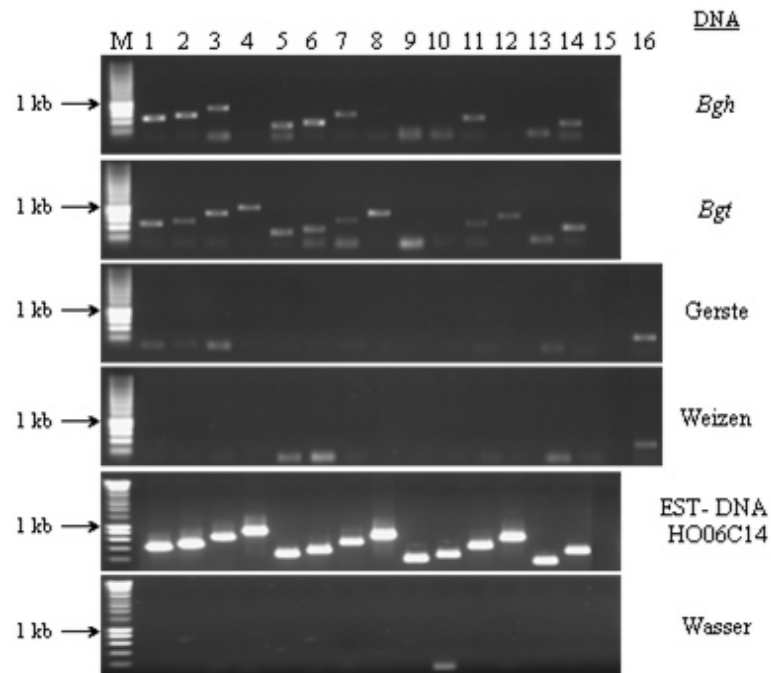
**Abb. 3.16: PCR-Ergebnisse für HIGS 35**

Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec befindet sich in Spalte M. In Spalte 1 befindet sich ein PCR-Ansatz mit DNA, aber ohne Primer. In Spalte 2 bis 13 wurden die PCR-Ansätze mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen aufgetragen. Der PCR-Ansatz mit Primern gegen pflanzliche GAPDH befindet sich in Spalte 14.

Die PCR auf *Bgh*-DNA für den Kandidaten HIGS 35 ergab mit vier Primer-Kombinationen die erwarteten PCR-Produkte (Abb. 3.16, Zeile 1, Spalte 2 bis 4 und 13). Auf *Bgt*-DNA ergaben dagegen alle Primer-Kombinationen PCR-Produkte (Abb. 3.16, Zeile 2), genauso wie auf der EST-DNA HO06F11 (Abb. 3.16, Zeile 5). Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass es sich hier um ein Gen aus *Bgt* handelt.

Die *Hv*GAPDH-Kontrolle war die einzige PCR-Reaktion, die auf Gersten-DNA ein Resultat ergab (Abb. 3.16, Zeile 3, Spalte 14). Mit Weizen-DNA zeigte sich in allen Spuren ein diffuser Schmier (Abb. 3.16, Zeile 4). Dieser Schmier erschien auch in der Kontroll-PCR ohne Primer (Abb. 3.16, Zeile 4, Spalte 1) und war wahrscheinlich auf eine Kontamination im PCR-Reaktionsmix zurückzuführen. Die Wasser-Kontrolle zeigte keine PCR-Produkte (Abb. 3.16, Zeile 6).

Diese PCR-Resultate sind ein weitere Indiz dafür, dass es sich bei dem Kandidatengen HIGS 35 um ein Gen aus *B. graminis* handelt.



**Abb. 3.17: PCR-Ergebnisse für HIGS 36**

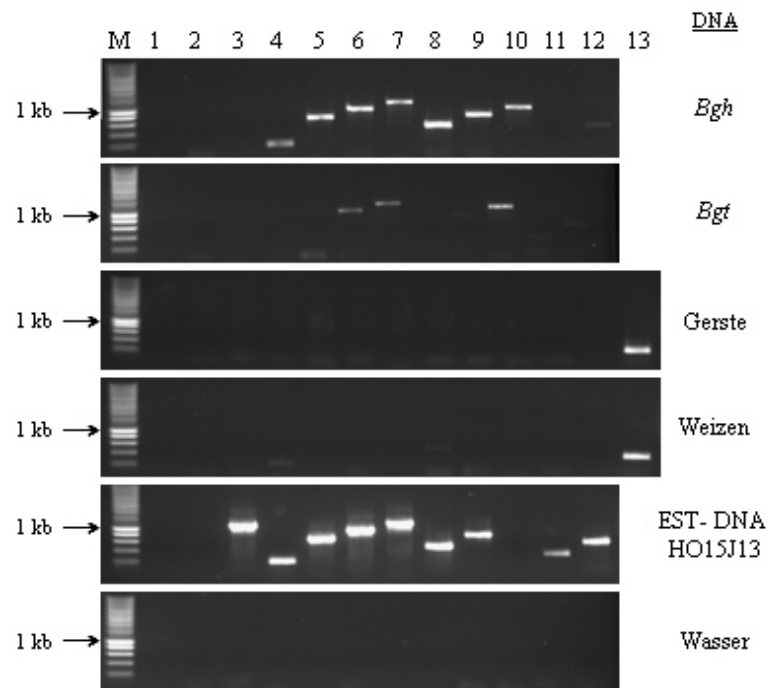
Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec befindet sich in Spalte M. In Spalte 15 befindet sich ein PCR-Ansatz mit DNA, aber ohne Primer. In Spalte 1 bis 14 wurden die PCR-Ansätze mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen aufgetragen. Der PCR-Ansatz mit Primern gegen pflanzliche GAPDH befindet sich in Spalte 16.

Neun von 14 Primer-Kombinationen ergaben für den Kandidaten HIGS 36 mit *Bgh*-DNA die erwarteten PCR-Produkte (Abb. 3.17, Zeile 1). Auf *Bgt*-DNA zeigte sich bei 12 Kombinationen ein PCR-Produkt (Abb. 3.17, Zeile 2).

Die PCR-Reaktionen auf pflanzlicher DNA zeigten die erwarteten Produkte in den entsprechenden GAPDH-Kontrollen (Abb. 3.17, Zeile 3 bzw. 4, Spalte 16). Die Kontrolle auf der EST-DNA HO06C14 zeigte, dass alle Primer-Kombinationen funktionierten (Abb. 3.17, Zeile 5). Die Wasser-Kontrolle zeigte keine PCR-Produkte (Abb. 3.17, Zeile 6).

Diese PCR-Resultate sind ein weitere Indiz dafür, dass es sich bei dem Kandidatengen HIGS 36 um ein Gen aus *B. graminis* handelt.





**Abb. 3.18: PCR-Ergebnisse für HIGS 47**

Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec befindet sich in Spalte M. In Spalte 1 befindet sich ein PCR-Ansatz mit DNA, aber ohne Primer. In Spalte 2 bis 12 wurden die PCR-Ansätze mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen aufgetragen. Der PCR-Ansatz mit Primern gegen pflanzliche GAPDH befindet sich in Spalte 13.

Für den Kandidat HIGS 47 erbrachten die PCR-Reaktionen mit *Bgh*-DNA bei acht von 11 Primer-Kombinationen die erwarteten Produkte (Abb. 3.18, Zeile 1). Mit *Bgt*-DNA konnten mit vier Primer-Kombinationen PCR-Produkte amplifiziert werden (Abb. 3.18, Zeile 2). Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass es sich hier um ein Gen aus *Bgh* handelt. Die PCR-Reaktionen mit EST-DNA bestätigten die Größen der Produkte, welche bei den Reaktionen mit *B. graminis*-DNA entstanden waren (Abb. 3.18, Zeile 5).

Mit Gersten- bzw. Weizen-DNA konnten nur mit den GAPDH-Primern PCR-Produkt amplifiziert werden (Abb. 3.18, Zeile 3 bzw. 4, Spalte 13). Die Wasser-Kontrollen ergaben keine PCR-Produkte (Abb. 3.18, Zeile 6).

Diese PCR-Resultate sind ein weitere Indiz dafür, dass es sich bei dem Kandidatengen HIGS 47 um ein Gen aus *B. graminis* handelt.

### 3.4.3 Zuordnung der Kandidatengene zum Transkriptom von *Bgh* bzw. *Bgt*

Aufgrund von blastN-Resultaten gegen die bei Cogeme verfügbaren *Bgh*-EST-Sequenzen und gegen die Genomsequenz von *Bgh* wurden die Kandidaten *Bgh* bzw. *Bgt* zugeordnet. Bei einer Identität von maximal 94% zwischen dem Kandidat und einer Sequenzen aus *Bgh*

wurde das Gen dem *Bgt*-Transkriptom zugeordnet. Bei einer Identität von mindestens 95% wurde es dem *Bgh*-Transkriptom zugeordnet. Die Resultate der PCR-Reaktionen (siehe Kapitel 3.4.2) unterstützten die Ergebnisse der blastN-Analysen. Der Kandidat wurde der *forma specialis* zugeordnet, bei der mehr als 50% der Primer-Kombinationen das erwartete PCR-Produkt ergaben. Wenn sowohl mit *Bgh*- als auch mit *Bgt*-DNA mehr als die Hälfte aller Primer-Kombinationen das erwartete PCR-Produkt ergaben, wurde keine Aussage getroffen.

**Tab. 3.9: Zuordnung der Kandidaten mit signifikantem Effekt zu der entsprechenden *formae speciales* (f.sp.) von *B. graminis***

Die einzelnen Kandidaten wurden aufgrund ihrer Identität zu *Bgh*-EST-Sequenzen aus der Cogeme-Datenbank bzw. zum *Bgh*-Genom einer *forma specialis* (f.sp.) von *B. graminis* zugeordnet. Für die blastN-Analyse wurde die bekannte Sequenz der Kandidaten verwendet (Anhang 6.3). Zusätzlich wurde die Schlussfolgerung aus den PCR-Analysen (siehe Kapitel 3.4.2) aufgelistet.

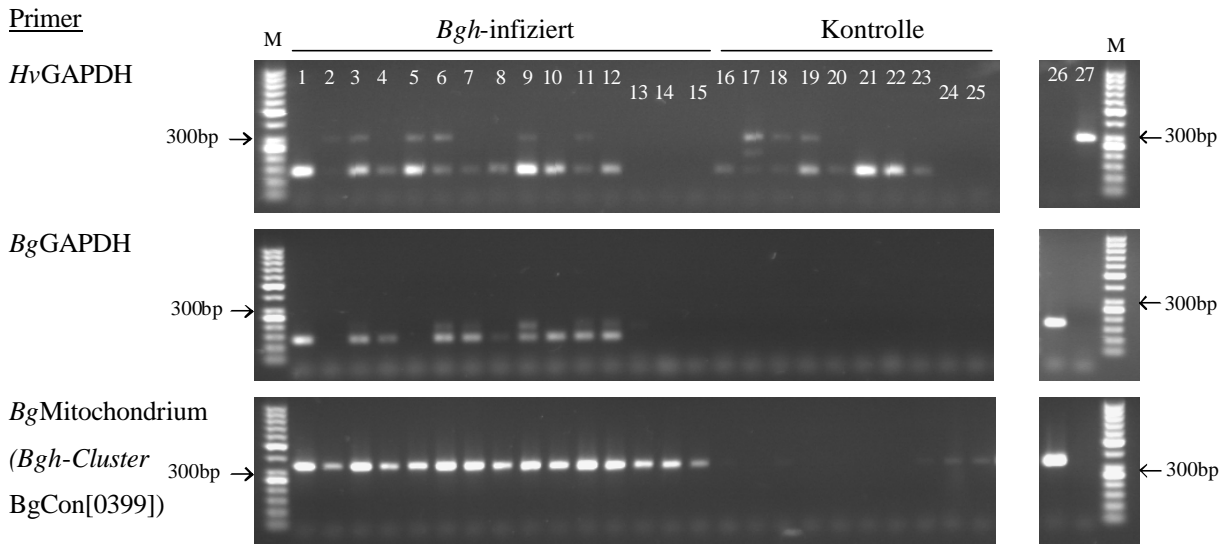
Kandidat	blastN bei Cogeme		blastN gegen das <i>Bgh</i> -Genom		PCR- Resultat
	Identität [%]	f.sp.	Identität [%]	f.sp.	
HIGS 2	90	<i>Bgt</i>	89	<i>Bgt</i>	?
HIGS 9	96	<i>Bgh</i>	96	<i>Bgh</i>	<i>Bgh</i>
HIGS 13	95	<i>Bgh</i>	96	<i>Bgh</i>	?
HIGS 20	99	<i>Bgh</i>	100	<i>Bgh</i>	?
HIGS 25	92	<i>Bgt</i>	93	<i>Bgt</i>	?
HIGS 31	92	<i>Bgt</i>	90	<i>Bgt</i>	?
HIGS 32	91	<i>Bgt</i>	92	<i>Bgt</i>	<i>Bgt</i>
HIGS 35	87	<i>Bgt</i>	87	<i>Bgt</i>	<i>Bgt</i>
HIGS 36	-	-	94	<i>Bgt</i>	?
HIGS 47	99	<i>Bgh</i>	99	<i>Bgh</i>	<i>Bgh</i>

Aufgrund der blastN-Analysen konnten 56% der Kandidaten, welche im Gersten-*Bgh*-System die Anfälligkeit signifikant beeinflusst hatten, vermutlich *Bgt* zugeordnet werden (Tab. 3.9). Nur 44% der Kandidaten schienen aus *Bgh* zu stammen.

### 3.5 Transkriptanalyse in Einzelzellen der Gerste

Um die Hypothese zu prüfen, dass *Bgh* Transkripte in seine Wirtszelle sekretiert, wurde cDNA von einzelnen Gerstenzellen analysiert. Mittels einer Glaskapillare wurde aus einzelnen Gerstenzellen Zytoplasma entnommen. Es wurden sowohl Proben von Pflanzen genommen, die nicht mit *Bgh* infiziert worden waren (Kontrolle), als auch von *Bgh*-infizierten Gerstenpflanzen. Bei den *Bgh*-infizierten Proben musste zum Zeitpunkt der

Probenentnahme ein Haustorium in der Zelle sichtbar sein. Die Proben von jeweils zehn Einzelzellen wurden zusammengeführt. Die in den Proben vorhandene RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels PCR auf pilzliche und pflanzliche Transkripte untersucht.



**Abb. 3.19: Nachweis von pflanzlichen und pilzlichen Transkripten in Epidermis-Einzelzellproben**

Die Spalte M enthält den Größenstandard ‚GeneRuler 50bp DNA Ladder‘ (Fermentas, Anhang 6.4). Die Spalten 1 bis 15 enthalten PCR-Produkte basierend auf Extrakten von einzelnen Gerstenzellen, welche von *Bgh* infiziert worden waren. Bei Probe 13 bis 15 wurde die vorhandene RNA nicht in cDNA umgeschrieben. In den Spalten 16 bis 25 befinden sich PCR-Produkte basierend auf Extrakten von einzelnen Gerstenzellen, welche von Blättern stammten, die nicht mit *Bgh* inokuliert worden waren. Bei den Proben 24 und 25 wurde die vorhandene RNA nicht in cDNA umgeschrieben. Die PCR-Produkte in Spalte 26 wurden mit Hilfe von *Bgh*-DNA amplifiziert. Die PCR-Produkte in Spalte 27 wurden mit Hilfe von DNA aus Gerstenpflanzen (Kultivar ‚Golden Promise‘) amplifiziert.

Die *HvGAPDH*-Primer überspannten ein Intron. Daher war ein PCR-Produkt, das auf genomischer DNA basierte etwa 150 Basen größer, als ein PCR-Produkt, welches auf cDNA basierte. In allen Proben, in welchen die RNA in cDNA umgeschrieben wurde, konnte das auf cDNA basierende PCR-Produkt von etwa 150 Basen amplifiziert werden (Abb. 3.19, Zeile 1, Spalten 1 bis 12 und Spalten 16 bis 23). Einige dieser Proben zeigten ein weiteres Produkt, welches in der Größe mit dem erwarteten Produkt auf genomischer Gersten-DNA übereinstimmte (Abb. 3.19, Zeile 1, Spalte 27). Die Proben, die nicht mit reverser Transkriptase behandelt worden waren (Abb. 3.19, Zeile 1, Spalte 13 bis 15, 24, 25) zeigten kein PCR-Produkt.

Die *BgGAPDH*-Primer überspannten ein Intron von 51 Basen. Die PCR mit Proben, welche aus *Bgh*-infizierten Gerstenzellen entnommen worden waren (Abb. 3.19, Zeile 2, Spalte 1 bis 12), zeigten fast alle (außer Abb. 3.19, Zeile 2, Spalte 2 und 5) ein Produkt, dessen

Größe der erwarteten Produktgröße mit cDNA entsprach. Die Hälfte aller Reaktionen (Abb. 3.19, Zeile 2, Spalte 6, 7, 9, 11 und 12) zeigte außerdem ein PCR-Produkt, welches 50 Basen größer war. Dies entsprach der Größe des Produktes aus der *Bgh*-DNA-Kontrolle (Abb. 3.19, Zeile 2, Spalte 26). Die PCR-Reaktionen mit dem Material, welches nicht in cDNA umgeschrieben worden war, sowie mit dem Material aus der nicht mit *Bgh* infizierten Kontrolle zeigten keine PCR-Produkte mit den *Bg*GAPDH-Primern (Abb. 3.19, Zeile 2, Spalte 13 bis 25).

Da die Proben, die nicht mit reverser Transkriptase behandelt worden waren (Abb. 3.19, Zeile 1, Spalte 13 bis 15, 24, 25) keine PCR-Produkte lieferten, konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei den zusätzlichen PCR-Produkten, die in ihrer Größe mit Produkten von PCR-Reaktionen mit genomischer DNA übereinstimmten auch wirklich von genomischer DNA stammten. Es blieb die Möglichkeit, dass hier cDNA basierend auf ‚*non spliced*‘ RNA als *Template* diente. Deshalb wurde als weitere Kontrolle eine PCR-Reaktion mit Primern, die auf dem mitochondrialen Genom aus *Bgh* basierten, durchgeführt. Diese Kontrolle sollte klären, ob die Einzelzellproben mit pilzlichem Zytoplasma kontaminiert sind. Die PCR zeigte in allen Proben, welche aus *Bgh*-infizierten Zellen genommen worden waren, ein Produkt in der erwarteten Größe (Abb. 3.19, Zeile 3, Spalte 1 bis 15). Bei einigen PCR-Reaktionen auf Proben aus nicht mit *Bgh* infizierten Zellen erschien ein schwaches PCR-Produkt (Abb. 3.19, Zeile 3, Spalte 23 bis 25). Diese Proben schienen verunreinigt worden zu sein. Eine Kreuzreaktion zwischen Gersten-DNA und den *B. graminis*-spezifischen Primern ist unwahrscheinlich, da nur drei von zehn PCR-Reaktionen ein Produkt ergaben.

### 3.6 Test dreier Kandidaten mit VIGS im Weizen-*Bgt*-System

Für VIGS wurden drei Kandidaten ausgewählt, die in den TIGS-Experimenten die Anfälligkeit des Gersten-*Bgh*-Systems signifikant reduziert hatten. Gegen diese Kandidaten wurden *Bgt*-spezifische *Antisense* (as)-Konstrukte erstellt und mittels des *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) in Weizenpflanzen eingebracht. Die Penetrationsrate und das Wachstum von *Bgt* auf den BSMV-infizierten Pflanzen wurden mittels Mikroskopie analysiert. Für den Kandidaten HIGS 47 wurde außerdem mit *real time*-PCR Daten über die Expression in *Bgt* sieben Tage nach Inokulation gesammelt.

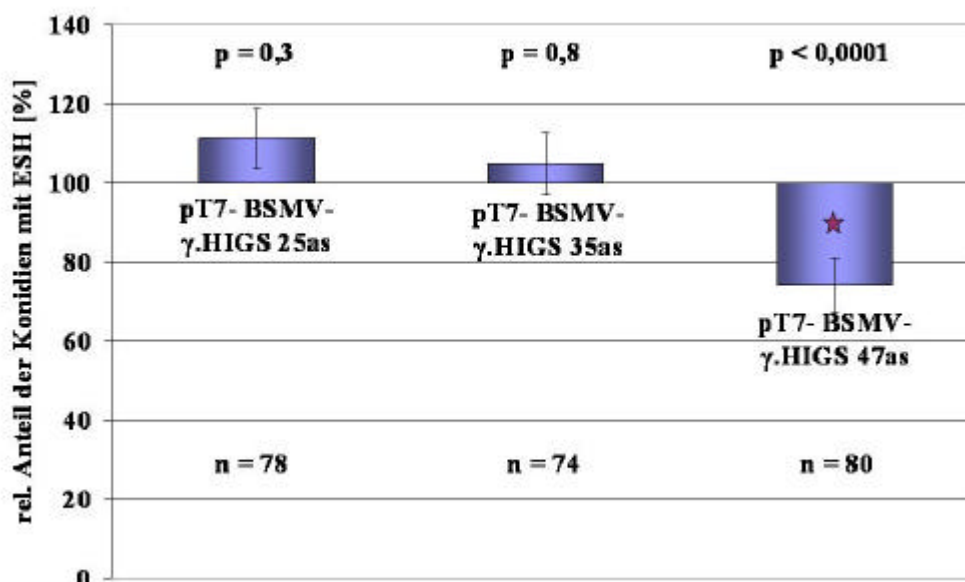
### 3.6.1 Analyse der Anfälligkeit gegen *Bgt* durch Mikroskopie

Bei den VIGS-Experimenten wurde nicht der Haustoriale Index berechnet, sondern die epiphytischen Pilzstrukturen ausgewertet.

Es wurden alle Blätter außer dem Primärblatt, an dem die Virus-Inokulation durchgeführt worden war, und dem Sekundärblatt für die Auswertung herangezogen. Zwar wurden Unterschiede bei VIGS-Experimenten mit *Bgh*-infizierter Gerste zwischen Blättern des Haupttriebes bzw. der Seitentriebe von Hein et al. (2005) beschrieben. Diesen Untersuchungen wurden aber an pflanzlichen Genen durchgeführt, die möglicherweise in den Blättern der Seitentriebe anders reguliert sind als in Blättern des Haupttriebs. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurden pilzliche Gene untersucht und die Pflanze wurde ‚nur‘ als Produzent von dsRNA bzw. siRNA genutzt. Daher sind kaum Unterschiede in VIGS-Effekten zwischen Haupt- und Seitentrieben zu erwarten.

#### 3.6.1.1 Penetrationsrate

Es wurde die Anzahl der Konidien, welche einen appressorialen Keimschlauch (AGT), aber keine elongierenden sekundären Hyphen (ESH) ausgebildet hatten, bestimmt. Diese Summe wurde in Relation zur Anzahl von Konidien mit ESH gesetzt. Dieser Wert wurde als Maß für erfolgreiche Penetration und Haustorienbildung herangezogen.



**Abb. 3.20: Ausbildung von ESH bei *Bgt* auf BSMV-infizierten Weizenblättern**

*Bgt*, der auf Pflanzen, welche mit pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS (leeren Vektor-Kontrolle) infiziert wurden, gewachsen ist, wurde auf 100% gesetzt. N gibt die Anzahl der analysierten Weizenblätter an. P ist

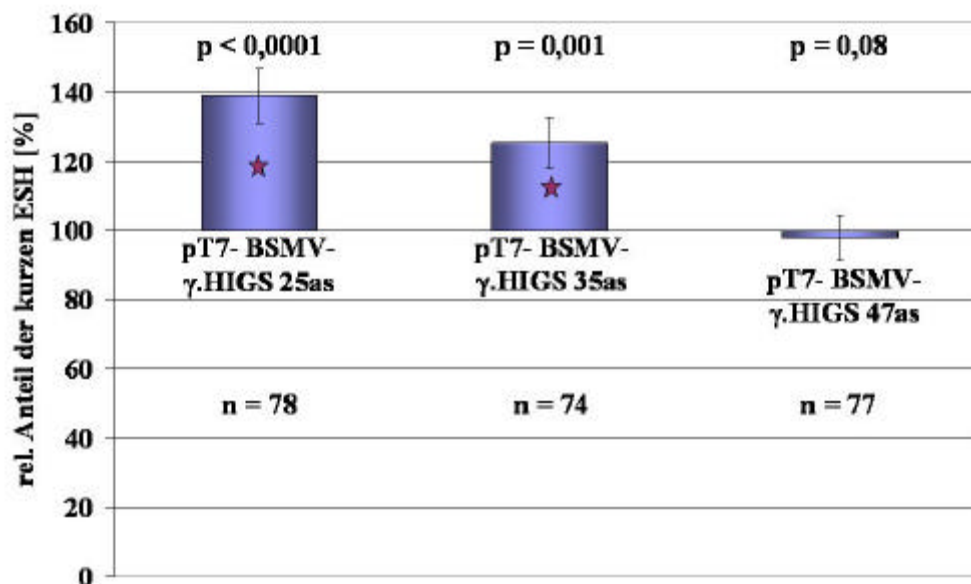
der zweiseitige p-Wert des Wilcoxon-Rangsummen-Test. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler an. Rote Sterne markieren signifikante Resultate.

*Bgt*, der auf mit pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS25as infizierten Pflanzen gewachsen war, bildete 11,4% mehr ESH aus als *Bgt* auf Pflanzen, welche mit pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS infiziert worden waren (Abb. 3.20). Das gleiche Bild zeigte sich bei *Bgt* auf Pflanzen, welche mit pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS35as infiziert worden waren: 5% mehr Konidien bildeten ESH aus (Abb. 3.20). Keiner dieser Unterschiede war statistisch signifikant ( $p = 0,3$  bzw.  $p = 0,8$ ).

Auf Pflanzen, welche mit pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS47as infiziert worden waren, hatte *Bgt* Schwierigkeiten sich zu etablieren und bildete, verglichen mit der leeren Vektor-Kontrolle pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS, 25,9% weniger ESH aus. Dieser Effekt war mit einem p-Wert  $< 0,0001$  im Wilcoxon-Rangsummen-Test hoch signifikant (Abb. 3.20).

### 3.6.1.2 Wachstum des Pilzmyzels

Die weitere Entwicklung des Pilzes, nachdem er sich auf BSMV-infizierten Pflanzen etabliert hatte, wurde anhand der ESH-Länge untersucht. Eine vermehrte Anzahl von kurzen ESH zeigt, dass der Pilz in seinem Wachstum gestört war. Dabei wurden ESH als kurz betrachtet, wenn sie maximal die fünffache Länge eines Mehltau-Konidiums aufwiesen.



**Abb. 3.21: Anteil der Konidien mit kurzen ESH an der Gesamtheit aller Konidien mit ESH bei *Bgt* auf BSMV-infizierten Weizenblättern**

*Bgt*, der auf mit pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS (leeren Vektor-Kontrolle)-infizierten Pflanzen gewachsen war, wurde auf 100% gesetzt. N gibt die Anzahl der analysierten Weizenblätter an. P ist der zweiseitige p-

---

Wert des Wilcoxon-Rangsummen-Test. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler an. Rote Sterne markieren signifikante Resultate.

*Bgt* zeigte auf Pflanzen, welche den pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS25as trugen, 38,9% mehr verkürzte ESH im Vergleich zu *Bgt* auf Pflanzen, welche mit pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS infiziert worden waren (Abb. 3.21). Dieser Unterschied war im Wilcoxon-Rangsummen-Test hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ).

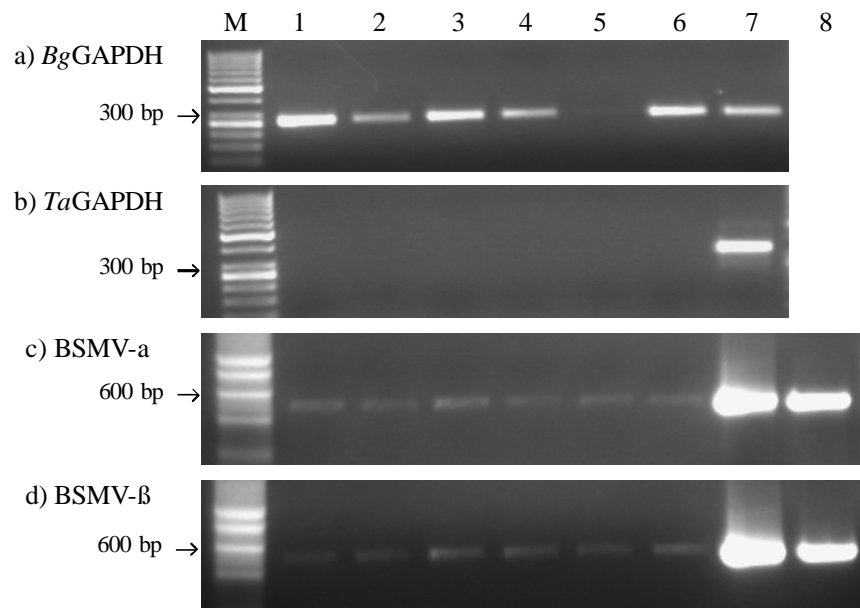
Auch das Konstrukt pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS35as beeinflusste das Pilzwachstum signifikant ( $p = 0,001$ ) und ergab 25,2% mehr kurze Hyphen im Vergleich zur leeren Vektor-Kontrolle pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS (Abb. 3.21).

Durch das Konstrukt pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS47as wurde der Anteil der verkürzten Hyphen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 3.21).

### **3.6.2 Transkriptanalyse in *Bgt***

#### **3.6.2.1 Qualitätsprüfung des mit Zellulose-Acetat geernteten Pilzmaterials**

Mit Zellulose-Acetat wurden die epiphytischen Pilzstrukturen von den BSMV-infizierten Weizenpflanzen getrennt, um pilzliche Transkripte zu analysieren. Mittels PCR sollte geklärt werden, ob das pilzliche Material durch pflanzliche Bestandteile wie z.B. Trichome, welche am Zellulose-Acetat haften geblieben waren, kontaminiert worden war. Außerdem wurde das Vorhandensein von BSMV-RNA in den Proben überprüft.



**Abb. 3.22: PCR mit cDNA aus *Bgt*, welcher auf BSMV-infizierten Pflanzen gewachsen war**

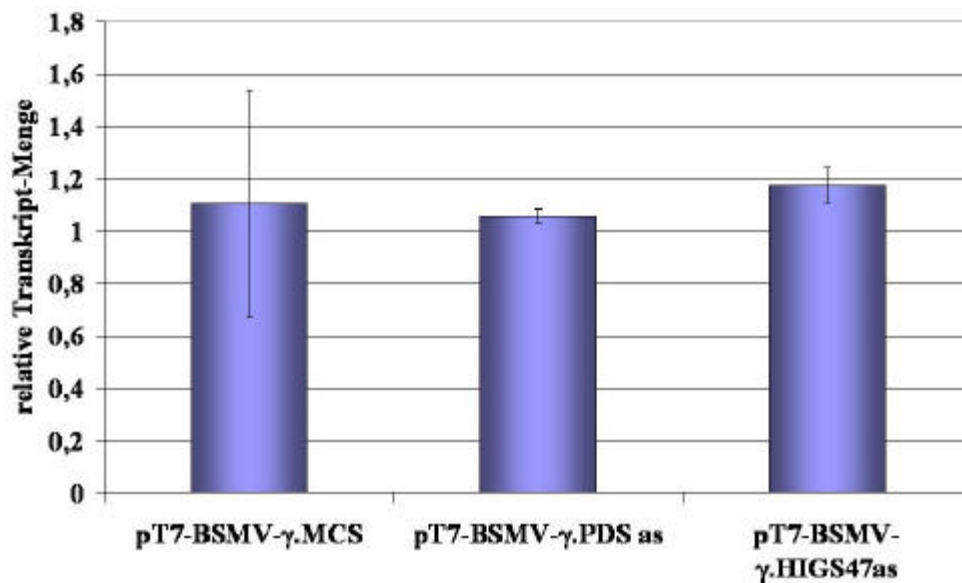
Die Spalte M in Zeile a) und b) zeigt den Größenstandard ‚GeneRuler 50bp DNA Ladder‘ (Fermentas, Anhang 6.4). In Spalte M in Zeile c) und d) befindet sich der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec. Das *Template* für die PCR in Spalte 1 und 2 war cDNA aus *Bgt*, welcher auf mit pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS-infizierten Pflanzen gewachsen war. In Spalte 3 und 4 wurde das PCR-Produkt aufgetragen, welches mit cDNA aus *Bgt* von pT7-BSMV- $\gamma$ .PDSas-infizierten Pflanzen amplifiziert wurde. Das aufgetragene PCR-Produkt in Spalte 5 und 6 basiert auf cDNA aus *Bgt* von pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS47as-infizierten Pflanzen. In Spalte 7 befinden sich die DNA-Kontrollen: Bei den *BgGAPDH*-Primern wurde genomische *Bgt*-DNA eingesetzt. Die *TaGAPDH*-Primer wurden auf Weizen-DNA (Kultivar ‚Kanzler‘) getestet. Für die BSMV-spezifischen Primer wurde in der Kontrolle die entsprechende Vektor-DNA eingesetzt. Hier wurde außerdem eine weitere Kontrolle eingesetzt (Spalte 8). Die Grundlage dieser PCR war cDNA aus RNA von BSMV-infizierten, aber nicht *B. graminis*-infizierten Weizenpflanzen.

Die PCR-Resultate zeigten, das sich die pilzliche GAPDH mit cDNA, die auf RNA aus *Bgt* von BSMV-infizierten Pflanzen basierte (Abb. 3.22, Zeile a, Spalte 1 bis 6), ebenso amplifizieren ließ wie mit genomischer *Bgt*-DNA (Abb. 3.22, Zeile a, Spalte 7). Mit BSMV-spezifischen Primern ließen sich mit pilzlicher cDNA geringere Menge an PCR-Produkt amplifizieren als mit pflanzlicher cDNA (Abb. 3.22, Zeile c und d, Spalte 8) oder mit BSMV-Vektor-DNA (Abb. 3.22, Zeile c und d, Spalte 7). Dennoch ließt sich in jedem der unterschiedlichen Ansätze mit pilzlicher cDNA ein PCR-Produkt der erwarteten Größe amplifizieren (Abb. 3.22, Zeile c und d, Spalte 1 bis 6). Diese Produkte schienen nicht auf Kontamination mit pflanzlicher DNA zu basieren, da die PCR-Reaktionen mit *TaGAPDH*-Primern keine Produkte ergaben (Abb. 3.22, Zeile b, Spalte 1 bis 6). Sie deuten vielmehr daraufhin, dass geringe Mengen Virus in den Pilz gelangt waren.



### 3.6.2.2 Expressionsanalyse von HIGS 47 in *Bgt* auf BSMV-infiziertem Weizen

Die RNA wurde aus *Bgt*-Myzel isoliert, welches acht Tage nach Inokulation von Blättern BSMV-infizierter Weizenpflanzen geerntet worden war. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und für eine quantitative *real time*-PCR eingesetzt. Die Transkriptmenge von HIGS 47 wurde mittels Standardkurve berechnet und auf die Transkriptmenge des Monoglyceridlipase-Gens aus *Bgt* normalisiert.



**Abb. 3.23:** *Real time*-PCR-Daten zur Expression von HIGS 47 in *Bgt*, welcher auf BSMV-infizierten Pflanzen gewachsen war

Alle Daten wurden auf die Expressionsdaten des Monoglyceridlipase-Gens aus *Bgt* normalisiert. Das Primerpaar für HIGS 47 liegt in 5'-Richtung vor dem Genbereich, welcher der Sequenz des VIGS-Konstruktes pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS47as entspricht. Die gezeigten Daten setzen sich aus zwei biologischen Replikaten zusammen.

Die relative Transkriptmenge von HIGS 47 in *Bgt*-Myzel, welches auf pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS47as-infizierten Pflanzen gewachsen war, unterschied sich mit 1,18 nicht wesentlich von der relative Transkriptmenge (1,1) in *Bgt*-Myzel, welches von pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS-infizierten Blättern geerntet wurde (Abb. 3.23). Die relative Transkriptmenge, die in *Bgt*-Myzel, welches auf pT7-BSMV- $\gamma$ .PDSas-infizierten Pflanzen gewachsen war, gemessen wurde unterschied sich mit 1,06 ebenfalls nicht von diesen Werten (Abb. 3.23).

## 3.7 Transgene Gerstenpflanzen

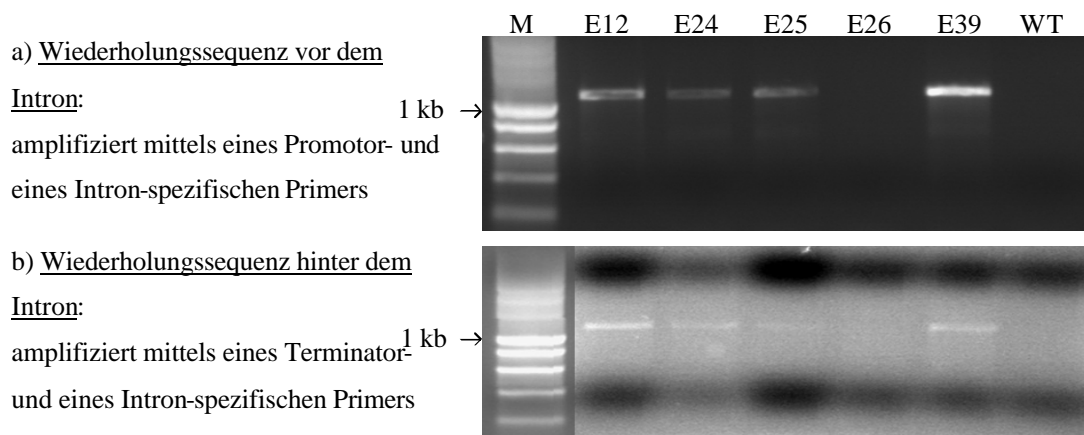
Es wurden transgene Gerstenpflanzen erstellt, die ein RNAi-Konstrukt gegen den Kandidaten HIGS 47 enthielten (Konstrukt-ID: pIPKb007\_HIGS 47.2). Einige Linien

wurden ausgewählt und der auf ihnen gewachsen *Bgh* makroskopisch, mikroskopisch und auf Transkriptomebene untersucht. Makroskopisch wurde die mittlere infizierte Blattoberfläche nach sieben Tagen ausgewertet. Mikroskopisch wurde die Penetrationsrate untersucht. Ferner wurde in den epiphytischen Pilzstrukturen die Transkriptabundanz von HIGS 47 analysiert.

### 3.7.1 Analyse des RNAi-Konstruktes in transgenen Gersten-Linien

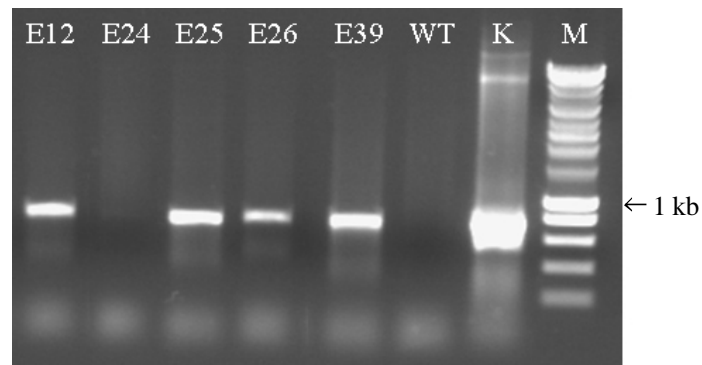
#### 3.7.1.1 Nachweis des RNAi-Konstruktes mittels PCR

DNA, die aus T<sub>0</sub>-Pflanzen isoliert wurde, wurde mittels PCR auf das Vorhandensein der beiden Wiederholungssequenzen des RNAi-Konstruktes und des Resistenzmarkergens Hygromycin-Phosphotransferase *Hpt*<sup>r</sup> untersucht.



**Abb. 3.24: PCR mit spezifischen Primern gegen die Wiederholungssequenzen des RNAi-Konstruktes in den transgenen Pflanzen**

Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec befindet sich in Spalte M. In den anderen Spalten wurden die Produkte aus PCR-Reaktionen mit pIPKb007\_HIGS 47.2-spezifischen Primern, welche die zwei Wiederholungssequenzen des Haarnadel-Konstruktes amplifizieren, aufgetragen. Es wurde DNA aus T<sub>0</sub>-Pflanzen der Linien E12, E24, E25, E26 und E39 für die PCR verwendet. In der Spalte WT wurde der PCR-Ansatz mit Gersten-DNA von nicht transformierten ‚Golden Promise‘-Pflanzen aufgetragen.



**Abb. 3.25: PCR mit spezifischen Primern gegen das Hygromycin-Phosphotransferase-Gen *Hpt<sup>r</sup>*, welches als Resistenz-Marker in den transgenen Pflanzen diente**

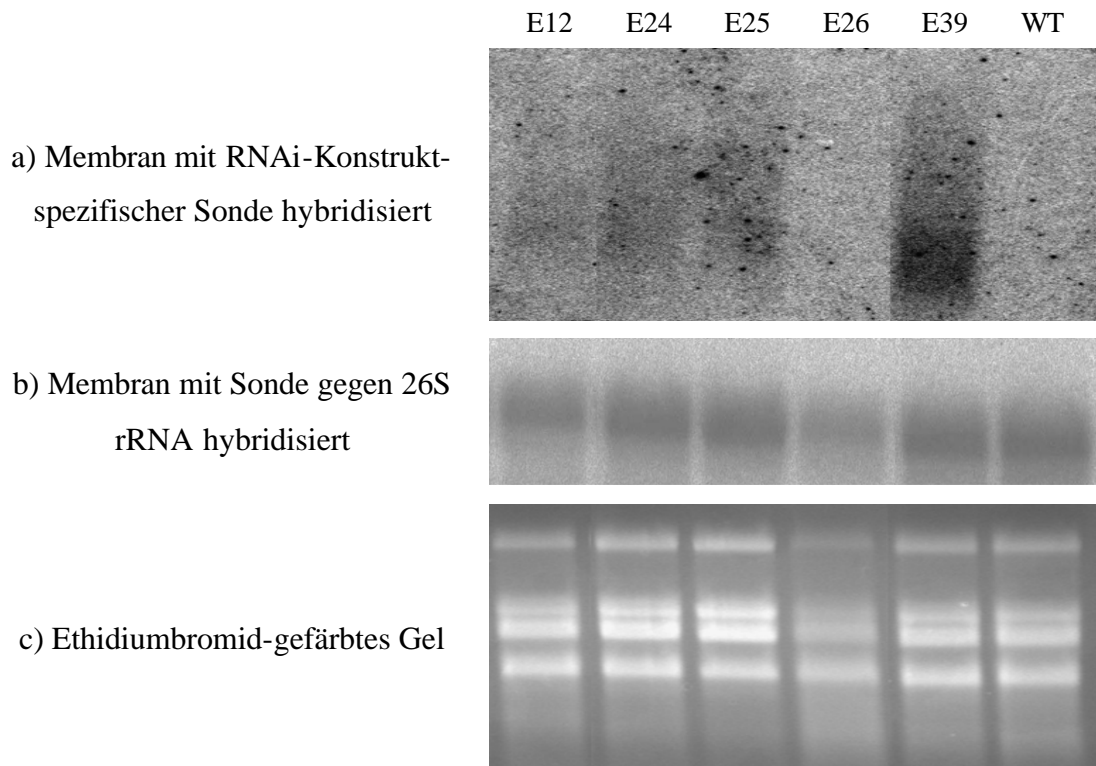
Der Größenstandard SmartLadder (Anhang 6.4) von Eurogentec befindet sich in Spalte M. Es wurde eine Standard-PCR mit T<sub>0</sub>-DNA aus den transgenen Linien E12, E24, E25, E26 und E39 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde DNA von nicht transformierten Gerstenpflanzen (WT) eingesetzt. Als Positivkontrolle (K) wurde Vektor-DNA des RNAi-Konstrukts pIPKb007\_HIGS 47.2 verwendet.

Die PCR-Reaktionen mit DNA aus den transgenen Linien E12, E24, E25 und E39 zeigten sowohl mit Primern für die Wiederholungssequenz vor dem Intron des Haarnadel-Konstruktes pIPKb007\_HIGS 47.2 als auch mit Primern für die Wiederholungssequenz hinter dem Intron die erwarteten PCR-Produkte (Abb. 3.24, a bzw. b). Die PCR-Reaktion mit DNA der transgenen Linie E26 zeigte ebenso wie die Reaktion mit DNA aus nicht transformierter Gerste mit keiner Primer-Kombination ein spezifisches PCR-Produkt (Abb. 3.24).

Die Linien E12, E25, E26 und E39 zeigten mit Primern, welche spezifisch für das *Hpt<sup>r</sup>*-Gen sind, ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe (Abb. 3.25). Bei der Linie E24 zeigte sich mit *Hpt<sup>r</sup>*-spezifischen Primern kein Produkt.

### 3.7.1.2 Analyse der Expression des Transgens

RNA wurde aus einer Mischung von mindestens zehn T<sub>1</sub>-Pflanzen pro Linie isoliert. Der daraus angefertigte *Northern Blot* wurde zuerst mit einer Sonde, deren Sequenz der des RNAi-Konstruktes in den Pflanzen entsprach, hybridisiert. Anschließend wurde eine 26S rRNA-Sonde verwendet, um die Qualität und Quantität der RNA auf der Membran zu überprüfen.



**Abb. 3.26: Analyse der Expression des Transgens mittels *Northern Blot***

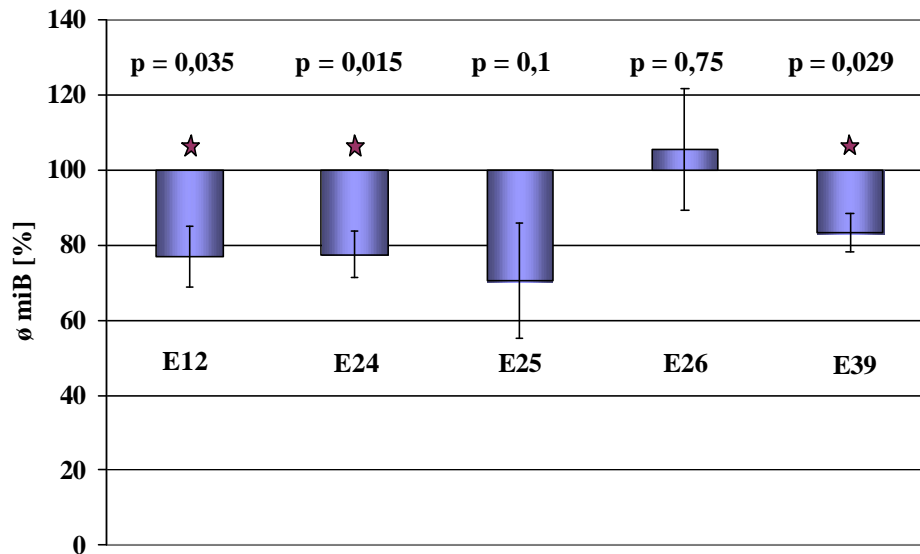
Es wurde Gesamt-RNA verschiedener transgener Linien (E12, E24, E25, E26 und E39) sowie Gesamt-RNA von nicht transformierten ‚Golden Promise‘-Pflanzen (WT) mit zwei unterschiedlichen Sonden analysiert. Zuerst wurde mit einer Sonde, welche spezifisch für das Transgen war (a), und anschließend mit einer 26S rRNA-Sonde (b) hybridisiert. In c) ist das mit Ethidiumbromid-gefärbte RNA-Gel abgebildet.

Die Linie E26 zeigte keine Expression des Transgenes (Abb. 3.26a). In Gesamt-RNA der Linien E12, E24, E25 und E39 war eindeutig RNA des Transgens vorhanden. Die Linie E39 zeigte das stärkste Signal nach der Hybridisierung mit der HIGS 47-spezifischen Sonde. Die WT-RNA war frei von HIGS 47-Transkript. Bei der Hybridisierung mit der 26S rRNA-spezifischen Sonde zeigte sich in allen Spalten ein deutliches Signal (Abb. 3.26b). Das Ethidiumbromid-gefärbte Gel zeigte in allen Spuren intakte RNA (Abb. 3.26c).

Zusammen mit den PCR-Resultaten (Abb. 3.24 und 3.25) ergaben die *Northern Blot*-Daten, dass die Linien E12, E24, E25 und E39 je eine vollständige RNAi-Kassette trugen und diese auch exprimierten. Die Linie E26 hingegen trug nur das Hpt<sup>f</sup>-Resistenzgen.

### 3.7.2 Makroskopische Analyse der Anfälligkeit der transgenen Pflanzen gegen *Bgh*

Bei der makroskopischen Analyse der Anfälligkeit (Bonitur) wurde die mittlere infizierte Blattoberfläche (miB) eine Woche nach Inokulation mit *Bgh* berechnet.



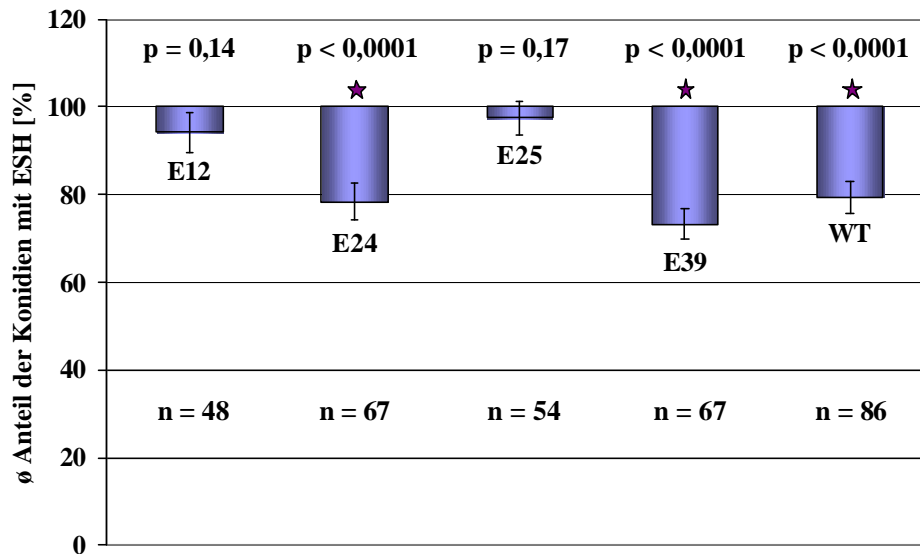
**Abb. 3.27: Boniturdaten transgener Gerstenpflanzen**

Die miB (mittlere infizierte Blattoberfläche) wurde für jede Linie anhand der miB der nichttransformierten ‚Golden Promise‘-Pflanzen (WT, auf 100% gesetzt), welche auf der gleichen Palette gewachsen waren, normalisiert. Es liegen Mittelwerte aus fünf (Linien E26 und E39) respektive sechs (Linien E12, E24 und E25) unabhängigen Experimenten vor. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler. Der p-Wert zeigt die Signifikanz im t-Test. Rote Sterne markieren signifikante Resultate.

Mit Ausnahme der Linie E26 zeigten alle getesteten transgenen Linien eine Reduktion der mittlere infizierten Blattoberfläche (miB) im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen (WT). Die miB der Linien E12, E24 und E39 lag jeweils etwa 20% unter dem Wert des WT. In allen drei Fällen war dieser Unterschied in einem t-Test signifikant (Abb. 3.27). Die Linie E25 zeigte die stärkste Reduktion der miB. Die Reduktion um 29,8% war aber statistisch nicht signifikant. Die Pflanzen der Linie E26 hatten einen miB, der 5,2% über dem des WT lag, was statistisch nicht signifikant war.

### 3.7.3 Analyse der Anfälligkeit gegen *Bgh* durch Mikroskopie

Bei der Mikroskopie wurde die Penetrationsrate von *Bgh* untersucht. Dazu wurde der Anteil der Konidien ohne ESH mit dem Anteil der Konidien mit ESH verglichen.



**Abb. 3.28: Ausbildung von ESH bei *Bgh* auf transgenen Gerstenblättern**

Die Abbildung zeigt den mittleren Anteil der Konidien, welche auf den transgenen Gerstenlinien E12, E24, E25, E39 oder auf nicht transformierten ‚Golden Promise‘-Pflanzen (WT) elongierende sekundäre Hyphe (ESH) ausgebildet hatten. Der Anteil von *Bgh*-Konidien mit ESH, die auf der negativen Kontrolllinie E26 gewachsen waren, wurde auf 100% gesetzt. N gibt die Anzahl der analysierten Gerstenblätter an. P ist der zweiseitige p-Wert des Wilcoxon-Rangsummen-Test. Rote Sterne markieren die signifikanten Resultate. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

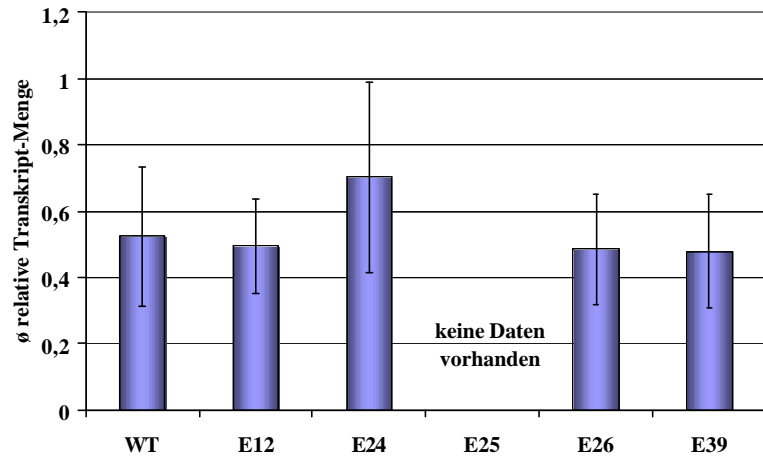
Konidien von *Bgh*, welche auf Pflanzen der transgenen Linien E12 (94,2%) und E25 (97,5%) gekeimt waren, bildeten etwa genauso oft ESH aus wie Konidien von *Bgh*, welche auf Pflanzen der Linie E26 (100%) gekeimt waren. Auf Pflanzen der exprimierenden Linien E24 und E39 zeigte *Bgh* im Vergleich zu *Bgh* auf Pflanzen der nicht-exprimierenden Linie E26 eine signifikant reduzierte Ausbildung von ESH. Das Maß der Reduktion der Anfälligkeit entspricht den Werten, die in den VIGS-Experimenten gemessen wurden (Abb. 3.20).

Konidien, welche auf nicht transformierten Wildtyp (WT)-Pflanzen gekeimt waren (79,4%, Abb. 3.28), bildeten signifikant ( $p < 0,0001$ ) weniger ESH aus als auf Pflanzen der Linie E26. Möglicherweise hatte *Bgh* auf den Blättern der nicht transformierten ‚Golden Promise‘-Pflanzen anfänglich Probleme sich zu etablieren. Die Boniturdaten zeigten, dass *Bgh* nur mehr Zeit brauchte, um sich auf WT-Pflanzen zu etablieren. Bei der Bonitur waren WT-Pflanzen genauso stark infiziert wie Pflanzen der Linie E26 (Abb. 3.27). Warum dieses Problem bei den transgenen Pflanzen, die auch auf dem Kultivar ‚Golden Promise‘ basieren, nicht auftrat, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Experimente mit Pflanzen, die z.B. den RNAi-Vektor ohne RNAi-Konstrukt tragen, könnten klären, ob transgene ‚Golden Promise‘-Pflanzen anfälliger gegen Mehltau sind als WT-Pflanzen.

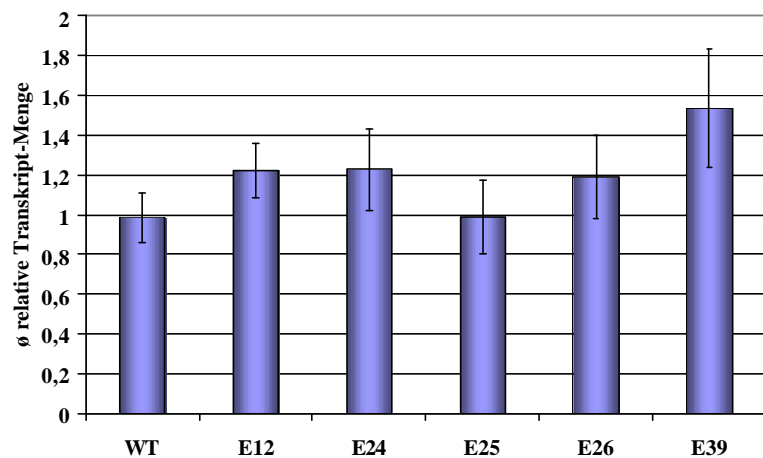
### **3.7.4 Expressionsanalyse von HIGS 47 in *Bgh* auf transgenen Gerstenpflanzen**

Die RNA wurde aus Pilzmyzel isoliert, welches an drei unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation von Gerstenblättern, welche das RNAi-Konstrukt gegen HIGS 47 enthielten, geerntet wurde. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und für eine quantitative *real time*-PCR eingesetzt. Die Transkriptmenge von HIGS 47 wurde mittels Standardkurve berechnet und gegen die Transkriptmenge des Monoglyceridlipase-Gens aus *Bgh* normalisiert. Die HIGS 47-spezifischen Primer amplifizierten einen Bereich im HIGS 47-Gen, welcher in 3'-Richtung außerhalb der Sequenz des RNAi-Konstruktes HIGS 47.2 lag.

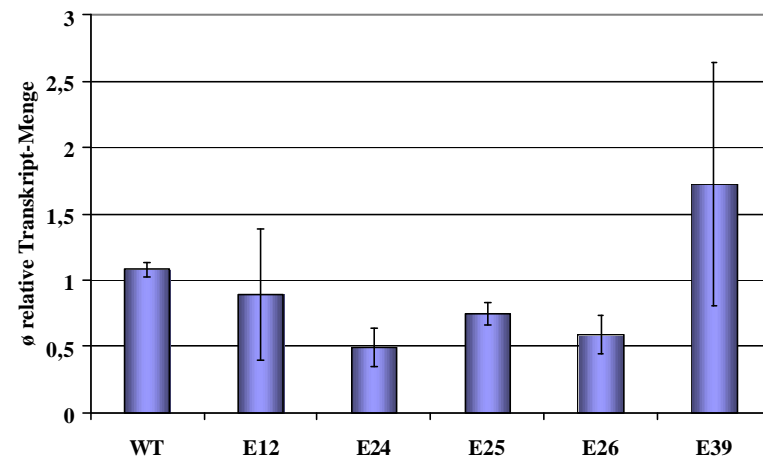
a) *Bgh*-Myzel 13 Stunden  
nach Inokulation geerntet  
drei biologische Replikate



b) *Bgh*-Myzel drei Tage  
nach Inokulation geerntet  
drei biologische Replikate



c) *Bgh*-Myzel acht Tage  
nach Inokulation geerntet  
zwei biologische Replikate



**Abb. 3.29: Real time-PCR-Daten zur Expression von HIGS 47 in *Bgh*, welcher auf Gerstenpflanzen gewachsen war, die ein RNAi-Konstrukt gegen HIGS 47 enthielten**  
Die Expression von HIGS 47 in *Bgh*, welcher auf einer der transgenen Gerstenlinien E12, E24, E25, E26 oder E39 gewachsen war, wurde untersucht. Als Kontrolle wurden die Expression von HIGS 47 in *Bgh* von nicht transformierten ‚Golden Promise‘-Pflanzen (WT) ausgewertet. Alle Daten wurden auf die Expressionsdaten des Monoglyzeridlipase-Gens aus *Bgh* normalisiert.



Weder zum Zeitpunkt 13 Stunden noch zum Zeitpunkt drei Tage nach Inokulation zeigte *Bgh* auf einer der transgenen Linien E12, E24, E25 oder E39 verminderten HIGS 47-Transkriptgehalt im Vergleich zu *Bgh* auf WT-Pflanzen oder auf Pflanzen der nicht-exprimierenden Linie E26.

Die *real time*-PCR-Daten zu Myzel, welches acht Tage nach Inokulation geerntet wurde, sind schwer zu interpretieren (Abb. 3.29c). Eine Reduktion der Transkriptabundanz von HIGS 47 in *Bgh* auf Pflanzen der Linie E26 im Vergleich zu *Bgh* auf WT-Pflanzen um etwa 50% ist zu beobachten. Die Pflanzen der Linie E26 sollten nach PCR-Analysen (Abb. 3.24) und *Northern Blot*-Daten (Abb. 3.26) kein RNAi-Konstrukt tragen und daher dürfte kein Unterschied in der Transkriptabundanz von HIGS 47 in *Bgh* auf WT-Pflanzen und auf Pflanzen der Linie E26 zu messen sein. Die beobachtete fünfzigprozentige Reduktion des HIGS 47-Transkriptgehalts in *Bgh* auf Pflanzen der Linie E24 im Vergleich zu *Bgh* auf WT-Pflanzen ist daher nicht aussagekräftig.

Bei *Bgh* auf Pflanzen der Linie E39 zeigt sich eine leichte Erhöhung des HIGS 47-Transkriptgehalts zum Zeitpunkt drei Tage nach Inokulation. Zum Zeitpunkt acht Tage nach Inokulation liegt der HIGS 47-Transkriptgehalt bei *Bgh* auf Pflanzen der Linie E39 ebenfalls höher als bei *Bgh* auf WT-Pflanzen bzw. Pflanzen der nicht-exprimierenden Linie E26. Hierbei könnte es sich um eine Maßnahme des Pilzes zur Kompensation des RNAi-Effektes handeln.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein neues System vorgestellt mit dem es möglich zu sein scheint die Expression spezifischer Gene in dem obligat biotrophen Pilz *Blumeria graminis* zu hemmen. Das Phänomen wurde HIGS (*Host-induced gene-silencing*) genannt.

### 4.1 HIGS – Eine neue Methode, um Genfunktionen in *B. graminis* zu untersuchen

Bis lang war es nicht möglich, die Funktion einzelner Gene und ihrer Beteiligung an der Wirts-Pathogen-Interaktion in dem obligat biotrophen Pathogen *B. graminis* direkt zu untersuchen (siehe Kapitel 1.4.2.4). Aus diesem Grund blieben molekulare Analysen dieses Pathogens bisher rein deskriptiv und waren auf Analogieschlüsse aus anderen Pathogenuntersuchungen angewiesen (Bindslev et al., 2001). Jetzt besteht die Möglichkeit den Einfluss von Genen aus *B. graminis* durch Unterdrückung der Expression (*Silencing* des Gens) mittels HIGS zu untersuchen. Dazu wird ein RNAi-Konstrukt gegen ein ausgewähltes Gen aus *B. graminis* in der pflanzlichen Wirtszelle exprimiert.

#### 4.1.1 Die Entdeckung von HIGS mittels eines transienten Einzelzell-Assays (TIGS)

In dieser Arbeit sollte das TIGS-System ursprünglich als revers-genetischer Ansatz genutzt werden, um pflanzliche Gene zu finden, die an der anfälligen Interaktion zwischen Mehltau und Getreidepflanze beteiligt sind. Dazu lag bereits eine Anzahl von RNAi-Konstrukten vor (Zierold, 2005), und weitere RNAi-Konstrukte wurden aufgrund von cDNA-Makroarray-Daten erstellt (Zierold et al., 2005). Dieser Makroarray enthielt etwa 90% pflanzliche und etwa 10% pilzliche cDNA-Sequenzen. Daher konnte mit ihm prinzipiell neben der Expression pflanzlicher Gene auch diejenige pilzlicher Gene während der Interaktion von Gerste und Mehltau analysiert werden. Alle Gene, deren Transkription auf dem Makroarray als hochreguliert erschien, wurden als Grundlage für die Erstellung von RNAi-Haarnadel-Konstrukten ausgewählt, unter der vereinfachenden Annahme, dass es sich um pflanzliche Gene handelt.

Während der ersten Experimente wurde entdeckt, dass eines der Konstrukte (in dieser Arbeit als HIGS 47.1 vorgestellt), welches die Anfälligkeit des Gerste-*Bgh*-Systems beeinflusste, gegen ein pilzliches Gen gerichtet war. Nachdem andere RNAi-Konstrukte, die ebenfalls gegen pilzliche Gene gerichtet waren, auch einen Effekt auf die Anfälligkeit hatten, wurden die Konstrukte gegen pflanzlichen Gene aus den Experimenten ausgeschlossen und RNAi gegen pilzliche Gene genauer untersucht.

#### **4.1.1.1 Auswahl der Kandidaten für die TIGS-Experimente**

##### **4.1.1.1.1 Überprüfung der Kandidaten mittels blast-Analyse**

Die verfügbaren RNAi-Konstrukte basierten sowohl auf EST-Sequenzen aus der Gerste als auch aus *B. graminis*. Für die geplanten TIGS-Experimente wurden nur die RNAi-Konstrukte benötigt, die auf EST-Sequenzen aus *B. graminis* basierten. Diese wurden mittels blast-Analysen aus den verfügbaren 265 Kandidaten-Sequenzen herausgefiltert.

Die Kriterien wurden so gewählt, dass alle EST-Sequenzen pflanzlichen Ursprungs mit hoher Wahrscheinlichkeit eliminiert werden konnten. Ein Kandidat wurde aussortiert, wenn bei den megablast-Analysen eine Sequenz mit einem e-Wert kleiner als  $1 \times 10^{-20}$  in einer EST-Datenbank aus pflanzlichem Gewebe, welches nicht mit einem Pilz infiziert worden war, gefunden wurde. Alle anderen blast-Resultate wurden dann nicht mehr berücksichtigt. Es wurde z.B. ein Kandidat (CD056916, HO13K06) aussortiert, welcher mit einem e-Wert von  $1 \times 10^{-145}$  hohe Homologie zu einer EST-Sequenz von *Mycosphaerella graminicola* aufwies. Dieser Kandidat zeigte außerdem sehr hohe Homologie zu einer EST-Sequenz aus Gerste (e-Wert = 0) (Tab 6.1). Ein RNAi-Konstrukt gegen diese EST-Sequenz könnte durchaus ein pilzliches Gen ausschalten, würde aber bestimmt auch das pflanzliche Gen beeinflussen. Deshalb war dieser Kandidat für die hier durchgeführten Experimente nicht geeignet.

Kandidaten, bei denen sich unter den drei megablast-Resultaten mit den niedrigsten e-Werten keine Sequenz aus einer EST-Datenbank aus rein pflanzlichem Gewebe befand aber eine Sequenz pilzlichen Ursprungs mit einem e-Wert kleiner gleich  $1 \times 10^{-50}$ , wurden für die TIGS-Experimente verwendet. So wurden in der NCBI-Datenbank für den Kandidaten mit der *Accession*-Nummer CD054762 (HO07E08) zwei homologe Sequenzen gefunden. Das megablast-Resultat mit dem niedrigsten e-Wert war eine EST-Sequenz aus pilzinfiziertem Gerstengewebe. Aufgrund dieses Resultats war noch keine Zuordnung möglich. Das zweite

Resultat mit einem e-Wert von  $1 \times 10^{-151}$  war eine Sequenz aus *B. graminis* (Tab. 6.1). Es gab keine Homologie zu einer Sequenz aus EST-Datenbanken aus rein pflanzlichem Gewebe. Daher wurde der Kandidat in die Liste der Kandidaten für die RNAi-Experimente gegen pilzliche Gene aufgenommen.

Insgesamt konnten 50 Kandidaten durch blast-Analysen dem pilzlichen Transkriptom zugeordnet werden. Die Herkunft von fünf Kandidaten-Sequenzen konnte vorerst nicht geklärt werden. Diese Kandidaten wurden zunächst in das Kandidaten-Set aufgenommen (Tab. 3.2).

#### **4.1.1.1.2 Einordnung der Kandidaten aufgrund ihres Codon-Gebrauches**

Für jede Art lässt sich eine Tendenz im Gebrauch bestimmter Codons erkennen. Eng verwandte Arten zeigen eine ähnliche Tendenz beim Gebrauch bestimmter Codons, während sich Gene entfernt verwandte Arten durch ihren bevorzugten Codon-Gebrauch unterscheiden (Bennetzen & Hall, 1982; Sharp et al., 1988; Kawabe & Miyashita, 2003).

Friedel et al. (2005) haben eine Software entwickelt, mit der Sequenzen auf ihren bevorzugten Codon-Gebrauch untersucht werden können. Dadurch ist man unabhängig von Sequenz-Vergleichen und umgeht das Problem, dass viele Gene in den Datenbanken noch nicht vorhanden sind. Da von beiden Organismen, mit denen hier gearbeitet wurde, das vollständig sequenzierte Genom nicht verfügbar war, stellte dies ein Problem bei den blast-Analysen dar.

Die Eclat-Software wurde speziell entwickelt um EST-Banken, die Sequenzen aus Gerste und *Bgh* enthalten, zu bearbeiten und die Sequenzen nach ihrer Herkunft aus einem der beiden Organismen zu unterscheiden. Alle 55 Kandidaten-Sequenzen (Tab. 3.2) wurden mit der Eclat-Software nochmals auf ihren Ursprung untersucht (Friedel et al., 2005). Die Zuverlässigkeit dieser Software ist abhängig von der Länge und der Qualität der Sequenzen und wird mit etwa 82% angegeben. Dennoch wurden alle als ‚Gerste‘ klassifizierten Sequenzen aussortiert um sicher zu stellen, dass alle Sequenzen pflanzlichen Ursprungs aus dem Kandidaten-Set eliminiert wurden. So wurde der Kandidat mit der *Accession*-Nummer CD053651 aussortiert, da die Eclat-Software ihn aufgrund des Codon-Gebrauchs als Gerstengen identifiziert hatte (Tab. 3.2). Bei den megablast-Analysen zeigte dieser Kandidat mit  $2 \times 10^{-175}$  hohe Homologie zu einer cDNA-Sequenz aus *Bgh* (Tab. 6.1). Es besteht trotzdem die Möglichkeit, dass es sich hier um ein Gerstengen handelt. Eine hohe

Homologie zu einem *Bgh*-Gen würde auftreten, wenn es ein stark konserviertes Gen ist. Das entsprechende Gerstengen wurde bei den blast-Analysen vielleicht nur aus dem Grund nicht gefunden, weil es noch nicht sequenziert wurde und daher in keiner EST-Datenbank vorliegt.

Andere Kandidaten wie CD053363 (HIGS 1) wurden aufgrund des Ergebnis der Eclat-Software in die TIGS-Experimente aufgenommen, obwohl die blast-Analysen weder signifikante Resultate in der Gerste noch in *Bgh* fanden.

Schließlich wurden 47 Kandidaten für die TIGS-Experimente ausgewählt (Tab. 3.2). Es ist immer noch möglich, dass sich unter diesen 47 Kandidaten RNAi-Konstrukte befinden, die ebenfalls gegen pflanzliche Gene gerichtet sind. Alle Kandidaten, die in den TIGS-Experimenten eine statistisch signifikante Veränderung der Anfälligkeit in Relation zur Kontrolle mit dem leeren RNAi-Vektor zeigten, wurden deshalb noch mittels PCR auf ihre Herkunft getestet (siehe Kapitel 4.1.1.4). Kandidaten, welche keine statisch signifikante Veränderung bewirkten, werden in dieser Arbeit nicht weiter diskutiert und wurden daher auch nicht nochmals genauer auf ihren Ursprung untersucht.

#### **4.1.1.2 Test der Kandidaten mittels TIGS im Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘**

##### **4.1.1.2.1 Primärscreening**

Die primären Experimente mit den HIGS-Kandidaten wurden im TIGS-System mit Gerstenblättern (Kultivar ‚Golden Promise‘) durchgeführt, welche mit *Bgh* inokuliert wurden.

Zunächst wurde jedes RNAi-Konstrukt nur einmal getestet und aufgrund der beobachteten Effekte eine Vorauswahl der Kandidaten getroffen. Danach scheint RNAi *in planta* gegen Gene aus *B. graminis* eher die Anfälligkeit zu reduzieren (14,9% der Konstrukte, Tab. 3.3) als sie zu erhöhen (8,5%, Tab. 3.5). Die Mehrzahl der Konstrukte (76,6%, Tab. 3.4) hatte allerdings gemäß der Auswahlkriterien keine Auswirkungen auf die Anfälligkeit.

Die Kandidaten, welche die Anfälligkeit verringern, waren von besonderem Interesse. Deshalb wurden für diese Kandidaten weitere Experimente durchgeführt, um mindestens fünf Datenpunkte zu erhalten mit denen sich statistische Analysen durchführen ließen. Aus der Gruppe der Konstrukte, welche keinen Einfluss auf die Anfälligkeit hatten, wurden

willkürlich einige Kandidaten ausgewählt, um die Zuverlässigkeit dieses Auswahlsystems zu überprüfen. Aus der Gruppe der Konstrukte, welche die Anfälligkeit erhöhten wurde nur ein Kandidat genauer untersucht. Diese Gruppe wird in diesem Kapitel nicht diskutiert, da sie nicht genug Daten enthält, um aussagekräftig zu sein.

Die Ergebnisse in den Tabellen 3.3 bis 3.6 zeigen, dass es durchaus möglich ist, aus dem Resultat des ersten Experiments Rückschlüsse auf die Wirkung eines RNAi-Konstruktes zu ziehen. Für beinahe dreiviertel (71,4%) aller RNAi-Konstrukte, die im ersten Experiment die Anfälligkeit reduzierten, konnte dieses Ergebnis nach mehreren Experimenten signifikant bestätigt werden. In der zweiten Gruppe sind die Verhältnisse ähnlich. Etwa zweidrittel (61,5%) der wiederholt getesteten RNAi-Konstrukte hatte keinen signifikanten Effekt auf die Anfälligkeit des Gersten-*Bgh*-Systems und bestätigt damit das Ergebnis des ersten Experiments. Etwa ein Drittel (38,5%) der RNAi-Konstrukte der zweiten Gruppe reduzierte allerdings die Anfälligkeit über mehrere Experimente gemittelt signifikant.

Somit erweist sich die Auswahl der Kandidaten nach dem *Primärscreening* als sinnvoll, wenn man eine größere Anzahl von Konstrukten testen möchte. Man sollte aber bedenken, dass sich einviertel bis ein Drittel der Kandidaten über mehrere Experimente anders verhalten können als im ersten Experiment. Es besteht also das Risiko von falsch negativen Ergebnissen, wenn man sich nur nach dem Ergebnis des ersten Experiments richtet.

#### 4.1.1.2 Endergebnisse des TIGS

Von 47 RNAi-Konstrukten gegen Gene aus *B. graminis* liegen für 21 Daten aus jeweils mindestens fünf unabhängigen Experimenten vor (Tab. 3.6). Davon haben etwa 50% (11 Konstrukte, Abb. 3.2) die Anfälligkeit des Gersten-*Bgh*-Systems statistisch signifikant beeinflusst.

Nur eines der Konstrukte (HIGS 6.1, Abb. 3.2) bewirkte eine signifikante Erhöhung des relativen HI. HIGS 6.1 erhöhte die Anfälligkeit um den Faktor 1,75. Dies war der stärkste Effekt, der in diesen Experimenten gemessen wurde. Die anderen 10 Konstrukte bewirkten alle eine Reduktion der Anfälligkeit. Im Mittel sank sie um den Faktor 1,44. Die stärkste Reduktion der Anfälligkeit wurde durch HIGS 35.1 verursacht, wo sie um den Faktor 1,69 auf 59,1% absank.

Keines der getesteten RNAi-Konstrukte bewirkte eine völlige Resistenz des Gersten-*Bgh*-Systems. Ob dies an einer partiellen Effizienz des HIGS-Systems liegt oder an einer

suboptimalen Auswahl an Genen als Ziele der RNAi-Konstrukte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Die einzelnen Kandidaten werden in Kapitel 4.2 ausführlicher diskutiert.

#### 4.1.1.3 *Off target*-Effekte gegen pflanzliche Gene

Es wurden verschiedene Experimente durchgeführt um zu testen, ob es sich bei den beobachteten Effekten um Resultate handelt, die auf unbeabsichtigtem *Silencing* von pflanzlichen Genen beruhen (*off target*-Effekt, Xu et al., 2006). Es wurden verschiedene RNAi-Konstrukte gegen ein Gen erstellt und überprüft, ob sie vergleichbare Effekte bewirkten. Außerdem wurde HIGS in einem weiteren Gerstenkultivar und im Weizen-*Bgt*-System getestet. Schließlich wurde noch eine Software zur Detektion von *off target*-Zielen genutzt.

Zwei der Kandidaten, welche die Anfälligkeit signifikant reduziert hatten, wurden mit weiteren Konstrukten genauer untersucht. Die Konstrukte wurden gegen unterschiedliche Regionen des jeweiligen Gens gerichtet. Sowohl für den Kandidaten HIGS 25 als auch für den Kandidaten HIGS 47 konnte mit vier bzw. drei unterschiedlichen Konstrukten immer eine Reduktion der Anfälligkeit herbeigeführt werden (Abb. 3.3 bis 3.6). Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass es sich bei den durch diese Konstrukte verursachten Effekten nicht um *off target*-Effekte gehandelt hat. Bei zwei Konstrukten war die herbeigeführte Reduktion der Anfälligkeit allerdings statistisch nicht signifikant. Ob die Gründe dafür an unterschiedlicher Qualität des pflanzlichen Versuchsmaterials oder an Konstrukten, die relativ ineffizient und z.B. gegen mRNA-Bereiche mit starken Sekundärstrukturen gerichtet waren, konnte hier nicht geklärt werden.

Um zu testen, ob HIGS-Effekte unabhängig vom pflanzlichen Genotyp auftreten, wurden ein paar ausgewählte Konstrukte anschließend im Gerstenkultivar ‚Pallas‘ und im Weizenkultivar ‚Kanzler‘ getestet.

Für die Experimente in ‚Pallas‘ wurden drei Konstrukte ausgewählt, welche in den Experimenten in ‚Golden Promise‘ die Anfälligkeit signifikant reduziert hatten und spezifisch gegen *Bgh*-Gene gerichtet waren (Abb. 3.7). Alle drei Konstrukte reduzierten die Anfälligkeit des Gersten-*Bgh*-Systems über sechs Experimente betrachtet, aber nur bei

einem Konstrukt (HIGS 47.1) war dieser Effekt auch im zweiseitigen t-Test statistisch signifikant. Der erzielte Effekt dieses Konstruktes war mit einem relativen HI von 47,7 % allerdings fast doppelt so stark wie der beobachtete Effekt im Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘ (rHI = 74,9%). Die Effekte, die durch die beiden anderen Konstrukte verursacht wurden, entsprachen den Ergebnissen der Experimente in ‚Golden Promise‘, abgesehen davon, dass sie statistisch nicht signifikant waren. Die Resultate deuten also darauf hin, dass HIGS-Effekte nicht ausschließlich auf die Gerstensorte ‚Golden Promise‘ beschränkt ist.

Die TIGS-Experimente im Weizenkultivar ‚Kanzler‘ wurden mit fünf Konstrukten, welche bereits in den Gersten-TIGS-Experimenten verwendet worden waren und gegen *Bgt*-Gene gerichtet waren, durchgeführt. Gegen das *Bgh*-Gen HIGS 47 wurde ein neues Konstrukt angefertigt, welches auf der *Bgt*-Sequenz basierte (HIGS 47.5).

Die TIGS-Experimente in Weizen gestalteten sich als schwierig. Die Blätter waren trotz der Expression des *HvMlo*-Gens in der Regel sehr resistent, was die Auswertung erschwerte. Allerdings zeigten vier von sechs Konstrukten die Tendenz, die Anfälligkeit des Weizen-*Bgt* Systems zu reduzieren, wobei dieser Effekt bei einem Konstrukt statistisch signifikant war (Abb. 3.8). Diese Resultate deuten darauf hin, dass HIGS-Effekte auch im Weizen-*Bgt*-System beobachtet werden können. Um zu zeigen, dass HIGS ein universelles Instrument ist, um die Expression von Genen des Pathogens durch RNAi *in planta* zu unterdrücken, sind Experimente mit Weizen und *Bgt* von Bedeutung. Daher wurde HIGS in der Weizen-*Bgt*-Interaktion mittels VIGS weiter untersucht (siehe Kapitel 4.1.2) und die TIGS-Experimente in Weizen aufgegeben.

Eine öffentlich verfügbare Software wurde angewandt, um die Möglichkeit von *off target*-Effekten in der Pflanze zu überprüfen. Das Programm (siRNA-Scan, Xu et al., 2006) zerlegt die Sequenz eines RNAi-Konstruktes in 21 Nukleotide lange Stücke und vergleicht diese unter Verwendung von spezifischen Kriterien mit einem ausgewählten Genom.

Für das Konstrukt HIGS 6.1 wurden mit Hilfe dieses Programms neben Zielsequenzen aus EST-Banken von inokuliertem Material auch Zielsequenzen in EST-Banken aus Wurzel- bzw. Blattmaterial gefunden, welches nicht mit einem Pilz infiziert worden war (Tab. 3.7). Natürlich ist es möglich, dass beide EST-Banken durch Pilzsequenzen kontaminiert waren. Es wurden Übereinstimmungen zwischen der Sequenz von HIGS 6.1 und einigen Genen aus *Oryza sativa* gefunden, die ausreichend wären, um *Silencing* auszulösen. Andererseits wurden allerdings keine Homologien zu Gersten-Sequenzen gefunden. Dies könnte daran liegen,



dass die entsprechenden Gerstengene noch nicht sequenziert worden sind. Obwohl das Konstrukt HIGS 6.1 auf einer Sequenz aus *B. graminis* beruht, konnte hier nicht ausgeschlossen werden, dass mit diesem Konstrukt neben dem Zielgen aus *B. graminis* auch ein Gerstengen *silenced* wurde. Daher wurde dieser Kandidat von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Die weiteren Ergebnisse, welche mit dem siRNA-Scan erzielt worden waren, sprachen gegen *off target*-Effekte. Für alle Konstrukte außer HIGS 6.1 wurden nur Homologien zu EST-Sequenzen aus pilzinfiziertem Pflanzenmaterial gefunden (Tab. 3.7). Allerdings stammt die Version des Genindex der Gerste, welcher von diesem Programm verwendet wird, von 2004. Viele Gerstensequenzen werden daher bei der Suche nach Homologien zum Gerstentranskriptom nicht berücksichtigt. Die Möglichkeit, dass mit den verwendeten Konstrukten Gerstengene ausgeschaltet werden, ist daher aufgrund der Ergebnisse des siRNA-Scans unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen.

#### 4.1.1.4 Erneutes Überprüfen der Kandidaten auf ihren Ursprung

Um sicher zu stellen, dass die 11 Konstrukte aus den TIGS-Experimenten, welche signifikante Effekte verursacht hatten, wirklich gegen Gene aus *B. graminis* und nicht gegen Gerstengene gerichtet waren, wurden mehrere Tests durchgeführt.

Zum einen wurden weitere blastN-Analysen durchgeführt, um sicherzustellen, dass die RNAi-Konstrukte auf Sequenzen aus *B. graminis* basierten. Diesmal wurde nicht gegen eine öffentliche Datenbank wie zu Beginn dieser Arbeit, sondern gegen die noch nicht veröffentlichte Genomsequenz von *Bgh* geblastet. Aufgrund der sehr niedrigen e-Werte, die alle unter dem festgesetzten Schwellenwert von  $1 \times 10^{-50}$  lagen, konnten alle Kandidaten dem Genom von *B. graminis* zugeordnet werden (Tab. 3.8).

Als weitere Methode zur Überprüfung des Ursprungs der Kandidatensequenzen wurden PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Primerkombinationen durchgeführt. Es wurde DNA pflanzlicher und pilzlicher Herkunft als *Template* für die PCR-Reaktionen verwendet. Da es sich bei allen Kandidatengenen um Gene pilzlichen Ursprungs handeln sollte, wurden mit *Bgh*- und *Bgt*-DNA die meisten PCR-Produkte erwartet. Über die Anzahl der positiven PCR-Reaktionen ließ sich teilweise eine Aussage über die Zugehörigkeit der EST-Sequenz zu der entsprechenden *forma specialis* von *B. graminis* treffen (Tab. 3.9).

Bei dem Kandidaten HIGS 2 zeigten mit *Bgh*- und mit *Bgt*-DNA fast alle PCR-Reaktionen das erwartete Produkt. Es handelt sich definitiv um ein *B. graminis*-Gen. Mit vier Primerkombinationen wurden PCR-Produkte aus Gersten-DNA amplifiziert (Abb. 3.9). Die Produkte haben zwar nicht die erwartete Größe, aber das PCR-Ergebnis zeigt, dass auf kurzen Abschnitten Sequenz-Ähnlichkeit zwischen dem *B. graminis*-Gen und einem Gerstengen besteht. Wenn die verwendeten Primer an Gersten-DNA binden können, besteht auch die Möglichkeit, dass eine siRNA mit gleicher Sequenz an das entsprechende Gersten-Transkript binden könnte, woraufhin die mRNA abgebaut werden würde (*Cross Silencing*). Der hier gewählte Versuchsaufbau ist allerdings nur ein Indiz für *Cross Silencing*. Es ist nicht möglich zu sagen, ob die Homologie zwischen dem Gerstengen und dem RNAi-Konstrukt hoch genug ist, um wirklich *Cross Silencing* auszulösen.

Bei den Kandidaten HIGS 9 (Abb. 3.10), HIGS 13 (Abb. 3.11), HIGS 20 (Abb. 3.12), HIGS 25 (Abb. 3.13), HIGS 35 (Abb. 3.16), HIGS 36 (Abb. 3.17) und HIGS 47 (Abb. 3.18) waren keine PCR-Produkte mit Gersten- oder Weizen-DNA amplifiziert worden. Es gibt also keine zusätzlichen Hinweise auf *Cross Silencing* von pflanzlichen Genen. Für alle diese Kandidaten konnten mit der Mehrzahl der Primerkombinationen PCR-Produkte mit DNA von wenigstens einer *forma specialis* von *B. graminis* amplifiziert werden, was einen klaren experimentellen Hinweis auf deren pilzlichen Ursprung lieferte.

Für die Kandidaten HIGS 31 und HIGS 32 ließen sich schwache PCR-Produkte aus Gersten-DNA amplifizieren (Abb. 3.14 bzw. 3.15). Bei den multiplen Banden mit sehr geringer Intensität scheint es sich aber um unspezifische Produkte zu handeln. Daher lieferten diese PCR-Ergebnisse keinen Hinweis auf *Cross Silencing* von Gerstengenen.

#### **4.1.1.5 Zuordnung der Kandidatengene zum Transkriptom von *Bgh* bzw. *Bgt***

Anhand von blastN-Resultaten gegen das *Bgh*-Genom und *Bgh*-EST-Sequenzen in der Cogeme-Datenbank, kombiniert mit den Ergebnissen der PCR-Analysen, wurden die Kandidaten einer *forma specialis* von *B. graminis* zugeordnet (Tab. 3.9).

Die Schlussfolgerungen, welche aus den blast-Analysen gezogen wurden, stimmten in allen Fällen mit den Schlussfolgerungen, welche aus den PCR-Resultaten gezogen wurden überein. Von den Konstrukten, welche eine statistisch signifikante Reduktion des relativen HI im Gersten-*Bgh*-System verursacht hatten, scheinen 60% auf einem *Bgt*-Gen und 40% auf einem *Bgh*-Gen zu basieren. Es scheint keinen Unterschied zu machen, gegen welche *forma specialis* das Konstrukt gerichtet ist. Allerdings ist diese Aussage aufgrund des

geringen Probenumfangs von 10 Kandidaten spekulativ. Andererseits war dieses Ergebnis zu erwarten, da bei RNAi eine Identität zwischen Zielgen und RNAi-Konstrukt von 88%, gemittelt über 41 Basen, ausreicht (Parrish et al., 2000), um *Silencing* zu verursachen. Dieser empirische Grenzwert wurde nur in einem Fall (HIGS 35, Tab. 3.9) um 1% unterschritten, was darauf hindeutet, dass die kodierenden Genombereiche von *Bgh* und *Bgt* sich sehr ähnlich sind.

#### 4.1.2 Bestätigung von HIGS in der Weizen-*Bgt*-Interaktion

Die Resultate der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass bei HIGS das RNAi-Konstrukt im pflanzlichen Wirt exprimiert wird, das *Silencing* des Zielgens aber im pilzlichen Pathogen stattfindet und die beobachtete Reduktion der Anfälligkeit nicht auf *Cross Silencing* von Wirtsgenen beruht. Um diese Hypothese zu unterstützen ist es wichtig zu zeigen, dass HIGS nicht nur in der Gersten-*Bgh*-Interaktion wirksam ist. Bei den TIGS-Experimenten war dies aufgrund von experimentellen Schwierigkeiten nicht möglich (siehe Kapitel 4.1.1.3). Daher wurde HIGS in der Weizen-*Bgt*-Interaktion mittels *Virus-induced gene-silencing* (VIGS) untersucht.

Mit dem *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) wurden *Antisense*-Konstrukte in Weizenpflanzen eingebracht. Haarnadel-Konstrukte scheinen zwar etwas effizienter *Silencing* auszulösen (Lacomme et al., 2003), allerdings ist ihre Herstellung sehr zeitaufwendig. Daher wurden hier *Antisense*-Konstrukte verwendet.

Es wurden drei Kandidaten ausgewählt: HIGS 25, HIGS 35 und HIGS 47. HIGS 25 und HIGS 47 sind zwei unterschiedliche Gene, die beide für eine  $\beta$ -1,3-Glukanosyltransferase kodieren (siehe Kapitel 4.2). Sie wurden bereits im TIGS-System eingehend untersucht (siehe Kapitel 4.1.1.3) und sind von besonderem Interesse, da sie für pilzspezifische Enzyme kodieren, d.h. es sind keine  $\beta$ -1,3-Glukanosyltransferasen aus Pflanzen bekannt.

HIGS 35 kodiert für eine Serin-Protease. Bei den TIGS-Experimenten im Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘ verursachte das Konstrukt HIGS 35.1 im Mittel die stärkste Reduktion der Anfälligkeit mit hoher statistischer Signifikanz (Tab. 3.6: rHI = 59,1, p = 0,002).

Bei den VIGS-Experimenten zeigte sich, dass die drei ausgewählten Kandidaten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung von *Bgt* eine Rolle zu spielen scheinen. *Antisense*-Konstrukte gegen die Kandidaten HIGS 25 und HIGS 35 hatten keine

Auswirkung auf die Ausbildung von Haustorien (Abb. 3.20). Allerdings beeinflussten sie das Wachstum der ESH (Abb. 3.21). Diese beiden Gene scheinen eine Rolle in der späteren Entwicklung des Pilzes zu spielen und nicht für die Ausbildung des Haustoriums verantwortlich zu sein.

Das *Antisense*-Konstrukt gegen den Kandidaten HIGS 47 beeinflusste die Haustorienbildung (Abb. 3.20), wohingegen die Länge der ESH nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.21). HIGS 47 scheint ein Gen zu sein, welches in der frühen Etablierung der Pathogen-Wirts-Beziehung eine wichtige Rolle spielt.

Bruun-Rasmussen et al. (2007) haben nachgewiesen, dass ins BSMV-Genom integrierte Konstrukte mit einer Länge ab etwa 130 Nukleotiden instabil werden. Die in dieser Arbeit verwendeten *Antisense*-Konstrukte hatten eine Länge von 468 Nukleotiden (pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS 25as), 509 Nukleotiden (pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS 35as) bzw. 775 Nukleotiden (pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS 47as) und gelten gemäß den Resultaten von Bruun-Rasmussen et al. als potentiell instabil. Möglicherweise sind die eher geringen Effekte, die bei der Mikroskopie beobachtet wurden, auf die Instabilität der Konstrukte zurückzuführen. Untersuchungen zeigten allerdings, dass die Stabilität eines BSMV-Konstruktes nicht nur von der Länge sondern auch von der Umgebungstemperatur (Bruun-Rasmussen et al., 2007) und der Sequenz (Zhong et al., 2005) abhängt. Hier wurde nicht untersucht, ob die *Antisense*-Konstrukte in allen für die Mikroskopie verwendeten Blättern intakt waren, da dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich war.

Bei den VIGS-Experimenten konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass das Virus den RNAi-Effekt im Pilz direkt verursacht. Aus *Bgt*, welcher auf BSMV-infizierten Pflanzen gewachsen war, wurde RNA isoliert. Dabei wurde in allen Proben Transkript des  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Genoms von BSMV nachgewiesen (Abb. 3.22). Da keine pflanzlichen Transkripte aus diesen Proben amplifiziert werden konnten, ist es unwahrscheinlich, dass es sich um eine Kontamination der Proben mit pflanzlichem Gewebe, welches das Virus enthielt, handelte.

Dies bedeutet, dass der HIGS-Effekt, welcher bei *Bgt* auf BSMV-infizierten Pflanzen beobachtet wurde, durchaus auf Virus-Partikel zurückzuführen sein kann, welche vom Pilz aufgenommen wurden. Der RNAi-Effekt könnte somit unabhängig von der RNAi-Maschinerie des pflanzlichen Wirts sein und über die RNAi-Maschinerie im Pilz ablaufen.

In den vorliegenden Experimenten ist allerdings nicht nachgewiesen worden, dass das vollständige funktionsfähige Virus im Pilz vorhanden war. Die PCR-Resultate zeigen aber, dass offenbar größere (virale) RNA-Fragmente aus der Pflanzenzelle in den Pilz gelangen können. Die amplifizierte PCR-Produkte hatten eine Größe von 480 bp (BSMV-a) bzw. 510 bp (BSMV-β).

#### **4.1.3 HIGS basiert nicht auf DNA-Übertragung zwischen Wirt und Pathogen**

Um der Frage nachzugehen, ob der beobachtete HIGS-Effekt auf die Aufnahme von RNA oder im Fall der TIGS-Experimente von Plasmid-DNA oder im Fall der VIGS-Experimente von Viruspartikel zurückzuführen ist, wurde eine weitere Methode RNAi in einer Pflanze auszulösen genutzt: Es wurden transgene Pflanzen erstellt, welche ein RNAi-Konstrukt gegen ein pilzliches Gen trugen. Zu diesem Zweck wurde wiederum HIGS 47 als Zielgen ausgewählt. In transgenen Pflanzen ist das RNAi-Konstrukt fest in das pflanzliche Genom integriert. Ein RNAi-Effekt, der hier beobachtet wird, kann nicht auf die Aufnahme von Plasmid-DNA durch den Pilz zurückzuführen sein.

Mittels PCR-Reaktionen (Abb. 3.24 und 3.25) und *Northern Blot*-Analysen (Abb. 3.26) wurden drei Gerstenlinien (E12, E25 und E39) identifiziert, welche das Resistenzgen Hygromycin-Phosphotransferase  $Hpt^r$  und beide Wiederholungssequenzen des Haarnadel-Konstrukts trugen, und welche das RNAi-Konstrukt auch exprimierten. Die Linie E24 wurde zwar mittels PCR negativ auf das  $Hpt^r$ -Gen getestet, allerdings konnten die Wiederholungssequenzen der RNAi-Kassette und die Expression des Transgens nachgewiesen werden. Daher wurde E24 ebenfalls als transgene Linie behandelt.

Die Linie E26 wurde positiv für das Resistenzgen  $Hpt^r$  getestet (Abb. 3.25), aber keine der beiden Wiederholungssequenzen des Haarnadel-Konstrukts konnte nachgewiesen werden (Abb. 3.24). Bei wiederholten *Northern Blot*-Analysen wurde ferner keine Expression des Konstruktes pIPKb007\_HIGS 47.2 detektiert (Abb. 3.26). Die Linie E26 enthält somit wahrscheinlich keine vollständige RNAi-Kassette. Aus diesem Grund wurden Pflanzen der Linie E26 in den folgenden Experimenten neben den nicht transformierten ‚Golden Promise‘-Pflanzen (Wildtyp) als Kontrollen eingesetzt.

Die Anfälligkeit gegen *Bgh* wurde an den transgenen Pflanzen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch bestimmt. Bei den makroskopischen Analysen wurde mittels eines

Vier-Klassen-Boniturschemas die mittlere infizierte Blattoberfläche (miB) bestimmt (Schweizer et al., 1995). Pflanzen der nicht exprimierende Linie E26 und des Wildtyp unterschieden sich kaum in ihrer Anfälligkeit. Pflanzen der transgenen Linien E12, E24 und E39 zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen eine signifikant reduzierte Anfälligkeit gegenüber *Bgh*. Die Anfälligkeit wurde in allen Fällen um etwa 20% reduziert. Pflanzen der Linie E25 reduzierten die miB sogar um 30%, wobei dieser Effekt allerdings statistisch nicht signifikant war (Abb. 3.27).

Für die Pflanzen der Linien E24 und E39 bestätigten die Mikroskopie-Daten (Abb. 3.28) das Ergebnis der Bonitur. Die Pflanzen der Linie E12 zeigten zum Zeitpunkt der Mikroskopie (48 Stunden nach Inokulation) noch keine erhöhte Resistenz (Abb. 3.28), sondern erst sieben Tage nach Inokulation bei der Bonitur (Abb. 3.27). Die *Northern Blot*-Ergebnisse deuteten daraufhin, dass Pflanzen der Linie E12 das Transgen deutlich schwächer exprimieren als Pflanzen der Linie E39 und auch etwas schwächer als Pflanzen der Linie E24 (Abb. 3.26). Bei der Mikroskopie 48 Stunden nach Inokulation war eventuell noch nicht genug siRNA oder dsRNA in den Pilz übergegangen, um RNAi effektiv auszulösen. In *Caenorhabditis elegans* wurde gezeigt, dass zwar schon wenige Moleküle dsRNA genügen um *Silencing* auszulösen, aber der beobachtete Effekt ist dann nicht sehr ausgeprägt (Fire et al., 1998). Möglicherweise war der HIGS-Effekt auf Pflanzen der Linie E12 48 Stunden nach Inokulation noch so gering, dass er nicht detektierbar war.

#### 4.1.4 Versuchter Nachweis einer veränderten Transkriptabundanz im Pilz

Bei RNAi im Pilz sollte sich ein reduzierter Transkriptgehalt des Zielgens nachweisen lassen. Dies wurde sowohl mit *Bgt* auf BSMV-infizierten Pflanzen als auch mit *Bgh* auf transgenen Pflanzen versucht.

Es konnte kein Unterschied in der Transkriptabundanz von HIGS 47 in epiphytischen Pilzstrukturen von *Bgt* isoliert von BSMV-infizierten Pflanzen, die entweder den pT7-BSMV- $\gamma$ .MCS-Kontrollstamm, den pT7-BSMV- $\gamma$ .PDSas- oder pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS 47as-Stamm trugen, festgestellt werden (Abb. 3.23). Dies könnte darauf beruhen, dass das Virus sich nicht gleichmäßig in der Pflanze verteilt. Hein et al. (2005) stellten fest, dass die in ihren Experimenten beobachtete Durchbrechung der *Mla*-Resistenz der Gerste gegen *Bgh* nur auf begrenzten Bereichen der Blätter von BSMV-infizierten Pflanzen auftrat. In den hier durchgeführten Experimenten war es schwer festzustellen, ob der beobachtete Phänotyp nur

auf bestimmte Bereiche der Blätter beschränkt blieb, da keine vollständige sondern nur eine leicht erhöhte Resistenz festgestellt wurde. Dies bringt auch das inhärente Problem mit sich, dass bei RNA-Extraktionen aus dem Pilz gegen die Hyphen selektioniert wurde, in denen HIGS wirksam war und die, als Folge, nicht weiterwuchsen oder abstarben. Mit diesem Versuch war es daher nicht möglich, Kenntnisse darüber zu erlangen, ob HIGS wirklich im Pilz gewirkt hat.

Nachdem die Analyse der Transkriptabundanz von HIGS 47 in *Bgt* auf BSMV-infizierten Pflanzen negative Ergebnisse gebracht hatte, wurde diese Analyse mit *Bgh*, welcher auf den HIGS 47-transgenen Pflanzen gewachsen war, erneut durchgeführt. Zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die epiphytischen *Bgh*-Strukturen geerntet und RNA aus ihnen isoliert. Mittels *real time*-PCR wurde der Transkriptgehalt von HIGS 47 untersucht (Abb. 3.29).

Die Transkriptanalysen zeigten keine deutliche Reduktion des HIGS 47-Transkriptgehalts relativ zur Kontrolle (Abb. 3.29). *Bgh* auf Pflanzen der Linie E39 zeigte allerdings einen erhöhten HIGS 47-Transkriptgehalt zu den Zeitpunkten drei und acht Tage nach Inokulation. Eventuell deutet der erhöhte Transkriptgehalt auf eine Reaktion des Pilzes zur Kompensation des RNAi-Effektes hin. Die Pflanzen der Linie E39 exprimieren nach *Northern Blot*-Daten (Abb. 3.26) das RNAi-Konstrukt stärker als die anderen Linien, weshalb man auf diesen Pflanzen einen stärkeren RNAi-Effekt erwarten würde. Die Unterschiede in der Penetrationsrate (Abb. 3.28) bzw. der mittleren infizierten Blattoberfläche (Abb. 3.27) zwischen Pflanzen der Linie E39 und Pflanzen der transgenen Linien E12, E24 und E25 sind allerdings gering. Der erhöhte HIGS 47-Transkriptgehalt deutet daraufhin, dass der Pilz als Reaktion auf den RNAi-Effekt die Transkriptionsrate dieses Gens erhöht hat und deshalb ähnliche Penetrationsraten auf Pflanzen der Linie E39 zeigt wie auf Pflanzen der anderen drei transgenen Linien.

Das Monoglyzeridlipase-Gen, welches zur Normalisierung der Transkriptabundanz verwendet wurde, ist während der Interaktion von *Bgh* mit Wildtyp-Gerste kaum reguliert (Both et al, 2005a). Wir wissen allerdings nicht wie sich das *Silencing* von HIGS 47 auf das gesamte Transkriptom des Pilzes auswirkt und ob andere Gene wie z.B. das der Monoglyzeridlipase beeinflusst werden. Manchmal wird durch das *Silencing* eines Gens eine Kettenreaktion im Organismus ausgelöst, die die Expression anderer Gene beeinflusst. Wie für die VIGS-Experimente bereits diskutiert, könnte auch auf den transgenen Pflanzen eine Selektion gegen die pilzlichen Kolonien stattgefunden haben, in denen HIGS 47 in

seiner Expression unterdrückt war und die in ihrem Wachstum gehemmt und somit in der RNA-Probe unterrepräsentiert waren. Man müsste eventuell einzelne Mehltaukolonien analysieren, bei denen eine Veränderung im Wachstum sichtbar ist. Allerdings dürfte sich die Ernte einer einzelnen Kolonie als äußerst schwierig erweisen.

Dieses Problem zeigte sich möglicherweise ebenfalls in ähnlichen Experimenten, die mit Wurzelgallennematoden durchgeführt worden. Huang et al. (2006) zeigten, dass *Arabidopsis thaliana*, welche RNAi-Konstrukte gegen das Wurzelgallennematoden-Gen 16D10 exprimieren, geschützt sind gegen die Besiedlung durch *Meloidogyne* spp. Es sind aber keine Daten über den Transkript-Gehalt von 16D10 in Nematoden, die auf den transgenen Pflanzen siedelten, gezeigt.

Fairbairn et al. (2007) führten Untersuchungen mit *Nicotiana tabacum*-Pflanzen, welche RNAi-Konstrukte gegen den Transkriptionsfaktor MjTis11 aus *Meloidogyne javanica* exprimierten, durch. Obwohl sie keine Reduktion der Fruchtbarkeit oder der Schlupf-Rate bei den Nematoden beobachten konnten, gelang ihnen der Nachweis, dass die Transkriptabundanz von MjTis11 in Wurzelgallen von transgenen Pflanzen reduziert war.

Die Suche nach einem Konstrukt, welches zwar RNAi in *B. graminis* auslöst, aber keinen letalen Effekt hat, wäre also eine attraktive Möglichkeit RNAi direkt im Pilz nachzuweisen. Gut geeignet wären Konstrukte gegen Gene, die z.B. die Pigmentierung des Pilzes oder die Morphologie der Hyphen beeinflussen. Allerdings sind solche Gene in *B. graminis* noch nicht bekannt.

## 4.2 Die Kandidatengene

In diesem Kapitel werden die Kandidatengene, die den RNAi-Konstrukten mit signifikanten Effekten im Gersten-*Bgh*-Systems zugrunde liegen, diskutiert. Zu Kandidaten, bei denen RNAi keinen Effekt auf die Anfälligkeit des Systems hatte, ist keine Aussage möglich, da es sich möglicherweise um falschnegative Ergebnisse handelt.

### 4.2.1 Kandidaten, welche das Gersten-*Bgh*-Systems signifikant beeinflusst hatten

RNAi gegen 10 unterschiedliche Gene aus *B. graminis* führte zu reduzierter Anfälligkeit. Diese Kandidatengene lassen sich aufgrund ihrer Funktion nicht in eine bestimmte Gruppe einordnen (Tab. 4.1). Es gibt Gene, deren Produkte am Stoffwechsel (HIGS 2 und HIGS 9)

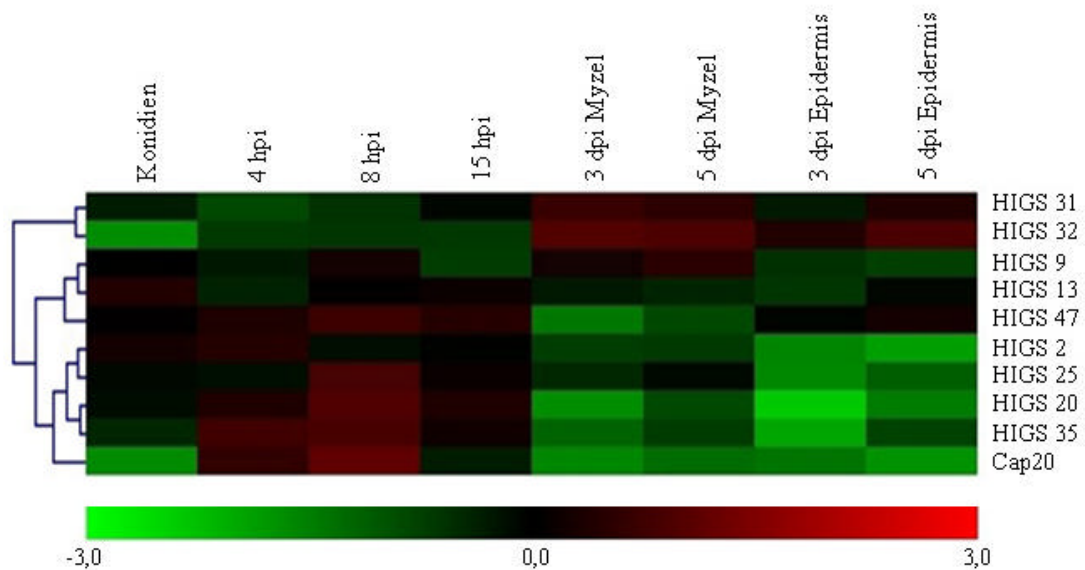


oder am Transport (HIGS 32) beteiligt sind. Diese Gene haben wahrscheinlich keine spezifische Virulenzfunktion in der Wirt-Pathogen-Beziehung, sondern sind an der Aufrechterhaltung der allgemeinen Stoffwechselfunktionen in der Zelle beteiligt. Wenn eines dieser Gene (oder eine ganze Genfamilie) durch RNAi ausgeschaltet wird, stirbt der Pilz ab. Bei der Bewertung dieser RNAi-Experimente darf nicht vergessen werden, dass für keines dieser Konstrukte geklärt ist, ob nur ein Gen oder vielleicht mehrere verwandte Gene z.B. einer Genfamilie ausgeschaltet wurden.

Hingegen könnten die Kandidaten HIGS 25 und HIGS 47, die am Zellwand-Metabolismus beteiligt sind, durchaus spezifisch für die Wirt-Pathogen-Interaktion sein (siehe Kapitel 4.2.2). Ebenso sind Proteasen (HIGS 35) und Peptidasen (HIGS 20) potentielle Pathogenizitätsfaktoren (Bindschedler et al., 2003; Xia et al., 2004). Betrachtet man die Expressionsmuster der Kandidaten (Abb. 4.1) zeigen diese vier Kandidaten ein ähnliches Expressionsmuster wie Cap20, welches aus *Colletotrichum gloeosporioides* als wichtiger Faktor bei der Virulenz bekannt ist (Hwang et al., 1995).

**Tab. 4.1: Funktionen der Genprodukte der Kandidaten**

	Funktion des Genprodukts	Klasse
HIGS 2	Riboflavin-Aldehyde-formendes Enzym	Primär-Metabolismus
HIGS 9	3-oxo-5-a-Steroid 4-Dehydrogenase	Lipid-, Fettsäure- und Isoprenid-Metabolismus
HIGS 13	unbekannt	
HIGS 20	Serin-Carboxypeptidase	Proteinabbau
HIGS 25	$\beta$ -1,3-Glukanosyltransferase	Zellwand-Metabolismus
HIGS 31	Hitzeschock-Protein 70	Stress
HIGS 32	ADP-ATP Translokase	Transport
HIGS 35	Serin-Protease	Proteinabbau
HIGS 36	unbekannt	
HIGS 47	$\beta$ -1,3-Glukanosyltransferase	Zellwand-Metabolismus



**Abb. 4.1: Expressionsmuster der Kandidaten, welche signifikante Veränderung der Anfälligkeit in den TIGS-Experimenten verursacht hatten**

Die Expressionsdaten entstammen Array-Analysen von Both et al. (2005b). Die Daten wurden Median-zentriert und die euklidische Distanz berechnet. Um die Expressionsdaten für die HIGS-Kandidaten zu ermitteln, wurden die Daten von EST-Sequenzen mit hoher Homologie zum Kandidatengen (e-Wert =  $1 \times 10^{-100}$ ) gemittelt (Tab. 6.22).

Einige Kandidaten (HIGS 31 und HIGS 32) zeigen sogar ein gegenläufiges Expressionsprofil und werden erst drei Tage nach Inokulation hochreguliert. Sie haben also wahrscheinlich keine Funktion bei der Etablierung der Wirt-Pathogen-Beziehung.

Es scheint mit HIGS also möglich zu sein sowohl Gene, deren Produkte an allgemeinen Stoffwechsel-Prozessen beteiligt sind zu untersuchen, als auch Gene, deren Produkte für die Wirt-Pathogen-Interaktion wichtig sind.

#### 4.2.2 Die Kandidaten HIGS 25 und HIGS 47

Zwei der Kandidatengene zeigen bei blast-Analysen hohe Homologie zu  $\beta$ -1,3-Glukanosyltransferasen. Dies sind Enzyme, die über Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die äußere Seite der Plasmamembran von Pilzen gebunden sind (Popolo et al., 1993), wo sie am Aufbau der Zellwand beteiligt sind. Die  $\beta$ -1,3-Glukanosyltransferase hydrolysiert  $\beta$ -1,3-Glukan-Moleküle und transferiert das neue reduzierende Ende auf ein nicht-reduzierendes Ende eines anderen  $\beta$ -1,3-Glukan-Moleküls. Dadurch werden  $\beta$ -1,3-Glukan-Seitenketten verlängert (Mouyna et al., 2000).

Caracuel et al. (2005) erzeugten eine Mutante in *Fusarium oxysporum* ( $\Delta$ gas1-Mutante), welcher ein Gen mit starker Ähnlichkeit zu dem Gas1-Gen aus Hefe fehlt, das für eine  $\beta$ -1,3-Glukanosyltransferase kodiert. Die  $\Delta$ gas1-Mutante in *F. oxysporum* zeigte reduziertes Wachstum auf festem Substrat, und außerdem konnte eine stark reduzierte Virulenz auf Wurzeln und Früchten von Tomatenpflanzen nachgewiesen werden.

Während Untersuchungen bei Human-Pathogenen darauf hinweisen, dass die  $\beta$ -1,3-Glukanosyltransferasen selbst als pilzliche Antigene vom Wirt erkannt werden (Delgado et al., 2003; Arroyo et al., 2007), wird bei Phytopathogenen eine andere Hypothese diskutiert. In *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine  $\Delta$ Gas1-Mutante untersucht, welche vermehrt  $\beta$ -1,3-Glukan in das Medium abgibt (Ram et al., 1998). Glukan ist als Elizitor bei Pflanzen-Phytopathogen-Beziehungen bekannt (Hahn, 1996). Dies könnte den Effekt erklären, der in den hier vorgestellten RNAi-Experimenten mit HIGS 47 beobachtet wurde. Möglicherweise gab *B. graminis* nach *Silencing* des HIGS 47-Gens vermehrt Glukan-Moleküle ab und wurde daher leichter von der Wirtszelle erkannt, was zu einer Verminderung der Anfälligkeit führte.

$\beta$ -1,3-Glukanosyltransferasen sind aus vielen Pilzarten bekannt und gehören zur GH72 (*Glycoside hydrolase*)-Familie wie in der CAZY- (*Carbohydrate active enzymes*)-Datenbank (<http://www.cazy.org/>) beschrieben. In *Saccharomyces cerevisiae* hat man bereits fünf Mitglieder gefunden (GAS1 bis GAS5; Ragni et al., 2007), in *Aspergillus fumigatus* kennt man drei Vertreter (GEL1 bis GEL3), und von *Magnaporthe grisea* sind vier Sequenzen in der CAZY-Datenbank verfügbar. In *B. graminis* haben wir zwei  $\beta$ -1,3-Glukanosyltransferasen gefunden. Wir bezeichnen sie als *BgGTF1* (HIGS 47) und *BgGTF2* (HIGS 25). Die Nukleinsäuresequenzen haben nur eine geringe Ähnlichkeit zueinander, und lassen sich nicht *alignen*. Dies bestätigt die Annahme, dass mit den verschiedenen RNAi-Konstrukten immer nur das Zielgen und nicht das andere GTF-Gen *silenced* worden ist. Die bekannten Aminosäuresequenzen zeigen untereinander eine Übereinstimmung von 40% (blastp in NCBI bl2seq; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). Eine ähnlich geringe Übereinstimmung wurde auch für GEL1 und GEL2 in *Aspergillus fumigatus* beschrieben. Ebenso wie bei *BgGTF1* und *BgGTF2* führen die Deletionen von *AfGel1* bzw. *AfGel2* zu unterschiedlichen Phänotypen. So zeigt eine  $\Delta$ gel1-Mutante keinen Wachstums-Phänotyp während eine  $\Delta$ gel2-Mutantion zu reduziertem Wachstum führte (Mouyna et al., 2005). RNAi gegen *BgGTF1* führte zu einer verminderten Penetrationseffizienz, welche eventuell auf die vermehrte Abgabe von Elizitoren zurückzuführen ist. RNAi gegen

*BgGTF2* führte zu einem reduzierten Hyphenwachstum. Scheinbar handelt es sich um zwei Gene einer Familie, die sich aber in ihrer Funktion unterscheiden wie *AfGel1* und *AfGel2*. Interessant wäre die Suche nach weiteren  $\beta$ -1,3-Glukanosyltransferasen in *B. graminis*. Vielleicht würde RNAi *in planta* gegen alle  $\beta$ -1,3-Glukanosyltransferasen sogar zu vollständiger Resistenz führen.

### 4.3 Erkenntnisse über das *Host-induced gene-silencing* (HIGS)

#### 4.3.1 Hypothesen zur Funktionsweise von HIGS

Es konnte eine statistisch signifikante Reduktion der Anfälligkeit in der Gersten-*Bgh*- und der Weizen-*Bgt*-Interaktion erzielt werden indem RNAi-Konstrukte gegen unterschiedliche *B. graminis*-Gene *in planta* exprimiert wurden. Der Wirkungsmechanismus konnte aber bis jetzt nicht im Detail geklärt werden. Im Folgenden werden drei Arbeitshypothesen formuliert.

A) Aufnahme von Plasmid-DNA oder Viruspartikeln durch den Pilz.

Bei der beobachteten Reduktion der Anfälligkeit in den TIGS-Experimenten könnte es sich um einen Artefakt handeln, welcher auf die angewandte Methode zurückzuführen ist. Durch das Beschießen der Getreideblätter mit Goldpartikeln, an deren Oberfläche Plasmid-DNA gebunden ist, gelangt wahrscheinlich auch DNA auf die Blattoberfläche. Dies geschieht z.B. wenn Goldpartikel in der Kutikula stecken bleiben. Außerdem ist es möglich, dass die Goldpartikel DNA abstreifen, wenn sie die Kutikula durchdringen. Diese DNA wäre an der Oberfläche des Blattes für den Pilz verfügbar, nachdem das Konidium dort gelandet ist. Über die Fähigkeit von *B. graminis* Stoffe, speziell DNA, von der Blattoberfläche aufzunehmen ist nicht viel bekannt. Nielsen et al. (2000) haben gezeigt, dass ein Farbstoff in das Konidium eindringen kann, der auf eine künstliche Oberfläche gegeben wurde. Ob hier aktive Aufnahme beteiligt ist, ist nicht geklärt. Der primäre Keimschlauch scheint für Wasseraufnahme aus dem Wirt (Carver & Bushnell, 1983) und Aufnahme von anorganischen Substanzen verantwortlich zu sein (Kunoh et al., 1978; Carver & Ingerson, 1987). Dabei könnte zufällig auch Plasmid-DNA oder Fragmente des Plasmids aufgenommen werden. Ascomyceten sind in der Lage den CaMV 35S-Promotor, welcher der in den TIGS-Experimenten verwendeten RNAi-Kassette vorgeschaltet ist (Abb. 2.1), zu nutzen (Hirt et al., 1990). Enthält das aufgenommene DNA-Fragment eine vollständige

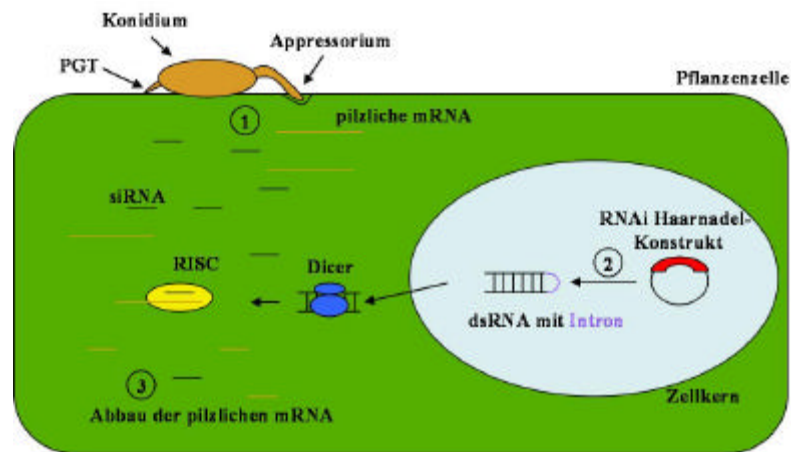
RNAi-Kassette, die exprimiert werden kann, wird die Expression des entsprechenden Gens im Pilz gehemmt. RNA-vermitteltes Gen-*Silencing* in Ascomyceten ist weit verbreitet und für viele Arten beschrieben (Romano & Macino, 1992; Kadotani et al., 2003; Nakayashiki et al., 2005; Henry et al., 2007). Auch im Transkriptom von *B. graminis* wurden Gene gefunden, welche für Komponenten der RNAi-Maschinerie kodieren (Zhang et al., 2005). Der beobachtete Effekt könnte somit auf Gen-*Silencing* beruhen, welches vollständig im Pilz abläuft.

Auch für die VIGS-Experimente ist es denkbar, dass der beobachtete Effekt unabhängig von der RNAi-Maschinerie des Wirtes ist. Mittels PCR konnte BSMV-Transkript im den epiphytisch gewachsenen Pilzstrukturen nachgewiesen werden. Es ist nicht bekannt, ob *B. graminis* im Stande ist ganze BSMV-Partikel aus der Wirtszelle aufzunehmen. Möglicherweise gelangen die einzelnen RNA-Komponenten des Virus auch getrennt voneinander in den Pilz, wo sie trotz der geringen Abundanz, möglicherweise *Silencing* auslösen.

Die HIGS 47-transgenen Pflanzen erbrachten den entscheidenden Hinweis darauf, dass der HIGS-Mechanismus *in planta* transkribierte dsRNA einbezieht. Das RNAi-Konstrukt ist stabil in das Pflanzengenom integriert, und eine DNA-Aufnahme durch den Pilz praktisch ausgeschlossen. Unklar bleibt ob das *Silencing* im Pilz oder in der Wirtszelle stattfindet. Nimmt der Pilz RNA aus der Pflanzenzelle auf und wird dadurch RNAi im Pilz ausgelöst? Oder sekretiert *B. graminis* mRNA in die Pflanzenzelle, um vielleicht die pflanzliche Abwehrreaktion zu unterdrücken oder den pflanzlichen Stoffwechsel zu seinen Gunsten zu beeinflussen? Die beiden folgenden Hypothesen beschäftigen sich mit diesen Fragen.

B) Der Pilz sekretiert RNA in die Wirtszelle.

Von Agrobakterien ist es seit langer Zeit bekannt, dass es ihnen möglich ist DNA in das Genom ihrer Wirtszelle zu integrieren (Gelvin, 2003; McCullen & Binns, 2006).



**Abb. 4.2: Abbau von sekretierter mRNA von *B. graminis* in der pflanzlichen Wirtszelle**

*B. graminis* könnte mRNA in die Wirtszelle sekretieren (1), um den Stoffwechsel des Wirts zu manipulieren. Wenn die Wirtszelle ein RNAi-Konstrukt gegen diese pilzliche mRNA exprimiert (2), wird die mRNA abgebaut (3) ohne den Stoffwechsel des Wirts zu beeinflussen.

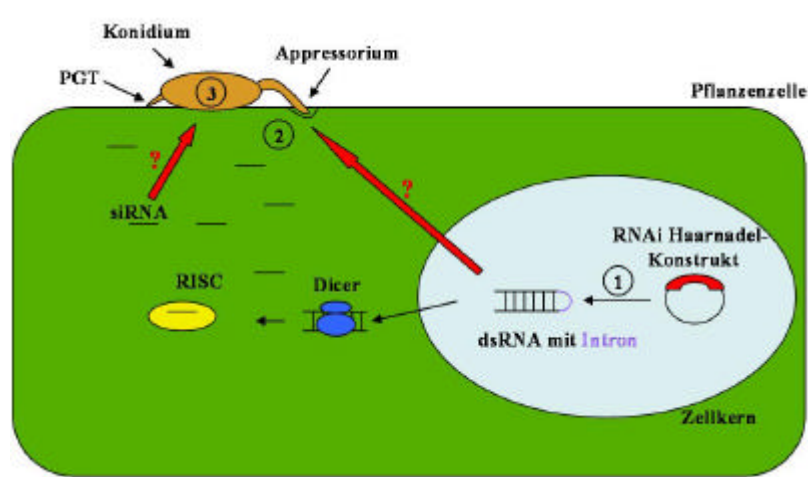
Vielleicht nutzt *B. graminis* eine ähnliche Methode, um seine Wirte zu manipulieren und exportiert RNA in die Wirtszelle (Abb. 4.2). Es ist bekannt, dass in pflanzlichen Zellen, die von einem obligat biotrophen Pathogen befallen sind, die Seneszenz verlangsamt wird. Dies wurde als *Green Island*-Effekt beschrieben (Scholes & Rolfe, 1996; Hückelhoven, 2005). Die zugrunde liegenden molekularen Prozesse sind aber bisher nicht völlig entschlüsselt. Es wird diskutiert, dass der Pilz Proteine sekretiert, um die Pflanze zu beeinflussen (Kemen et al., 2005). Die Möglichkeit, dass auch RNA sekretiert wird, wurde bisher experimentell nicht ausgeschlossen.

In dieser Arbeit wurde versucht, über Einzellzellanalysen nachzuweisen, ob *B. graminis* RNA in die Wirtszelle sekretiert. Dazu wurde aus einzelnen *Bgh*-infizierten Gerstenzellen mit einer Glaskapillare Zytoplasma entnommen. Es wurde darauf geachtet, dass das in der Pflanzenzelle vorhandene Haustorium nicht beschädigt wurde und auch keine epiphytischen Pilzstrukturen verletzt wurden. In jeder Probe, welche *Bgh*-infizierten Gerstenzellen entstammte, konnte aber neben pilzlicher RNA auch mitochondriale DNA des Pilzes nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Die Extrakte waren offensichtlich, trotz der Vorsichtsmaßnahmen, durch Zytoplasma aus dem Haustorium verunreinigt. Eine Erklärung dafür könnte im plötzlichen Druckabfall, welcher beim Anstechen der Pflanzenzelle auftritt, liegen. Wenn die Glaskapillare ins Zellinnere eindringt, wird durch den in der Zelle herrschenden Turgor der Zellinhalt in die Glaskapillare gedrückt und der Zelldruck schlagartig auf 1 bar gesenkt (Karrer et al., 1995). Dieser Druckabfall kann Zytoplasma samt mRNA und Mitochondrien aus dem Haustorium austreten lassen, wenn z.B. Haustorienfinger aufplatzen.

Diese Experimente sind kein Beweis für das Vorhandensein von pilzlichen Transkripten in der Wirtszelle, aber bisher konnte diese Möglichkeit auch nicht ausgeschlossen werden.

C) Der Pilz nimmt RNA aus der Wirtszelle auf.

Da bei den TIGS-Experimenten eine reduzierte Haustorien-Anzahl beobachtet werden konnte (Abb. 3.2), muss die Aufnahme des Überträgers von RNAi durch den Pilz zu einem frühen Zeitpunkt des Kontakts erfolgen. RNAi wird offensichtlich im Pilz ausgelöst, bevor das Haustorium in der Zelle etabliert worden ist. Es wurde kein vermehrtes Auftreten von unreifen Haustorien beobachtet. Das entsprechende Szenario könnte folgendermaßen aussehen.



**Abb. 4.3: Aufnahme von Komponenten der RNAi-Maschinerie des Wirtes durch *B. graminis***

Die Wirtszelle exprimiert ein RNAi-Konstrukt gegen ein pilzliches Gen (1) und bildet dsRNA und siRNA-Moleküle. Möglicherweise nimmt der Pilz dsRNA oder siRNA-Moleküle aus dem Wirt auf (2) und RNAi im Pilz wird eingeleitet (3).

Die Pflanze exprimiert ein RNAi-Konstrukt und es wird dsRNA gebildet, die im Zytoplasma zu siRNA-Molekülen abgebaut wird. Wenn das RNAi-Konstrukt mit einem starken Promotor versehen ist, liegen dsRNA oder siRNA-Moleküle in großer Anzahl in der Pflanzenzelle zum Zeitpunkt der Herstellung des Kontaktes zwischen Pilz und Wirt vor (Abb. 4.3). Der PGT reicht nicht bis ins Zytoplasma der Wirtszelle (Edwards, 2002) und kann daher nicht für die RNA-Aufnahme verantwortlich sein. Aus dem AGT wachsen das Appressorium und der Infektionsschlauch aus und durchdringen die Zellwand des Wirts nicht aber seine Plasmamembran. Es sind keine Berichte bekannt, die einen Hinweis über einen gerichteten Transport von Nukleinsäuren über die Plasma membran der Pflanze in den Pilz liefern könnten. RNAi verbreitet sich zwar systemisch in der Pflanze, aber sowohl Langstrecken- als auch Kurzstreckentransport laufen über den Symplasten ab (siehe Kapitel

1.4.1). Zumindest deutet der Nachweis von BSMV-Transkripten in *Bgt*, der auf BSMV-infizierten Pflanzen wuchs, darauf hin, dass der Pilz durchaus fähig ist längere RNA-Fragmente aufzunehmen (Abb. 3.22).

Eine Möglichkeit für die Aufnahme von dsRNA durch den Pilz ist die Endozytose. Endozytose spielt eine wichtige Rolle in vielen Aspekten der pilzlichen Entwicklung und tritt schon in sehr frühen Stadien auf. Sie wurde bei vielen unterschiedlichen Pilz-Arten beobachtet (Fischer-Parton et al., 2000). Endozytose spielt in *Ustilago maydis* beim Hyphenwachstum und der Sporenbildung eine Rolle (Fuchs & Steinberg, 2005; Fuchs et al., 2006). Bei *Magnaporthe grisea* wird die Beteiligung von Endozytose u.a. bei der Erkennung des Wirts und Transport und Recycling von Membran-Proteinen und –Lipiden diskutiert (Atkinson et al., 2002). Bei der Infektion eines Wirts werden über Exozytose viele Komponenten abgegeben. Dazu gehören lytische Enzyme oder adhesive Materialien (Braun & Howard, 1994). Endozytose scheint auch zu diesem Zeitpunkt bedeutend zu sein. Es werden nicht nur Komponenten des Wirts aufgenommen, sondern auch überschüssige Membran, welche bei Exozytose an die äußere Plasmamembran des Pilzes transportiert wurde, wird wieder entfernt (Atkinson et al., 2002). Von *B. graminis* ist bekannt, dass er lytische Enzyme einsetzt, um die Wirtszellwand zu durchdringen (Francis et al., 1996; Pryce-Jones et al., 1999). Nachdem die Enzyme sekretiert wurden, wäre Endozytose ein logischer Schritt, um einerseits Zellwandkomponenten des Wirts als Signalmoleküle aufzunehmen und andererseits überflüssige Membran von der äußeren Plasmamembran wieder dem inneren Membransystem zuzuführen. Endozytose bedeutet aber, dass Komponenten von außerhalb in einem Vesikel eingeschlossen werden und zu bestimmten Zellorganellen wie dem Golgi-Apparat oder der Vakuole transportiert werden. Daher ist es fraglich, ob dsRNA auf diesem Weg in das Zytoplasma oder den Zellkern des Pilzes gelangen und dort RNAi auslösen könnte.

Die siRNA-Moleküle dagegen sind nur 21 Nukleotiden lang. Diese kleinen Moleküle könnten durchaus zufällig in den Pilz transportiert werden (,hitchhiking'-Mechanismus). Sie könnten durch Tunnelproteine, die normalerweise deutlich größere, ebenfalls negativ geladene Moleküle transportieren, eindringen. Allerdings wird es zum Beginn des Kontaktes zwischen Wirt und Pathogen kaum Proteine geben, die die beiden miteinander verbinden.

Die Aufnahme von anderen Komponenten wie Dicer oder RISC, welche dsRNA oder siRNA gebunden haben, scheint unwahrscheinlich, da es sich um sehr große Proteinkomplexe handelt (Pickford & Cogoni, 2003).



### 4.3.2 Vorerst keine Beweise für *Silencing* im Pilz

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich zu zeigen, dass die Transkriptabundanz von Zielgenen in *B. graminis* herunterreguliert wurde. Sowohl mit Pilzmyzel von BSMV-infizierten Pflanzen als auch mit Pilzmyzel von transgenen Pflanzen, welche RNAi gegen HIGS 47 exprimierten, wurde erfolglos versucht mittels *real time*-PCR eine Veränderung des Transkriptlevels im Pilz festzustellen (siehe Kapitel 4.1.4).

Der stärkste Hinweis für HIGS, der mit unterschiedlichen Methoden erbracht wurde, ist die Zugehörigkeit der Kandidaten zum *B. graminis*-Transkriptom. Solange weder die Genomsequenz von Gerste noch die des Weizens vollständig bekannt ist, wird es allerdings schwierig sein nachzuweisen, dass kein Pflanzengen durch die eingebrachten Konstrukte ausgeschaltet wurde. Eventuell könnten Array-Experimente mit den transgenen Gerstenpflanzen weiterhelfen. Man könnte überprüfen, ob Gerstengene in den Pflanzen, die das RNAi-Konstrukt gegen HIGS 47 tragen anderes reguliert sind als in Wildtyp-Pflanzen.

Die Anzahl und die Diversität der Kandidaten, welche eine statistisch signifikante Reduktion der Anfälligkeit des Getreide-Mehltau-Systems verursacht hatten, ist ebenfalls ein Indiz dafür, dass es sich nicht um *off target*-Effekte gegen pflanzliche Gene handelt. Es ist durchaus möglich, dass der ein oder andere beobachtete Effekt auf *Silencing* von pflanzlichen Genen beruht, wie bei dem Kandidaten HIGS 6 (siehe Kapitel 3.3.1). Ein Vergleich mit Daten aus Experimenten mit RNAi-Konstrukten gegen pathogeninduzierte Gerstengene (unveröffentlichte Daten) spricht jedoch dafür, dass dies nur für wenige Kandidaten der Fall ist. Für eine willkürliche Auswahl von RNAi-Konstrukten gegen Gerstengene, wurden zwei Experimente im TIGS-System durchgeführt und daraus der Mittelwert berechnet. Von 52 RNAi-Konstrukten gegen Gerstengene erhöhen 36,5% den relativen HI auf über 100% und 63,5% verringern ihn unter 100%. Von 30 RNAi-Konstrukten gegen *B. graminis*-Gene erhöhen nur 13,3% den relativen HI auf über 100% und 86,7% verringern ihn unter 100%. Dieser Unterschied ist im  $\chi^2$ -Test mit einem p-Wert von 0,0121 signifikant. Würde man davon ausgehen, dass diese 30 RNAi-Konstrukte ebenfalls hauptsächlich Gerstengene ausschalten, dann sollte die Verteilung des relativen HI gleich sein. Es besteht also kein Grund zur Annahme, dass in den beschriebenen Experimenten in erster Linie Gerstengene mittels RNAi ausgeschaltet wurden.

Bei HIGS handelt es sich hier außerdem um kein völlig neuartiges System. Aus Nematoden ist es schon länger bekannt und wurde anhand mehrerer Beispiele beschrieben (Huang et al., 2006; Yadav et al., 2006; Fairbairn et al., 2007). In diesem Pathosystem gelang auch bereits der Nachweis, dass der Transkriptgehalt des Zielgens in den Nematoden reduziert wurde (Yadav et al., 2006; Fairbairn et al., 2007).

### 4.3.3. Ausblicke

Die dem HIGS-System zugrunde liegenden molekularen Mechanismen konnten in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es wurden drei unterschiedliche Hypothesen aufgestellt. Die Hypothese, dass der HIGS-Effekt nur auf einem Artefakt des Einzelzellsystems beruht, indem der Pilz DNA von der Oberfläche des Wirts aufnimmt, konnte durch die Resultate mit den transgenen Pflanzen widerlegt werden. Ob eine der beiden anderen Hypothesen zutrifft, bleibt noch zu untersuchen. Möglicherweise wirkt HIGS auch je nach Zielsequenz entweder in der Pflanzenzelle oder im Pilz und beide Hypothesen treffen zu. Diese müsste noch näher untersucht werden, wofür es mehrere Optionen gibt:

Mittels *in situ*-Hybridisation könnte sich eventuell der *Antisense*-Strang der dsRNA in den pilzlichen Strukturen nachweisen lassen. Dies wäre auch eine Möglichkeit Transkripte, die der Pilz sekretiert hat, in der pflanzlichen Zelle nachzuweisen (Matsuda et al., 1997). Ferner könnte so die Reduktion der Zielgen-RNA im Pilz untersucht werden.

Mittels *Microdissection* könnte man eventuell den Pilz, der auf transienten Wirtszellen, welche RNAi gegen ein pilzliches Gen exprimieren, gewachsen ist und reduziertes Wachstum aufweist, abtrennen (Kehr, 2003). In diesem ausgewählten Material müsste sich der reduzierte Transkriptgehalt des Zielgens nachweisen lassen, wenn HIGS wirklich die Expression von Genen aus *B. graminis* unterdrückt.

Es gibt die Möglichkeit siRNA-Moleküle mit einem Farbstoff zu markieren (Williams et al., 2004). Die markierten siRNA-Moleküle könnten in die pflanzliche Wirtszelle eingebracht werden. Man müsste die markierten siRNA-Moleküle im Pilz nachweisen können, wenn sie die Moleküle sind, welche RNAi in den Pilz übertragen.

Die Wahl eines anderen Phytopathogens würde viele neue Optionen eröffnen. Dazu müsste man sich allerdings von den obligat biotrophen Pilzen trennen und HIGS an hemibiotrophen Phytopathogenen untersuchen. Da auch hemibiotrophe Pathogene eine Phase durchlaufen, in

der sie sich biotroph ernähren (Mendgen & Hahn, 2002), sollte HIGS hier anwendbar sein. Die Getreide-Pathogene *Magnaporthe* sp., *Fusarium* sp. oder *Colletotrichum* sp. würden bedeutende Vorteile bringen, da hier die Möglichkeit besteht den Pilz zu transformieren, Mutanten vorliegen und das Genom einiger Pathogene bereits sequenziert worden ist (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fgi/>).

Man könnte versuchen mittels HIGS den charakteristischen Phänotyp einer bekannten Mutante zu phänokopieren.

Man könnte einen hemibiotrophen Pilz auf Medium wachsen lassen, welches dsRNA oder siRNA-Moleküle enthält oder damit beschichtet ist, um nachzuweisen, dass die Aufnahme von RNA-Molekülen möglich ist.

Man könnte ein transformiertes GFP (*green fluorescent protein*)-exprimierendes Pathogen auf einem pflanzlichen Wirt wachsen lassen, der RNAi gegen GFP exprimiert und beobachten, ob die GFP-Fluoreszenz abnimmt oder ganz erlischt.

Dies ist nur eine kleine Auswahl an möglichen Experimenten an hemibiotrophen Pathogenen mit denen man zweifelsfrei beweisen könnte, ob das durch HIGS verursachte *Silencing* im Pilz stattfindet.

Eine interessante Frage ist auch, ob HIGS in nekrotrophen Pilzen stattfindet. Nekrotrophe Pilze gehen keine intime Interaktion mit dem Wirt ein, sondern töten die Wirtszelle mit toxischen Substanzen und lytischen Enzymen ab und ernähren sich von der abgestorbenen Zelle (z.B. *Botrytis cinerea*, van Kan, 2006). RNA ist nicht sehr stabil und würde wahrscheinlich in der abgestorbenen Zelle schnell abgebaut werden. Vielleicht liegen aber dsRNA und siRNA lange genug stabil vor, um vom Pilz aufgenommen zu werden und RNAi auszulösen.

#### **4.3.4. Anwendungsmöglichkeiten von HIGS**

HIGS bietet die Möglichkeit zur Untersuchung von Genfunktionen in obligat biotrophen Pilzen. Dies war bisher nicht möglich (siehe auch Kapitel 1.4.2.4). HIGS könnte nicht nur zur Erforschung von Pathogenen, sondern auch zur Erforschung von Pilzen, die in Symbiose mit Pflanzen leben, beitragen.

HIGS bietet die Möglichkeit eines auf dsRNA basierenden antifungalen Wirkprinzips im Sinne eines Fungizids. So könnte man ein RNAi-Konstrukt erstellen, das Sequenz-

Fragmente von mehreren Genen unterschiedlicher Pathogene enthält. Die einzelnen Fragmente müssten kurz sein, so dass ein paar wirksame siRNA-Moleküle entstehen können. Dadurch ließen sich Pflanzen erzeugen, welche resistent gegen eine Palette von Pathogenen sind. Alternativ könnte man auch als Zielgen ein unter pilzlichen Pathogenen hochkonserviertes Gen auswählen. Der entscheidende Vorteil dieses Systems wäre, dass in den transgenen Pflanzen kein zusätzliches Protein gebildet wird, welches toxisch für einen Konsumenten sein könnte.

Allerdings bringt dieses System auch einige Probleme mit sich. Bisher ist nicht geklärt, was bei RNAi ohne Zielgen in einer transgenen Pflanze geschieht. Möglicherweise werden dsRNA und siRNA produziert, sind aber zu instabil und werden bald wieder abgebaut. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Zelle mit siRNA übersättigt ist und diese sich an Sequenzen anlagern zu denen keine 100% Homologie besteht, was pleiotrophe Nebeneffekte zur Folge hätte.

Im Umfeld einer Pflanze leben nicht nur schädliche Pilze. Viele Pflanzen gehen Symbiosen mit Wurzelpilzen ein, den Mykorrhiza. Ein universelles RNAi-Konstrukt, welches gegen viele Pilzarten wirkt, würde wahrscheinlich auch Mykorrhiza schädigen. Man könnte das RNAi-Konstrukt durch einen spezifischen Promotor z.B. nur in der Epidermis der Pflanze exprimieren lassen (Altpeter et al., 2005; Himmelbach et al., 2007). Allerdings breitet sich RNAi systemisch in Pflanzen aus und könnte so in andere Bereiche der Pflanze wie die Wurzeln gelangen (Kobayashi & Zambryski, 2007; Kehr & Buhtz, 2008).

Wichtig ist es Zielgene zu meiden, die zwischen Pilz und Pflanze konserviert sind. Kurze identische Sequenz-Abschnitte reichen bereits aus, um *Silencing* von Genen in der Pflanze zu erreichen (Parrish et al., 2000; Xu et al., 2006 und siehe Kapitel 1.4.3.2). Es wäre von Vorteil, wenn das Genom des pflanzlichen Wirts vollständig bekannt wäre, um solche *off target*-Effekte zu vermeiden. Selbst wenn der *off target*-Effekt nicht letal für die Pflanze wäre, könnte er negative Auswirkungen auf ihre Entwicklung und den Ernteertrag haben.

Es ist noch zu wenig über HIGS als potentielle Methode des Pflanzenschutzes bekannt, um alle Probleme beurteilen zu können. Nachdem erforscht wurde, wie das System funktioniert und wie die Barriere für dsRNA oder siRNA zwischen Wirt und Pathogen überwunden wird, können effizientere RNAi-Konstrukte erstellt werden und Probleme, wie *off target*-Effekte im Wirt und in Symbionten des Wirts gelöst werden.

## 5. Literaturverzeichnis

ALTPETER, F., A. VARSHNEY, O. ABDERHALDEN, D. DOUCHKOV, C. SAUTTER, J. KUMLEHN,  
R. DUDLER AND P. SCHWEIZER

Stable expression of a defense-related gene in wheat epidermis under transcriptional control  
of a novel promoter confers pathogen resistance

Plant Mol Biol 2005; 57: 271- 283

ALTSCHUL, S.F., T.L. MADDEN, A.A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER AND D.J.  
LIPMAN

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs

Nucleic Acids Res. 1997; 25:3389- 3402

ANGELL, S.M. AND D.C. BAULCOMBE

Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA

EMBO J 1997; 16 (12): 3675- 3684

AOKI, K., H. MORIGUCHI, T. YOSHIOKA, K. OKAWA AND H. TABARA

*In vitro* analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C.  
elegans*

EMBO J 2007; 26: 5007- 5019

ARROYO, J., J. SARFATI, M.T. BAIXENCH, E. RAGNI, M. GUILLÉN, J.M. RODRIGUEZ-PEÑA, L.  
POPOLO AND J.P. LATGÉ

The GPI-anchored Gas and Crh families are fungal antigens

Yeast 2007; 24 (4): 289- 296

ATKINSON, H.A., A. DANIELS AND N.D. READ

Live-cell imaging of endocytosis during conidial germination in the rice blast fungus,

*Magnaporthe grisea*

Fungal Genet Biol 2002; 37: 233- 244

BAI, Y., S. PAVAN, Z. ZHENG, N.F. ZAPPEL, A. REINSTÄDLER, C. LOTTI, C. DE GIOVANNI, L. RICCIARDI, P. LINDHOUT, R. VISSER, K. THERES AND R. PANSTRUGA

Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of Mlo function

Mol Plant Microbe Interact 2008; 21 (1): 30- 39

BAULCOMBE, D.

RNA silencing in plants

Nature 2004; 431: 356- 363

BENEDITO, V.A., P.B. VISSER, G.C. ANGENENT AND F.A. KRENS

The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes

Genet Mol Res 2004; 3 (3): 323- 341

BENNETZEN, J.L. AND B.D. HALL

Codon selection in yeast

J Biol Chem 1982; 6: 3026- 3031

BERNSTEIN, E., A.A. CAUDY, S.M. HAMMOND AND G.J. HANNON

Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference

Nature 2001; 409: 363- 365

BINDSCHEDLER, L.V., P. SANCHEZ, S. DUNN, J. MIKAN, M. THANGAVELU, J.M. CLARKSON AND R.M. COOPER

Deletion of the SNP1 trypsin protease from *Stagonospora nodorum* reveals another major protease expressed during infection

Fungal Genet Biol 2003; 38 (1): 43- 53

BINDSLEV L., M.J. KERSHAW, N.J. TALBOT AND R.P. OLIVER

Complementation of the *Magnaporthe grisea* *deltacpkA* mutation by the *Blumeria graminis* PKA-c gene: functional genetic analysis of an obligate plant pathogen

Mol Plant Microbe Interact 2001; 14 (12): 1368- 75

BOTH, M., M. CSUKAI, M.P.H. STUMPF AND P.D. SPANU

Gene expression profiles of *Blumeria graminis* indicate dynamic changes to primary metabolism during development of an obligate biotrophic pathogen

Plant Cell 2005a; 17: 2107- 2122

BOTH, M., S.E. ECKERT, M. CSUKAI, E. MÜLLER, G. DIMOPOULOS AND P.D. SPANU

Transcript profiles of *Blumeria graminis* development during infection reveal a cluster of genes that are potential virulence determinants

Mol Plant Microbe Interact 2005b; 18 (2): 125- 133

BRANDT, S., J. KEHR, C. WALZ, A. IMLAU, L. WILLMITZER AND J. FISAHN

A rapid method for detection of plant gene transcripts from single epidermal, mesophyll and companion cells of intact leaves

Plant J 1999; 20 (2): 245- 250

BRAUN, E.J. AND R.J. HOWARD

Adhesion of fungal spores and germlings to host surfaces

Protoplasma 1994; 181: 202- 212

BRODERSEN, P. AND O. VOINNET

The diversity of RNA silencing pathways in plants

Trends Genet 2006; 22 (5): 268- 280

BRUUN-RASMUSSEN, M., C.T. MADSEN, S. JESSING AND M. ALBRECHTSEN

Stability of barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in barley

Mol Plant Microbe Interact 2007; 20 (11): 1323- 31

BÜSCHGES, R., K. HOLLRICHER, R. PANSTRUGA, G. SIMONS, M. WOLTER, A. FRIJTERS, R. VAN DAELEN, T. VAN DER LEE, P. DIERGAARDE, J. GROENENDIJK, S. TÖPSCH, P. VOS, F. SALAMINI AND P. SCHULZE- LEFERT

The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance

Cell 1997; 88: 695- 705

BURCH- SMITH, T.M., J.C. ANDERSON, G.B. MARTIN AND S.P. DINESH- KUMAR

Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants

Plant J 2004; 39: 734- 746

CARACUEL, Z., A.L. MARTINEZ- ROCHA, A. DI PIETRO, M.P. MADRID AND M.I.G. RONCERO

*Fusarium oxysporum* gas1 encodes a putative beta-1,3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants

Mol Plant Microbe Interact 2005; 18 (11): 1140- 1147

CARVER, T.L.W. AND W.R. BUSHNELL

The probable role of primary germ tubes in water uptake before infection by *Erysiphe graminis*

Physiol Plant Pathol 1983; 23: 229- 240

CARVER, T.L.W. AND S.M. INGERSON

Responses of *Erysiphe graminis* germlings to contact with artificial and host surfaces

Physiol Mol Plant Pathol 1987; 30: 359- 372

CHAURE, P., S.J. GURR AND P. SPANU

Stable transformation of *Erysiphe graminis*, an obligate biotrophic pathogen of barley

Nature 2000; 18: 205- 207

CHEN, Z., H.A. HARTMANN, M.-J. WU, E.J. FRIEDMAN, J.-G. CHEN, M. PULLEY, P. SCHULZE-LEFERT, R. PANSTRUGA AND A.M. JONES

Expression analysis of the AtMLO gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins

Plant Mol Biol 2006; 60: 583- 597

DANGL, J.L. AND J.D.G. JONES

Plant pathogens and integrated defence responses to infection

Nature 2001; 411: 826- 833



DELGADO, N., J. XUE, J.-J. YU, C.-Y. HUNG AND G.T. COLE

A recombinant  $\beta$ -1,3-Glucanotransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against Coccidioidomycosis

Infect Immun 2003; 71 (6): 3010- 3019

DUNOYER, P., C. HIMBER AND O. VOINNET

DICER-like 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing

Nat Genet 2005; 37: 1356- 1360

DOUCHKOV, D., D. NOWARA, U. ZIEROLD AND P. SCHWEIZER

A high-throughput gene-silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells

Mol Plant Microbe Interact 2005; 18 (8): 755- 761

EDWARDS, H.H.

Development of primary germ tubes by conidia of *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* on leaf epidermal cells of *Hordeum vulgare*

Can J Bot 2002; 80: 1121- 1125

ELBASHIR, S.M. J. HARBORTH, W. LENDECKEL, A. YALCIN, K. WEBER AND T. TUSCHL

Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells

Nature 2001; 411 (6836): 494- 8

ELLIOTT, C., F. ZHOU, W. SPIELMEYER, R. PANSTRUGA AND P. SCHULZE- LEFERT

Functional conservation of wheat and rice *Mlo* orthologs in defense modulation to the powdery mildew fungus

Mol Plant Microbe Interact 2002; 15 (10): 1069- 1077

FAGARD, M., S. BOUTET, J. MOREL, C. BELLINI AND H. VAUCHERET

AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals

Proc Natl Acad Sci 2000; 97 (21): 11650- 11654

FAIRBAIRN, D.J., A.S. CAVALLARO, M. BERNARD, J. MAHALINGA-IYER, M.W. GRAHAM AND J.R. BOTELLA

Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes  
*Planta* 2007; 226 (6): 1525- 33

FILICHKIN, S.A., S.P. DIFAZIO, A.M. BRUNNER, J.M. DAVIS, Z.K. YANG, U.C. KALLURI, R.S. ARIAS, E. ETHERINGTON, G.A. TUSKAN AND S.H. STRAUSS

Efficiency of gene silencing in *Arabidopsis*: direct inverted repeats vs. transitive RNAi vectors  
*Plant Biotech J* 2007; 5: 615- 626

FIRE, A., S. XU, M.K. MONTGOMERY, S.A. KOSTAS, S.E. DRIVER AND C.C. MELLO

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*  
*Nature* 1998; 391: 806- 811

FISCHER- PARTON, S., R.M. PARTON, P.C. HICKEY, J. DIJKSTERHUIS, H.A. ATKINSON AND N. D. READ

Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae  
*J Micros* 2000; 198 (3): 246- 259

FRANCIS, S.A., F.M. DEWEY AND S.J. GURR

The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*  
*Physiol Mol Plant Pathol* 1996; 49: 201- 211

FRIEDEL, C.C., K.H.V. JAHN, S. SOMMER, S. RUDD, H.W. MEWES AND I.V. TETKO

Support vector machines for separation of mixed plant-pathogen EST collections based on codon usage  
*Bioinformatics* 2005; 21 (8): 1383- 1388

FU, D., C. UAUY, A. BLECHL AND J. DUBCOVSKY

RNA interference for wheat functional gene analysis  
*Transgenic Res* 2007; 16: 689- 701

FUCHS, U. AND G. STEINBERG

Endocytosis in the plant-pathogenic fungus *Ustilago maydis*

Protoplasma 2005; 226: 75- 80

FUCHS, U., G. HAUSE, I. SCHUCHARDT AND G. STEINBERG

Endocytosis is essential for pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*

Plant Cell 2006; 18: 2066- 2081

FUSARO, A.F., L. MATTHEW, N.A. SMITH, S.J. CURTIN, J. DEDIC-HAGAN, G.A. ELLACOTT, J.M. WATSON, M.-B. WANG, C. BROSANAN, B.J. CARROLL AND P.M. WATERHOUSE

RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway

EMBO Rep 2006; 7 (11): 1168- 1175

GELVIN, S.B.

*Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool

Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67 (1): 16- 37

GOEDEKE, S., G. HENSEL, E. KAPUSI, M. GAHRTZ AND J. KUMLEHN

Transgenic barley in fundamental research and biotechnology

Transgenic Plant J 2007; 1 (1): 104- 117

GRUBBS, F.

Procedures for detecting outlying observations in samples

Technometrics 1969; 11 (1): 1- 21

HAHN, M.G.

Microbial elicitors and their receptors in plants

Annu Rev Phytopathol 1996; 34: 387- 412

HEATH, M.C.

Nonhost resistance and nonspecific plant defenses

Curr Opin Plant Biol 2000; 3: 315- 319

HEIN, I., M. BARCISZEWSKA- PACAK, K. HRUBIKOVA, S. WILLIAMSON, M. DINESEN, I.E. SOENDERBY, S. SUNDAR, A. JARMOLOWSKI, K. SHIRASU AND C. LACOMME

Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley

Plant Physiol 2005; 138: 2155- 2164

HENRY, C., I. MOUYNA AND J.-P. LATGÉ

Testing the efficacy of RNA interference constructs in *Aspergillus fumigatus*

Curr Genet 2007; 51: 277- 284

HENSEL, G. AND J. KUMLEHN

Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by co-culture of immature embryos with *Agrobacteria*

In: CURTIS, I.S. (Ed.) Transgenic crops of the world - Essential protocols 2004, Kluwer, Dordrecht; 35- 44

HILSON, P., J. ALLEMEERSCH, T. ALTMANN, S. AUBOURG, A. AVON, J. BEYNON, R.P. BHALERAO, F. BITTON, M. CABOCHE, B. CANNOOT, V. CHARDAKOV, C. COGNET-HOLLIGER, V. COLOT, M. CROWE, C. DARIMONT, S. DURINCK, H. EICKHOFF, A.F. DE LONGEVIALLE, E.E. FARMER, M. GRANT, M.T.R. KUIPER, H. LEHRACH, C. LÉON, A. LEYVA, J. LUNDEBERG, C. LURIN, Y. MOREAU, W. NIETFELD, J. PAZ-ARES, P. REYMOND, P. ROUZÉ, G. SANDBERG, M.D. SEGURA, C. SERIZET, A. TABRETT, L. TACONNAT, V. THAREAU, P. VAN HUMMELEN, S. VERCROYSE, M. VUYLSTEKE, M. WEINGARTNER, P.J. WEISBEEK, V. WIRTA, F.R.A. WITTINK, M. ZABEAU AND I. SMALL

Versatile gene-specific sequence tags for Arabidopsis functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications

Genome Res 2004; 14: 2176- 2189

HIMMELBACH, A., U. ZIEROLD, G. HENSEL, J. RIECHEN, D. DOUCHKOV, P. SCHWEIZER AND J. KUMLEHN

A set of modular binary vectors for the transformation of cereals

Plant Physiol 2007; 145 (4): 1192- 1200

HIRT, H., M. KÖGL, T. MURBACHER AND E. HEBERLE- BORS

Evolutionary conservation of transcriptional machinery between yeast and plants as shown by the efficient expression from the CaMV 35S promoter and 35S terminator  
Curr Genet 1990; 17: 473- 479

HOLZBERG, S., P. BROSIO, C. GROSS AND G.P. POGUE

Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant  
Plant J 2002; 30 (3): 315- 327

HUANG, G., R. ALLEN, E.L. DAVIS, T.J. BAUM AND R.S. HUSSEY

Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene  
Proc Natl Acad Sci 2006; 103 (39): 14302- 14306

HÜCKELHOVEN, R., J. FODOR, C. PREIS AND K.-H. KOGEL

Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation  
Plant Physiol 1999; 119: 1251- 1260

HÜCKELHOVEN, R.

Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies  
FEMS Microbiolo Lett 2005; 245: 9- 17

HWANG, C.-S., M.A. FLAISHMAN AND P.E. KOLATTUKUDY

Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene  
Plant Cell 1995; 7: 183- 193

JOHNSTON. M

Powdery mildew

In: Compendium of barley diseases 1997; APS Press: 31- 33

JØRGENSEN, J.H.

Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley  
*Euphytica* 1992; 63: 141- 152

JØRGENSEN, J.H.

Genetics of powdery mildew resistance in barley  
*Crit Rev Plant Sci* 1994; 13 (1): 97- 119

KADOTANI, N., H. NAKAYASHIKI, Y. TOSA AND S. MADAMA

RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*  
*Mol Plant Microbe Interact* 2003; 16 (9): 769- 776

KAHMANN, R. AND J. KÄMPER

*Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development  
*New Phytologist* 2004; 164: 31- 42

KARRER, E.E., J.E. LINCOLN, S. HOGENHOUT, A.B. BENNETT, R.M. BOSTOCK, B. MARTINEAU, W.J. LUCAS, D.G. GILCHRIST AND D. ALEXANDER

*In situ* isolation of mRNA from individual plant cells: Creation of cell-specific cDNA libraries

*Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3814- 3818

KAWABE, A. AND N.T. MIYASHITA

Patterns of codon usage bias in three dicot and four monocot plant species

*Genes Genet Syst* 2003; 78: 343- 352

KEHR, J.

Single cell technology

*Curr Opin Plant Biol* 2003; 6: 617- 621

KEHR, J. AND A. BUHTZ

Long distance transport and movement of RNA through the phloem

*J Exp Bot* 2008; 59 (1): 85- 92

KELLER, B., C. FEUILLET AND N. YAHIAOUI

Map-based isolation of disease resistance genes from bread wheat: cloning in a supersize genome

Genet Res Camb 2005; 85: 93- 100

KEMEN, E., A.C. KEMEN, M. RAFIQI, U. HEMPEL, K. MENDGEN, M. HAHN AND R.T. VOEGELE

Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells

Mol Plant Microbe Interact 2005; 18 (11): 1130- 1139

KERSCHEN, A., C.A. NAPOLI, R.A. JORGENSEN AND A.E. MÜLLER

Effectiveness of RNA interference in transgenic plants

FEBS Lett 2004; 566: 223- 228

KOBAYASHI, K. AND P. ZAMBRYSKI

RNA silencing and its cell-to-cell spread during *Arabidopsis* embryogenesis

Plant J 2007; 50: 597- 604

KÖHLER, W., G. SCHACHTEL AND P. VOLESKE

Biostatistik

Springer Verlag Berlin 2002; dritter Auflage

KOGEL, K.-H. AND G. LANGEN

Induced disease resistance and gene expression in cereals

Cell Microbiol 2005; 7 (11): 1555- 1564

KÜNNE, C., M. LANGE, T. FUNKE, H. MIEHE, T. THIEL, I. GROSSE AND U. SCHOLZ

CR-EST: a resource for crop ESTs

Nucleic Acids Res 2005; 33: 619- 621

KUNOH, H., S. TAKAMATSU AND H. ISHIZAKI

Cytological studies of early stages of powdery mildew in barley and wheat. III. Distributions of residual calcium and silicon in germinated conidia of *Erysiphe graminis hordei*

Physiol Plant Pathol 1978; 13: 319- 325

KUMAGAI, M.H., J. DONSON, G. DELLA- CIOPPA, D. HARVEY, K. HANLEY AND L.K. GRILL

Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA

Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 1679- 1683

LACOMME, C., K. HRUBIKOVA AND I. HEIN

Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats

Plant J 2003; 34: 543- 553

LIU, H., T.R. COTTRELL, L.M. PIERINI, W.E. GOLDMAN AND T.L. DOERING

RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*

Genetics 2002; 160: 463- 470

LU, R., A.M. MARTIN- HERNANDEZ, J.R. PEART, I. MALCUIT AND D.C. BAULCOMBE

Virus-induced gene silencing in plants

Methods 2003; 30: 296- 303

LYNGKJAER, M.F., A.C. NEWTON, J.L. ATZEMA AND S.J. BAKER

The barley mlo-gene: an important powdery mildew resistance source

Agronomie 2000; 20: 745- 756

MATSUDA, Y., H. TOYODA, A. KURITA AND S. OUCHI

In situ PCR technique based on pricking microinjection for cDNA cloning in single cells of barley coleoptile and powdery mildew pathogen

Plant Cell Rep 1997; 16: 612- 618

MATZKE, M.A. AND J.A. BIRCHLER

RNAi-mediated pathways in the nucleus

Nature 2005; 6: 24- 35

MCCAFFREY, A.P., L. MEUSE, T.-T.T. PHAM, D.S. CONKLIN, G.J. HANNON AND M.A. KAY

RNA interference in adult mice

Nature 2002; 418: 38- 39



MCCULLEN, C.A. AND A.N. BINNS

*Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer

Annu Rev Cell Dev Biol 2006; 22: 101- 27

MCDONALD, B.A. AND C. LINDE

The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance

Euphytica 2002; 124: 163- 180

MCGINNIS, K., V. CHANDLER, K. CONE, H. KAEPLER, S. KAEPLER, A. KERSCHEN, C.

PIKAARD, E. RICHARDS, L. SIDORENKO, T. SMITH, N. SPRINGER AND T. WULAN

Transgene- induced RNA interference as a tool for plant functional genomics

Methods Enzymol 2005; 392: 1- 24

MEISTER, G. AND T. TUSCHL

Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA

Nature 2004; 431: 343- 349

MENDGEN, K. AND M. HAHN

Plant infection and the establishment of fungal biotrophy

Trends Plant Sci 2002; 7 (8): 352- 6

MISQUITTA, L. AND B.M. PATERSON

Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation

Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 1451- 1456

MOUZYNA, I., T. FONTAINE, M. VAI, M. MONOD, W.A. FONZI, M. DIAQUIN, L. POPOLO, R.P. HARTLAND AND J.-P. LATGE

Glycosylphosphatidylinositol-anchored Glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall

J Biol Chem 2000; 275 (20): 14882- 14889

MOUYNÀ, I., W. MORELLE, M. VAI, M. MONOD, B. LECHENNE, T. FONTAINE, A. BEAUVAIS, J. SARFATI, M.-C. PREVOST, C. HENRY AND J.-P. LATGE

Deletion of GEL2 encoding for a  $\beta$  (1–3) glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*

Mol Microbiol 2005; 56 (6): 1675- 1688

MULLINS, E.D. AND S. KANG

Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants

Cell Mol Life Sci 2001; 58: 2043- 2052

NAKAYASHIKI, H., S. HANADA, B.Q. NGUYEN, N. KADOTANI, Y. TOSA AND S. MAYAMA

RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi

Fungal Genet Biol 2005; 42 (4): 275- 83

NAPOLI, C., C. LEMIEUX AND R. JORGENSEN

Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible  $\omega$ -suppression of homologous genes *in trans*

Plant Cell 1990; 2: 279-289

NIELSEN, K.A., R.L. NICHOLSON, T.L.W. CARVER, H. KUNOH AND R.P. OLIVER

First touch: An immediate response to surface recognition in conidia of *Blumeria graminis*

Physiol Mol Plant Pathol 2000; 56: 63- 70

OLIVER, R. AND A. OSBOURN

Molecular dissection of fungal phytopathogenicity

Microbiol 1995; 141: 1- 9

OLMEDO-MONFIL, V., C. CORTÉS-PENAGOS AND A. HERRERA-ESTRELLA

Three decades of fungal transformation: key concepts and applications

Methods Mol Biol 2004; 267: 297- 313

PANSTRUGA, R.

Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens

Curr Opin Plant Biol 2003; 6: 320- 326

PANSTRUGA, R.

A golden shot: how ballistic single cell transformation boosts the molecular analysis of cereal-mildew interactions

Mol Plant Pathol 2004; 5 (2): 141- 148

PARRISH, S., J. FLEENOR, S. XU, C. MELLO AND A. FIRE

Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference

Mol Cell 2000; 6: 1077- 1087

PETERSEN, B.O. AND M. ALBRECHTSEN

Evidence implying only unprimed RdRP activity during transitive gene silencing in plants

Plant Mol Biol 2005; 58: 575- 583

PIFFANELLI, P., F. ZHOU, C. CASAIS, J. ORME, B. JAROSCH, U. SCHAFFRATH, N.C. COLLINS, R. PANSTRUGA AND P. SCHULZE- LEFERT

The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli

Plant Physiol 2002; 129: 1076- 1085

PETTY, I.T., B.G. HUNTER, N. WEI AND A.O. JACKSON

Infectious barley stripe mosaic virus RNA transcribed in vitro from full-length genomic cDNA clones.

Virology 1989; 171 (2): 342- 9

PICKFORD, A.S. AND C. COGONI

RNA-mediated gene silencing

Cell Mol Life Sci 2003; 60: 871- 882

POPOLO, L., M. VAI, E. GATTI, S. PORELLO, P. BONFANTE, R. BALESTRINI AND L. ALBERGHINA

Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gpII5 in morphogenesis and cell separation

J Bacteriol 1993; 175 (7): 1879- 1885

PRYCE- JONES, E., T. CARVER AND S.J. GURR

The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*

Physiol Mol Plant Pathol 1999; 55: 175- 182

QUACKENBUSH, J., J. CHO, D. LEE, F. LIANG, I. HOLT, S. KARAMYCHEVA, B. PARVIZI, G. PERTEA, R. SULTANA AND J. WHITE

The TIGR gene indices: analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species

Nucleic Acids Res 2001; 29 (1): 159- 164

RAGNI, E., T. FONTAINE, C. GISSI, J.P. LATGE AND L. POPOLO

The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis

Yeast 2007; 24 (4): 297- 308

RAM, A.F.J., J.C. KAPTEYN, R.C. MONTIJN, L.H. CARO, J.E. DOUWES, W. BAGINSKY, P. MAZUR, H. VAN DEN ENDE AND F.M. KLIS

Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta 1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity

J Bacteriol 1998; 180 (6):1418- 1424

RAPPLEYE, C.A., J.T. ENGLE AND W.E. GOLDMAN

RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for  $\alpha$ -(1,3)-glucan in virulence

Mol Microbiol 2004; 53 (1): 153- 165

RIDOUT, C.J., P. SKAMNIOTI, O. PORRITT, S. SACRISTAN, J.D.G. JONES AND J.K.M. BROWN

Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance

Plant Cell 2006; 18: 2402- 2414

ROMANO, N. AND G. MACINO

Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences

Mol Microbiol 1992; 6 (22): 3343- 3353

SAMBROOK, J. AND D.W. RUSSEL

Molecular cloning – A laboratory manual

Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; Third Edition

SANDHU, D. AND K. GILL

Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes

Plant Physiol 2002; 128: 803- 811

SCHOLES, J.D. AND S.A. ROLFE

Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence

Planta 1996; 199: 573- 582

SCHRAMKE, V. AND R. ALLSHIRE

Those interfering little RNAs! Silencing and eliminating chromatin

Curr Opin Genet Dev 2004; 14: 174- 180

SCHULTHEISS, H., C. DECHERT, K.-H. KOGEL AND R. HÜCKELHOVEN

A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley

Plant Physiol 2002; 128: 1447- 1454

SCHWEIZER, P., L. VALLELIAN- BINDSCHEDLER AND E. MÖSINGER

Heat-induced resistance in barley to the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*

Physiol Mol Plant Pathol 1995; 47: 51– 66

SCHWEIZER, P., J. POKORNY, O. ABDERHALDEN AND R. DUDLER

A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat  
Mol Plant Microbe Interact 1999; 12 (8): 647- 654

SCHWEIZER, P.

Nonhost resistance of plants to powdery mildew - New opportunities to unravel the mystery  
Physiol Mol Plant Pathol 2007; 70: 3- 7

SCOFIELD, S.R., L. HUANG, A.S. BRANDT AND B.S. GILL

Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the *Lr21*- mediated leaf rust resistance pathway  
Plant Physiol 2005; 138: 2165- 2173

SEIFFERT, U. AND P. SCHWEIZER

A pattern recognition tool for quantitative analysis of *in planta* hyphal growth of powdery mildew fungi  
Mol Plant Microbe Interact 2005; 18 (9): 906- 912

SHARP, P.M., E. COWE, D.G. HIGGINS, D.C. SHIELDS, K.H. WOLFE AND F. WRIGHT

Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*  
Nucleic Acids Res 1988; 16 (17): 8207- 8211

SHEN, Q.-H., Y. SAIJO, S. MAUCH, C. BISKUP, S. BIERI, B. KELLER, H. SEKI, B. ÜLKER, I.E. SOMSSICH AND P. SCHULZE-LEFERT

Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses  
Science 2007; 315: 1098- 1103

SHIRASU, K., K. NIELSEN, P. PIFFANELLI, R. OLIVER AND P. SCHULZE-LEFERT

Cell-autonomous complementation of *mlo* resistance using a biolistic transient expression system  
Plant J 1999; 17 (3): 293- 299

SHRAWAT, A.K. AND H. LÖRZ

*Agrobacterium* -mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers  
Plant Biotech J 2006; 4: 575- 603

SIJEN, T., J. FLEENOR, F. SIMMER, K.L. THIJSEN, S. PARRISH, L. TIMMONS, R.H.A. PLASTERK, AND A. FIRE

On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing  
Cell 2001; 107: 465- 476

SINGRÜN, C., S.L.K. HSAM, L. HARTL, F.J. ZELLER AND V. MOHLER

Powdery mildew resistance gene *Pm22* in cultivar Virest is a member of the complex *Pm1* locus in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.)  
Theor Appl Genet 2003; 106: 1420- 1424

SMITH, N.A., S.P. SINGH, M.-B. WANG, P.A. STOUTJESDIJK, A.G. GREEN AND P.M. WATERHOUSE

Total silencing by intronspliced hairpin RNAs  
Nature 2000; 407: 319- 320

SOANES, D.M., W. SKINNER, J. KEON, J. HARGREAVES AND N.J. TALBOT

Genomics of phytopathogenic fungi and the development of bioinformatic resources  
Mol Plant Microbe Interact 2002; 15 (5): 421- 427

STEIN, N.

Triticeae genomics: advances in sequence analysis of large genome cereal crops  
Chromosome Res 2007; 15: 21- 31

STEWART, C.N. JR. AND L.E. VIA

A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications.  
Biotechniques 1993; 14(5):748- 50

SUSI, P., M. HOHKURI, T. WAHLROOS UND N.J. KILBY

Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms

Plant Mol Biol 2004; 54: 157- 174

THOMAS, S.W., M.A. GLARING, S.W. RASMUSSEN, J.T. KINANE AND R.P. OLIVER

Transcript profiling in the barley mildew pathogen *Blumeria graminis* by serial analysis of gene expression (SAGE)

Mol Plant Microbe Interact 2002; 15 (8): 847- 856

TIJSTERMAN, M., R.F. KETTING AND R.H.A. PLASTERK

The genetics of RNA silencing

Annu Rev Genet 2002; 36: 489- 519

TOMARI, Y. AND P.D. ZAMORE

Perspective: machines for RNAi

Genes & Development 2005; 19: 517- 529

TRAVELLA, S., T.E. KLIMM AND B. KELLER

RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat

Plant Physiol 2006; 142: 6- 20

TUDZYNSKI, P. AND J. SCHEFFER

*Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle

Mol Plant Pathol 2004; 5 (5): 377- 388

VAN KAN, J.A.L.

Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen

Trends Plant Sci 2006; 11(5): 247- 253

VOINNET, O., P. VAIN, S. ANGELL AND D.C. BAULCOMBE

Systemic spread of sequence- specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA

Cell 1998; 95: 177- 187



VOINNET, O.

RNA silencing as a plant immune system against viruses

Trends Genet 2001; 17 (8): 449- 459

WANG, M.B., N.M. UPADHYAYA, R.I.S. BRETTELL AND P.M. WATERHOUSE

Intron-mediated improvement of a selectable marker gene for plant transformation using *Agrobacterium tumefaciens*

J Genet & Breed 1997; 51: 325- 334

WATERHOUSE, P.M., M.W. GRAHAM AND M.-B. WANG

Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA

Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 13959- 13964

WATERHOUSE, P.M., M.-B. WANG AND E.J. FINNEGAN

Role of short RNAs in gene silencing

Trends Plant Sci 2001; 6 (7): 297- 301

WHEELER, D.L., T. BARRETT, D.A. BENSON, S.H. BRYANT, K. CANESE, V. CHETVERNIN, D.M. CHURCH, M. DICUCCIO, R. EDGAR, S. FEDERHEN, L.Y. GEER, Y. KAPUSTIN, O. KHOVAYKO, D. LANDSMAN, D.J. LIPMAN, T.L. MADDEN, D.R. MAGLOTT, J. OSTELL, V. MILLER, K.D. PRUITT, G.D. SCHULER, E. SEQUEIRA, S.T. SHERRY, K. SIROTKIN, A. SOUVOROV, G. STARCHENKO, R.L. TATUSOV, T.A. TATUSOVA, L. WAGNER AND E. YASCHENKO

Database resources of the National Center for Biotechnology Information

Nucleic Acids Res 2007; 35: D5- D12

WICKER, T., N. YAHIAOUI AND B. KELLER

Contrasting rates of evolution in *Pm3* loci from three wheat species and rice

Genetics 2007; 177 (2): 1207- 16

WILCOXON, F.

Individual comparison by ranking methods

Biometrics 1945; 1: 80– 83

WILLIAMS, S.E., P. WOOTTON, H.S. MASON, D.E. ILES, C. PEERS AND P.J. KEMP

siRNA knock-down of c-glutamyl transpeptidase does not affect hypoxic K<sup>+</sup> channel inhibition

Biochem Biophys Res Commun 2004; 314: 63- 68

WOLTER, M., K. HOLLRICHER, F. SALAMINI AND P. SCHULZE-LEFERT

The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype

Mol Gen Genet 1993; 239: 122- 128

WRIGHT, A.J., B.J. THOMAS AND T.L.W. CARVER

Early adhesion of *Blumeria graminis* to plant and artificial surfaces demonstrated by centrifugation

Physiol Mol Plant Pathol 2002; 61: 217- 226

XIA, Y.

Proteases in pathogenesis and plant defence

Cell Microbiol 2004; 6 (10): 905- 913

XU, P., Y. ZHANG, L. KANG, M.J. ROOSSINCK AND K.S. MYSORE

Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants

Plant Physiol 2006; 142: 429- 440

YADAV, B.C., K. VELUTHAMBI AND K. SUBRAMANIAM

Host-generated double-stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection

Mol Biochem Parasitol 2006; 148: 219- 222

YAHIAOUI, N., S. BRUNNER AND B. KELLER

Rapid generation of new powdery mildew resistance genes after wheat domestication

Plant J 2006; 47: 85- 98

YOO, B.-C., F. KRAGLER, E. VARKONYI-GASIC, V. HAYWOOD, S. ARCHER-EVANS, Y.M. LEE,  
T.J. LOUGH AND W.J. LUCAS

A systemic small RNA signalling system in plants

Plant Cell 2004; 16: 1979- 2000

ZHANG, Z. AND S.J. GURR

Expression and sequence analysis of the *Blumeria graminis* mitogen-activated protein  
kinase genes, *mpk1* and *mpk2*

Gene 2001; 266: 57- 65

ZHANG, Z., C. HENDERSON, E. PERFECT, T.L.W. CARVER, B.J. THOMAS, P. SKAMNIOTI AND  
S.J. GURR

Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality

Mol Plant Pathol 2005; 6 (5): 561- 575

ZHONG, X., H. HOU AND W. QIU

Integrity of nonviral fragments in recombinant tomato bushy stunt virus and defective  
interfering RNA is influenced by silencing and the type of inserts

MPMI 2005; 18 (8): 800- 807

ZIEROLD, U.

Transkriptomanalyse mehltaubefallener Gerstenepidermis in Abhängigkeit des *mlo*-  
Resistenzgenes

Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg 2005

ZIEROLD, U., U. SCHOLZ AND P. SCHWEIZER

Transcriptome analysis of *mlo*-mediated resistance in the epidermis of barley

Mol Plant Pathol 2005; 6 (2): 139– 151

ZIMMERMANN, G., H. BÄUMLEIN, H.-P. MOCK, A. HIMMELBACH AND P. SCHWEIZER

The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in  
basal host resistance

Plant Physiol 2006; 142: 181- 192

## 6. Anhang

### 6.1 blast-Resultate

In den folgenden Tabellen sind die blast-Resultate, die zur Klassifizierung der Kandidatengene verwendet wurden, aufgelistet. Für Bezeichnungen der verschiedenen Organismen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Organismus	Abkürzung	Organismus	Abkürzung
<i>Aegilops speltoides</i>	As	<i>Magnaporthe grisea</i>	Mag
<i>Agrostis capillaris</i> pilzinfiziert	AcX	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Mg
<i>Aspergillus niger</i>	An	<i>Nicotiana tabacum</i>	Nt
<i>Blumeria graminis</i>	Bg	<i>Oryzia latipes</i>	Ol
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Bf	<i>Oryzia sativa</i>	Os
<i>Brachypodium</i> <i>distachyon</i>	Bd	<i>Phytophthora infestans</i>	Pi
<i>Cladosporium fulvum</i>	Cf	<i>Phytophthora sojae</i>	Ps
<i>Colletotrichum trifolii</i>	Ct	<i>Plasmodium falciparum</i>	Pf
<i>Corynascus</i> <i>heterothallicus</i>	Ch	<i>Saccharum officinarum</i>	So
<i>Cryphonectria</i> <i>parasitica</i>	Cp	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Ss
<i>Fusarium</i> <i>sporotrichioides</i>	Fs	<i>Secale cereale</i>	Sc
<i>Gibberella zeae</i>	Gz	<i>Triticum aestivum</i>	Ta
<i>Hordeum vulgare</i>	Hv	<i>Triticum aestivum</i> pilzinfiziert	TaX
<i>Hordeum vulgare</i> pilzinfiziert	HvX	<i>Ustilago maydis</i>	Um
<i>Leymus chinensis</i>	Lc	<i>Verticillium dahliae</i>	Vd
<i>Lolium multiflorum</i> pilzinfiziert	LmX	<i>Zea mays</i>	Zm

**Tab. 6.1: blast-Resultate für 5'-EST-Sequenz**

Die Tabelle zeigt die drei megablast-Resultate von NCBI mit den niedrigsten e-Werten und das blastN-Resultat von Cogeme mit dem niedrigsten e-Wert für alle 5'-EST-Sequenzen bzw. 3'-EST-Sequenzen falls keine 5'-EST-Sequenz vorhanden war. Eine Klassifizierung der Sequenz als pilzliches oder pflanzliches Gen wurde in einigen Fällen vorgenommen.

Accession- Nummer	EST-ID	NCBI						Cogeme				
		erstes Resultat		zweites Resultat		drittes Resultat		Organismus	e-Wert	Organismus	e-Wert	Klasse
		Organismus	e-Wert	Organismus	e-Wert	Organismus	e-Wert					
CD053363	HO04M06		kein	Resultat			Vd	0.053		?		
CD053367	HO04M11	HvX	0	HvX	0	HvX	HvX	e-94	Bg	4e-86	Pilz	
CD053473	HO04H06	HvX	0	Ta	0	Ta	Mag	0	5e-05	Pflanze		
CD053484	HO04F20	Hv	0	Hv	0	HvX	Cf	0	0.016	Pflanze		
CD053551	HO04C16	Hv	0	Hv	0	Hv	kein	0	Resultat	Pflanze		
CD053606	HO04A11	Bg	9e-150				Bg	e-147		Pilz		
CD053626	HO04A02	HvX	0	Hv	0	HvX	kein	e-158	Resultat	Pflanze		
CD053634	HO03N19	HvX	0	Tm	0	Ta	kein	0	Resultat	Pflanze		
CD053640	HO03O03	Hv	0	HvX	0	HvX	kein	0	Resultat	Pflanze		
CD053651	HO03O15	HvX	0	Bg	2e-175	Bg	Bg	5e-117	e-172	Pilz		
CD053679	HO03M02	TaX	e-177	Hv	6e-171	HvX	kein	8e-165	Resultat	Pflanze		
CD053680	HO03M03	TaX	0	TaX	0	HvX	kein	e-153	Resultat	?		
CD053728	HO03K07	Ta	3e-70				kein	Resultat	Resultat	Pflanze		
CD053729	HO03K08	HvX	0	Ta	0	Ta	kein	e-173	Resultat	Pflanze		
CD053768	HO03I07	Hv	0	Hv	0	HvX	kein	0	Resultat	Pflanze		

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD053795	HO03G05	Ta	0	HvX	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze
CD053820	HO03F22	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Gz	2e-05	Pflanze
CD053877	HO03B04	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CD053913	HO03C22	Hv	0	HvX	0	Hv	0	Fs	0.061	Pflanze
CD053942	HO03A06	Hv	0	Ta	0	Ta	0	Fs	6e-05	Pflanze
CD053965	HO02P04	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Bg	0.049	Pflanze
CD053972	HO02O10	OI	0.002					Gz	0.001	?
CD054089	HO02I03	Hv	0	Hv	0	HvX	0	kein	Resultat	Pflanze
CD054120	HO02G09	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CD054122	HO02G11	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD054201	HO02B19	HvX	0	Bg	7e-145	HvX	9e-119	Bg	e-145	Pilz
CD054204	HO02B23	HvX	0	HvX	0	Hv	0	Ps	3e-56	Pflanze
CD054214	HO02C11	HvX	0	HvX	0	Bg	0	Bg	0	Pilz
CD054228	HO02B06		kein	Resultat				Ss	0.004	?
CD054246	HO02A01	Ta	0	Ta	0	HvX	0	kein	Resultat	Pflanze
CD054247	HO02A02		kein	Resultat				Bg	2e-04	?
CD054282	HO01P12	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Cp	0.013	?
CD054291	HO01O12	Hv	7e-69	Hv	7e-69	Hv	7e-69	kein	Resultat	Pflanze

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD054355	HO01K17	Hv	0	Hv	0	HvX	9e-99	kein	Resultat	Pflanze
CD054401	HO01I09	Hv	0	Hv	0	HvX	0	Ps	0,013	Pflanze
CD054482	HO01D14	Ta	0	Hv	0	Ta	0	Mg	0,013	Pflanze
CD054488	HO01D20	HvX	0	TaX	0	TaX	0	Bg	e-175	Pilz
CD054508	HO01C21	Bg	6e-156	Bg	7e-145	HvX	6e-136	Bg	e-136	Pilz
CD054536	HO01C15	Hv	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	Pflanze
CD054554	HO01A19	Hv	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	Pflanze
CD054644	HO06N01	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CD054654	HO06N14	Hv	0	HvX	8e-169	HvX	5e-106	Mag	0,041	Pflanze
CD054698	HO07B06	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Um	e-18	Pflanze
CD054714	HO07B22	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Bg	0	Pilz
CD054762	HO07E08	HvX	0	Bg	2e-151	Bg		Bg	e-158	Pilz
CD054787	HO07F11	HvX	0	HvX	0	Ta	0	Ps	2e-29	Pflanze
CD054800	HO07F18	Hv	3e-33	Ta	3e-13	Ta	3e-08	kein	Resultat	Pflanze
CD054835	HO07H15	Hv	0	Hv	0	TaX	0	Um	e-05	Pflanze
CD054839	HO07H20	Hv	0	Hv	0	HvX	0	Mag	0,012	Pflanze
CD054848	HO07I05	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Mag	0,053	Pflanze
CD054886	HO07K06	Hv	0	Hv	0	TaX	0	kein	Resultat	Pflanze

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD054887	HO07I09	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD054892	HO07I16	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Bg	e-94	Pilz
CD054932	HO07L24	HvX	e-162	Bg	3e-44					Bg	e-48	?
CD054964	HO07N12	HvX	0	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Gz	5e-85	Pflanze
CD055054	HO08F24	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Fs	0,052	Pflanze
CD055073	HO08H24	Ta	2e-26	Zm	3e-14	Zm	3e-14	Zm	3e-14	kein	Resultat	Pflanze
CD055083	HO08I11	Bg	0	Bg	9e-139	LmX	2e-75	LmX	2e-75	Bg	0	Pilz
CD055099	HO08G22	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD055120	HO08J10	HvX	0	TaX	0	HvX	0	HvX	0	Bg	0	Pilz
CD055129	HO08J20	TaX	0	TaX	0	TaX	0	TaX	0	Bg	e-177	Pilz
CD055136	HO08K09	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Ps	3e-09	Pflanze
CD055157	HO08B09	HvX	0	Ta	3e-143	Nt	4e-142	Nt	4e-142	kein	Resultat	Pflanze
CD055171	HO08B23	Bg	0	Bg	0	Bg	0	Bg	0	Bf	0	Pilz
CD055204	HO08D16		kein	Resultat						Bg	e-34	?
CD055238	HO08F05	Hv	0	Ta	0	Ta	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze
CD055315	HO08O05	HvX	0	HvX	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD055316	HO08O06	Bg	0	Bg	3e-173	Bg	7e-170	Bg	7e-170	Bg	0	Pilz
CD055325	HO08O16	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Ps	2e-04	Pflanze



Tab. 6.1: Fortsetzung

CD055348	HO08P18	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Fs	0,045	?
CD055387	HO09B11	HvX	3e-83	Bg	e-81	TaX	2e-79	Bg	2e-83	Pilz
CD055393	HO09B17	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Cp	0,044	?
CD055418	HO09C20		kein	Resultat				Ss	2e-04	?
CD055422	HO09C24	Bg	2e-119	HvX	2e-04			Bg	e-115	Pilz
CD055443	HO09E02	Hv	0	Hv	0	TaX	0	Ps	0,012	Pflanze
CD055449	HO09E08	Pf	e-29	Pf	e-29	Pi	e-04	Bf	7e-17	?
CD055456	HO09E15	TaX	0	TaX	0	TaX	e-133	Bf	2e-90	Pilz
CD055468	HO09F06	HvX	0	HvX	0	TaX	3e-178	Gz	0,003	?
CD055469	HO09F07	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD055473	HO09F12	HvX	2e-116					kein	Resultat	?
CD055487	HO09G04	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD055491	HO09G08	HvX	0	TaX	0	TaX	0	Bg	e-140	Pilz
CD055505	HO09G22	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Mag	0,045	Pflanze
CD055528	HO09H22	HvX	2e-148	HvX	2e-132	Hv	8e-132	Ps	0,025	Pflanze
CD055533	HO09I03	Bg	0	Bg	0	Bg	0	Bg	0	Pilz
CD055536	HO09I06	Hv	0	Hv	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze
CD055538	HO09I08	HvX	0	Hv	0	HvX	0	kein	Resultat	Pflanze

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD055589	HO09K14	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Mag	9e-04	Pflanze
CD055599	HO09L02	Hv	5e-123	Hv	5e-123	Hv	5e-123	Hv	5e-123	Hv	5e-123	kein	Resultat	Pflanze
CD055617	HO09L22	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Cp	0,01	?
CD055634	HO09M16	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Ta	0	Fs	8e-13	Pflanze
CD055661	HO09N23	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Mag	0,04	Pflanze
CD055711	HO10A09	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Ta	0	Mg	0,052	Pflanze
CD055713	HO10A11	Hv	0	Hv	0	Hv	0	HvX	0	HvX	0	Ss	0,051	Pflanze
CD055734	HO10B14	Ta	0	Hv	0	Hv	0	TaX	0	TaX	0	kein	Resultat	Pflanze
CD055753	HO10C11	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Bg	e-132	Pilz
CD055756	HO10C14	HvX	4e-137	HvX	e-106	HvX	e-106	HvX	e-27	HvX	e-27	kein	Resultat	?
CD055803	HO10E18	Ta	0	HvX	9e-154	HvX	9e-154	Ta	5e-112	Ta	5e-112	Bg	7e-26	Pflanze
CD055806	HO10E22	Hv	0	Hv	8e-99	Hv	8e-99	HvX	2e-54	HvX	2e-54	Ps	0,009	Pflanze
CD055827	HO10F19	HvX	4e-108	HvX	2e-95	HvX	2e-95	HvX	e-88	HvX	e-88	Bg	3e-68	Pilz
CD055829	HO10F22	HvX	0	HvX	0	TaX	0	TaX	0	TaX	0	Um	0,053	?
CD055845	HO10G17	Hv	0	HvX	0	HvX	0	Ta	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze
CD055847	HO10G20	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CD055866	HO10H15	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CD055931	HO10K20	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD055955	HO10L16		kein	Resultat					Bf	7e-04	?
CD055977	HO10M15	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	kein	Resultat	Pflanze
CD055978	HO10M16	Hv	0	TaX	2e-90	TaX	2e-90	Ps	Ps	0,003	Pflanze
CD055983	HO10M21	Hv	0	HvX	0	HvX	0	kein	kein	Resultat	Pflanze
CD056000	HO10N20	Hv	0	As	0	Sc	0	Mag	Mag	0,049	Pflanze
CD056025	HO10O17	HvX	0	An	2e-36	An	e-29	Mg	Mg	0,055	?
CD056032	HO10P01	Bg	7e-156	Bg	2e-26			Bg	Bg	e-157	Pilz
CD056058	HO11A09	HvX	0	HvX	0	HvX	2e-151	kein	kein	Resultat	?
CD056085	HO11C08	Hv	0	Hv	0	HvX	0	Um	Um	0,054	Pflanze
CD056154	HO11F10	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	kein	Resultat	Pflanze
CD056192	HO11H08	Ta	0	Ta	0	Ta	0	kein	kein	Resultat	Pflanze
CD056200	HO11H17	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Fs	Fs	0,051	?
CD056235	HO11J15	HvX	4e-172	HvX	4e-172	HvX	4e-172	Ps	Ps	0,048	?
CD056296	HO11M23	Hv	0	HvX	0	Hv	0	Mag	Mag	0,052	Pflanze
CD056310	HO11N14	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Mag	Mag	0,003	?
CD056316	HO11N21	Bg	0	HvX	4e-118	Bg	4e-113	Bg	Bg	0	Pilz
CD056326	HO11O07	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Cp	Cp	3e-12	Pflanze
CD056330	HO11O12	Hv	0	Hv	0	HvX	0	Gz	Gz	0,052	Pflanze

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD056338	HO11O24	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Mag	0,052	Pflanze
CD056353	HO11P16	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Ta	0	Um	0,052	Pflanze
CD056362	HO12A01	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Ps	5e-05	Pflanze
CD056393	HO12B19	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Mag	0,012	Pflanze
CD056404	HO12C06	HvX	6e-112	HvX	6e-112	Hv	6e-112	Hv	6e-112	Ss	0,074	Pflanze
CD056444	HO12E03	Hv	0	HvX	0	HvX	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze
CD056476	HO12F18	Hv	0	HvX	0	HvX	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze
CD056482	HO12G01	Hv	e-62	Hv	e-62	Hv	e-62	Hv	e-62	kein	Resultat	Pflanze
CD056524	HO12I08	Hv	0	Hv	0	Hv	0	TaX	3e-179	kein	Resultat	Pflanze
CD056525	HO12I10	Ta	6e-151	Ta	6e-151	TaX	6e-151	TaX	5e-102	Mag	0,053	Pflanze
CD056548	HO12J07	Ta	3e-173							kein	Resultat	Pflanze
CD056599	HO12L04	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Um	8e-04	Pflanze
CD056603	HO12L20	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CD056620	HO12M17	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Hv	0	Cp	e-142	Pflanze
CD056624	HO12M23	AcX	e-176	AcX	e-176	AcX	e-176	AcX	e-176	Um	0,042	?
CD056658	HO12N23	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD056673	HO12P05	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD056676	HO12P08	Ta	0	Ta	0	Ta	0	Ta	0	Cf	0,048	Pflanze

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD056679	HO12P14	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD056682	HO12P18	Hv	0	HvX	5e-162	HvX	6e-121	HvX	kein	kein	Resultat	Pflanze
CD056766	HO13D15	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	kein	kein	Resultat	?
CD056824	HO13G03	TaX	4e-178	HvX	e-173	HvX	kein	HvX	kein	kein	Resultat	?
CD056830	HO13G09	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	Fs	5e-23	?	?
CD056846	HO13H02	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	Bg	0	Pilz	?
CD056859	HO13H19	Hv	8e-142	Hv	4e-140	Hv	2e-138	TaX	kein	kein	Resultat	Pflanze
CD056864	HO13H24	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	kein	kein	Resultat	?
CD056875	HO13I11	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Hv	Ps	0,009	Pflanze	?
CD056876	HO13I12	HvX	2e-174	HvX	kein	HvX	kein	Hv	kein	Resultat	?	?
CD056916	HO13K06	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	Mg	e-146	Pflanze	?
CD056956	HO13M01	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Hv	kein	kein	Resultat	Pflanze
CD056958	HO13M03	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	Mag	0,003	Pflanze	?
CD056968	HO13M13	HvX	0	Hv	0	Hv	0	HvX	Ps	8e-04	Pflanze	?
CD056969	HO13M14	Hv	0	HvX	0	Hv	0	Hv	Mag	0,041	Pflanze	?
CD056970	HO13M15	Ta	0	Ta	0	Ta	0	Ta	kein	kein	Resultat	Pflanze
CD056972	HO13M17	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Ta	kein	kein	Resultat	Pflanze
CD056975	HO13M20	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	Ps	0,033	?	?

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD057020	HO13O22	Cp	6e-55	Cp	2e-39		Bf	6e-38	Pilz
CD057078	HO14B14	Hv	0	HvX	0	HvX	kein	Resultat	Pflanze
CD057126	HO14D18	Hv	0	Hv	0	Hv	kein	Resultat	Pflanze
CD057128	HO14D20	HvX	0	HvX	0	HvX	kein	Resultat	?
CD057130	HO14D22	LmX	0	Bg	5e-107	HvX	Bg	e-109	Pilz
CD057139	HO14E07	HvX	0	HvX	0	HvX	Ps	0,047	?
CD057145	HO14E14	Hv	e-77	Hv	2e-47	HvX	kein	Resultat	Pflanze
CD057149	HO14E18	Ta	4e-151	Ta	2e-145	Ta	kein	Resultat	Pflanze
CD057158	HO14F03	HvX	0	Hv	0	Hv	kein	Resultat	Pflanze
CD057176	HO14F24	Hv	0	Hv	0	Hv	kein	Resultat	Pflanze
CD057204	HO14H07	Hv	0	Hv	0	So	Mag	0,048	Pflanze
CD057214	HO14H18	HvX	0	HvX	0	Ta	kein	Resultat	Pflanze
CD057220	HO14I02	Hv	0	HvX	0	Hv	kein	Resultat	Pflanze
CD057227	HO14I10	Hv	0	Hv	0	HvX	kein	Resultat	Pflanze
CD057243	HO14J02	Hv	e-103	Hv	e-103	Hv	Bg	0,072	Pflanze
CD057248	HO14J07	Hv	0	Hv	0	Hv	kein	Resultat	Pflanze
CD057269	HO14K06	HvX	0	TaX	0	HvX	Bg	7e-69	Pilz
CD057270	HO14K07	Hv	0	Hv	0	Hv	Ct	e-5	Pflanze

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD057271	HO14K08	HvX	0	HvX	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057280	HO14K19	Ta	0	Ta	0	Ta	3e-169	kein	Resultat	Pflanze
CD057283	HO14K22	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CD057327	HO14M23	Ta	0	Ta	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057347	HO14N21	HvX	0	HvX	0	TaX	5e-176	Bg	e-140	Pilz
CD057373	HO14P02	HvX	0	HvX	0	Hv	3e-163	kein	Resultat	Pflanze
CD057376	HO14P06	HvX	3e-173	HvX	4e-126	HvX	0	kein	Resultat	?
CD057390	HO14P21	Hv	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057434	HO15C06		kein	Resultat				kein	Resultat	?
CD057435	HO15C07	Hv	e-175	HvX	7e-173	Hv	9e-172	kein	Resultat	Pflanze
CD057490	HO15E16	HvX	0	HvX	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057523	HO15F23	Hv	0	HvX	0	HvX	0	Ps	0,003	Pflanze
CD057539	HO15G24	Hv	0	TaX	0	Ta	0	Fs	0,044	Pflanze
CD057572	HO15I12	Hv	0	Hv	0	HvX	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057574	HO15I04	Hv	0	Hv	0	HvX	0	Fs	0,052	Pflanze
CD057580	HO15I23	HvX	e-67	Bg	3e-58	Bg	3e-58	Bg	6e-63	Pilz
CD057592	HO15J13		kein	Resultat				Gz	0,036	?
CD057607	HO15K08	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD057645	HO15M04	HvX	0	HvX	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057646	HO15M05	Hv	2e-169	Hv	2e-169	Hv	6e-169	Ps	2e-12	Pflanze
CD057664	HO15N01	HvX	e-171	HvX	e-171	HvX	e-171	kein	Resultat	?
CD057671	HO15N08	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057687	HO15O04	Ta	0	Ta	0	TaX	0	Mag	0,003	Pflanze
CD057701	HO15O20	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057707	HO15P02	TaX	0	Ta	0	Ta	0	Ps	0,012	Pflanze
CD057714	HO15P11	Hv	3e-168	Hv	3e-133	HvX	6e-100	Gz	0,032	Pflanze
CD057732	HO16A19	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057740	HO16C09	Hv	0	Ta	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057743	HO16C19	HvX	0	Hv	0	HvX	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057758	HO16G03	Bg	3e-150	Bg	3e-135	HvX	3e-70	Bg	e-164	Pilz
CD057763	HO16G15	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CD057772	HO16I09	Hv	e-51	Ta	8e-44	Bd	2e-39	Bg	7e-07	Pflanze
CD057794	HO16O01	Bg	7e-156	HvX	7e-151	HvX	5e-132	Bg	e-144	Pilz
CD057826	HO06L17	Hv	0	Hv	0,0	Hv	e-176	kein	Resultat	Pflanze
CD057837	HO06M04	Os	5e-71	Os	e-47	Os	3e-38	kein	Resultat	Pflanze
CD057844	HO06L05	HvX	0	Lc	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze



Tab. 6.1: Fortsetzung

CD057849	HO06K23	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Gz	0,039	Pflanze
CD057851	HO06K04	Hv	0	Hv	0	HvX	0	HvX	0	Mg	0,045	Pflanze
CD057871	HO06J04	Hv	0	Ta	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057887	HO06J21	HvX	0	Hv	0	HvX	0	HvX	0	Ps	0,014	Pflanze
CD057905	HO06G20	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057928	HO06H22	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Ps	0,039	?
CD057932	HO06F18	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057941	HO06G04	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze
CD057946	HO06G10	HvX	0	Hv	0	HvX	0	HvX	0	Ps	0,044	Pflanze
CD057965	HO06F11	Bg	e-126	Bg	3e-122	Bg	7e-109	Bg	7e-109	Bg	e-111	Pilz
CD057966	HO06F12	HvX	5e-149	Hv	5e-149	Hv	5e-149	Hv	5e-149	kein	Resultat	Pflanze
CD057973	HO06D23	HvX	0	Hv	0	Hv	4e-167	HvX	4e-167	Ps	0,011	Pflanze
CD058010	HO06D03	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Ps	0,044	Pflanze
CD058018	HO06C21	HvX	8e-94	TaX	5e-91	TaX	5e-66	TaX	5e-66	Bf	9e-34	?
CD058023	HO06C14	HvX	0	HvX	0	HvX	2e-17	Ch	2e-17	Bf	e-08	?
CD058042	HO06C10	HvX	0	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Gz	3e-09	?
CD058061	HO06B11	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Hv	0	Mg	3e-15	Pflanze
CD058067	HO06B17	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD058111	HO05O18	Hv	0	HvX	0	Hv	0	Ps	0.054	Pflanze
CD058116	HO05N22	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CD058171	HO05L01	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD058180	HO05L15	HvX	3e-29	HvX	3e-29	HvX	3e-29	Mag	2e-07	?
CD058184	HO05K04	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Gz	2e-16	Pflanze
CD058204	HO05I06	HvX	0	Bg	0	HvX	7e-151	Bg	e-179	Pilz
CD058210	HO05I14	Bg	2e-49	Bg	2e-49	Bg	8e-49	Bg	6e-47	?
CD058262	HO05F21	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Bg	0	Pilz
CD058276	HO05G12	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CD058282	HO05G21	kein	Resultat	Resultat	kein	Resultat	?	Ct	3e-07	?
CD058283	HO05G22	HvX	0	TaX	0	HvX	2e-174	Bg	8e-93	Pilz
CD058302	HO05F03	HvX	0	Hv	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze
CD058348	HO05C04	Ta	0	Ta	0	Ta	0	Mag	0.003	Pflanze
CD058358	HO05C14	HvX	6e-108	Hv	6e-108	Hv	6e-108	Um	0.022	Pflanze
CD058359	HO05C15	Hv	0	HvX	0	Hv	0	Mg	3e-07	Pflanze
CD058363	HO05A19	Hv	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	Pflanze
CD058368	HO05A24	Hv	3e-160	Hv	2e-136	Ta	3e-124	kein	Resultat	Pflanze
CD058377	HO05A16	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Bf	0.061	?

Tab. 6.1: Fortsetzung

CD058416	HO04P08	Hv	0	HvX	0	Ta	0	Cf	6e-05	Pflanze
CD058448	HO04M23	HvX	2e-121	HvX	2e-121	HvX	2e-121	kein	Resultat	?
CD058506	HO06P13	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CF542226	HO40A12	HvX	3e-121	HvX	4e-85	Hv	4e-85	kein	Resultat	Pflanze
CF542227	HO40A10	Hv	0	Hv	0	HvX	0	kein	Resultat	Pflanze
CF542228	HO40A03	Hv	0	Hv	0	Hv	0	Bf	0,054	Pflanze
CF542230	HO40A01	Hv	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	Pflanze
CF542232	HO40A05	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Ps	0,015	?
CF542235	HO40A04	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CF542246	HO40A08	HvX	3e-143	HvX	3e-143	HvX	3e-143	kein	Resultat	?
CK565946	HO01P21	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Mg	0.016	Pflanze
CK566253	HO02P09	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Mg	0.062	Pflanze
CK566336	HO03D23	Hv	0	Hv	0	Hv	0	kein	Resultat	Pflanze
CK566996	HO05F12	HvX	0	Hv	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze
keine für 5'	HO01B13	HvX	0	Hv	0	Hv	0	Cp	0.047	Pflanze
keine für 5'	HO01D13	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Ps	2e-05	?

**Tab. 6.2: blast-Resultate für 3'-EST-Sequenz**

Die Tabelle zeigt die drei megablast-Resultate von NCBI mit den niedrigsten e-Werten und das blastN-Resultat von Cogeme mit dem niedrigsten e-Wert für alle 3'-EST-Sequenzen der Kandidaten, die mittels des 5'-EST-Sequenz nicht klassifiziert werden konnten. Eine Klassifizierung der Sequenz als pilzliches oder pflanzliches Gen wurde in einigen Fällen vorgenommen.

Accession- Nummer	EST-ID	NCBI						Cogeme			
		erstes Resultat		zweites Resultat		drittes Resultat		Organismus	e-Wert	Klasse	
		Organismus	e-Wert	Organismus	e-Wert	Organismus	e-Wert				
kein EST	HO01D13									?	
CK565938	HO01P12	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Bg	0	Pilz	
CK565951	HO02A02		kein	Resultat				Bg	3e-56	Pilz	
CK565974	HO02B06	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?	
CK566079	HO02G09	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?	
CK566233	HO02O10	Bg	0	Bg	0	TaX	6e-62	Bg	0	Pilz	
CK566281	HO03B04	TaX	2e-150	Ta	3e-149	TaX	4e-118	kein	Resultat	Pflanze	
CK566497	HO03M03	TaX	0	TaX	0	Hv	2e-157	kein	Resultat	Pflanze	
CK566826	HO04M06		kein	Resultat				kein	Resultat	?	
CK566838	HO04M23	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?	
CK566912	HO05A16	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Bf	0,075	?	
CK567020	HO05G21		kein	Resultat				kein	Resultat	?	
CK567052	HO05I14		kein	Resultat				kein	Resultat	?	
kein EST	HO05L15									?	
CK567157	HO05N22	Ta	0	Ta	0	Ta	0	kein	Resultat	Pflanze	

Tab. 6.2: Fortsetzung

CK567251	HO06C14	HvX	0	HvX	0	Ch	8e-41	Bf	2e-08	?
CK567256	HO06C21	TaX	0	Bg	e-78			Bg	e-70	Pilz
CK567358	HO06H22	HvX	0	Hv	0	HvX	0	Ps	0,074	Pflanze
CK567460	HO06N01	HvX	3e-177	HvX	3e-176	HvX	3e-176	kein	Resultat	?
kein EST	HO06P13									?
CK567743	HO07L24	HvX	0	Bg	0	Bg	0	Bg	0	Pilz
CK567886	HO08D16	Bg	7e-146					Bg	e-125	Pilz
CK568126	HO08P18	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Fs	0,048	?
CK568160	HO09B17	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Mg	8e-48	?
kein EST	HO09C20									?
CK568209	HO09E08		kein	Resultat				Mag	4e-09	?
CK568225	HO09F06	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Bg	0	Pilz
CK568231	HO09F12	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CK568352	HO09L22	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
kein EST	HO10C14									?
kein EST	HO10F22									?
CK568558	HO10G20	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
kein EST	HO10H15									?



Tab. 6.2: Fortsetzung

CK570007	HO15C06		kein	Resultat				Bg	0,062	?
CK570147	HO15J13	Bg	0	Bg	8e-175	LmX	3e-90	Bg	0	Pilz
CK570162	HO15K08	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
CK570215	HO15N01	HvX	0	HvX	0	HvX	0	kein	Resultat	?
DN189828	HO16G15	HvX	0	HvX	0	HvX	0	Mag	0,075	?
kein EST	HO40A04									?
kein EST	HO40A05									?
kein EST	HO40A08									?

**Tab. 6.3: megablast-Resultate ohne Berücksichtigung von infizierten Pflanzenmaterial**

Resultate des megablast bei NCBI. Es wurden nur die blast-Resultate aus nicht mit pilzinfizierten Datenbanken aufgelistet

<i>Accession-Nummer</i>	EST-ID	Organismus	e-Wert	Klasse
CD053363	HO04M06	kein	Resultat	?
CK566826	HO04M06	kein	Resultat	?
CD054120	HO02G09	Hv	0	Pflanze
CD054228	HO02B06	kein	Resultat	?
CK565974	HO02B06	Hv	0	Pflanze
CD054481	HO01D13	Ta	e-168	Pflanze
CD054644	HO06N01	Hv	3,00E-127	Pflanze
CD055348	HO08P18	Hv	0	Pflanze
CD055393	HO09B17	Hv	0	Pflanze
CD055418	HO09C20	kein	Resultat	?
CD055449	HO09E08	Pf	e-29	?
CK568209	HO09E08	kein	Resultat	?
CD055473	HO09F12	kein	Resultat	?
CK568231	HO09F12	Hv	e-146	Pflanze
CD055617	HO09L22	Hv	0	Pflanze
CD055756	HO10C14	kein	Resultat	?
CD055829	HO10F22	Ta	0	Pflanze
CD055847	HO10G20	Hv	0	Pflanze
CD055866	HO10H15	Hv	0	Pflanze
CD055955	HO10L16	kein	Resultat	?
CD056025	HO10O17	An	2,00E-36	?
CK568708	HO10O17	kein	Resultat	?
CD056058	HO11A09	Ta	2,00E-91	Pflanze
CD056200	HO11H17	Hv	0	Pflanze
CD056235	HO11J15	Hv	4,00E-167	Pflanze
CD056624	HO12M23	Ta	2,00E-174	Pflanze
CD056766	HO13D15	Ta	0	Pflanze
CD056824	HO13G03	kein	Resultat	?
CK569472	HO13G03	kein	Resultat	?
CD056830	HO13G09	Hv	0	Pflanze
CD056864	HO13H24	Hv	0	Pflanze
CD056876	HO13I12	kein	Resultat	?
CD056975	HO13M20	Hv	0	Pflanze
CD057128	HO14D20	Hv	0	Pflanze
CD057283	HO14K22	Hv	0	Pflanze
CD057376	HO14P06	kein	Resultat	?
CK569955	HO14P06	Hv	0	Pflanze
CD057434	HO15C06	kein	Resultat	?
CK570007	HO15C06	kein	Resultat	?
CD057607	HO15K08	Hv	0	Pflanze
CD057664	HO15N01	Hv	7,00E-170	Pflanze
CD057763	HO16G15	Ta	9,00E-113	Pflanze
CD058023	HO06C14	Ch	2,00E-17	?
CK567251	HO06C14	Ch	9,00E-41	?
CD058180	HO05L15	Hv	4,00E-27	Pflanze
CD058210	HO05I14	Bg	2,00E-49	?
CK567052	HO05I14	kein	Resultat	?
CD058282	HO05G21	kein	Resultat	?
CK567020	HO05G21	kein	Resultat	?
CD058377	HO05A16	Ta	0	Pflanze
CD058448	HO04M23	Hv	2,00E-121	Pflanze
CD058506	HO06P13	Ta	0	Pflanze
CF542232	HO40A05	Hv	0	Pflanze
CF542235	HO40A04	Hv	0	Pflanze
CF542246	HO40A08	Hv	3,00E-143	Pflanze



## 6.2 Sequenzen der verwendeten Primer

**Tab. 6.4: Sequenzen der Primer, die für die Erstellung der RNAi-Konstrukte des TIGS-Systems verwendet wurden**

In der Tabelle sind die Sequenzen der Primer aufgelistet, die für die Erstellung der RNAi-Konstrukte verwendet wurden. Die Sequenz des häufig verwendeten 5'-Primers MVR 26 lautet: CTC ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG AG. Zusätzlich ist die ID der Plasmid-DNA, die in der PCR als *Template* verwendet wurde, aufgelistet.

Konstrukt-ID	Template	5'-Primer	3'-Primer
HIGS 1.1	HO04M06	MVR 26	ACC TTT TCC TTC TCG CGT TG
HIGS 2.1	HO04M11	MVR 26	GTC GAT TCG GTT TCA GCA GC
HIGS 3.1	HO04A11	MVR 26	GCA CCA GAG TGA TTC CCA GA
HIGS 4.1	HO02B19	MVR 26	TAC ACC TGC GAC CCA TTT CC
HIGS 5.1	HO02C11	MVR 26	AGG AGC TTT AGC ATC ACG GG
HIGS 6.1	HO01D20	MVR 26	CCG GAT GTT CAG TTT CTT GCC
HIGS 7.1	HO01C21	MVR 26	GTG ATT CCC GTT GCA CTC CT
HIGS 8.1	HO07B22	MVR 26	CGC CAA GTT CCT CTT CGA TT
HIGS 9.1	HO07E08	MVR 26	CAG CAC GAT CAT GGT ACA CG
HIGS 10.1	HO07I16	MVR 26	ACC TGC TCA ACT CCA TTC CC
HIGS 11.1	HO08I11	MVR 26	TGG ATA CAT CTC CCT TGC CA
HIGS 12.1	HO08J10	MVR 26	GAG CCG AAA TGA CAA CCC TT
HIGS 13.1	HO08J20	MVR 26	CAT GAT CAA GGG TGG GTG AC
HIGS 14.1	HO08B23	MVR 26	GCT GAA TTA CCA TTG CGG TG
HIGS 15.1	HO08O06	MVR 26	ATG CCC AGA CGA ATG TTT GA
HIGS 16.1	HO09B11	MVR 26	ATT ACG GTG CAT CCT TGC CT
HIGS 17.1	HO09C20	MVR 26	TAT CTA TGG CGT CGG ACG AA
HIGS 18.1	HO09C24	MVR 26	TGG CGT AAT TAC TCG CCT CA
HIGS 19.1	HO09G08	MVR 26	ATC ATT GGG GGT GTT GCT TT
HIGS 20.1	HO09I03	MVR 26	TGA CCC AGC CTA GAC CAG TG
HIGS 21.1	HO10C11	MVR 26	AGC ATG ATC GGC AAA TTT CA
HIGS 22.1	HO10F19	MVR 26	CCG GCA TAG TGA CTC CAT TG
HIGS 23.1	HO10L16	MVR 26	GAT GGT CTT GGG AGC CAA CT
HIGS 24.1	HO10P01	MVR 26	CTG CTA CCA TGG TTC GGA TG
HIGS 25.1	HO11N21	MVR 26	CCG CAA ATG CGT CTA TTG TC
HIGS 25.2	HO09P14	MVR 26	CCG CAA ATG CGT CTA TTG TC
HIGS 25.3	HO11N21	MVR 26	CGC TCG TCA TCA GGA CCA CAG TTC
HIGS 25.4	HO14N04	MVR 26	ATC CAG TTC CTG TAA GAC CAG
HIGS 26.1	HO13G03	MVR 26	GAT CTT TTT GGG CGG CAT AC
HIGS 27.1	HO13I12	MVR 26	TTG AGA ATT GGC GCA AAC AT
HIGS 28.1	HO13O22	MVR 26	CAG GTG GAC GAC GTA GGA GA
HIGS 29.1	HO14D22	MVR 26	CGC TGG GTC ATC TTG ACT GT
HIGS 30.1	HO14K06	MVR 26	GCC GAG CAT AGT CTG AAC GA
HIGS 31.1	HO14N21	MVR 26	CTC GAA TTT GCC GAG AAG GT
HIGS 32.1	HO15I23	MVR 26	ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG
HIGS 33.1	HO16G03	MVR 26	CTG GGA ATT TTT CGG CTT TG
HIGS 34.1	HO16O01	MVR 26	CAT TGT CAT CGC TGG TGT TG
HIGS 35.1	HO06F11	MVR 26	AAG AAC ATT CAA GCC GGG AG
HIGS 36.1	HO06C14	MVR 26	TGC AAC CCA TAA GCC AAG AA
HIGS 37.1	HO05I06	MVR 26	ACA AAG CAA AGC AGT GGC AG
HIGS 38.1	HO05I14	MVR 26	TCT GGA AGT TTT GGC GTC TG
HIGS 39.1	HO05G21	MVR 26	GGC CCT GGG TAG TGA TAT GC
HIGS 40.1	HO05G22	MVR 26	TAT CCT CGC AAA TCT TGG CA
HIGS 41.1	HO02A02	MVR 26	CCG CCA TTC CGT AAG AAA AC
HIGS 42.1	HO02O10	MVR 26	CCG ACT TCA GTT TCC AGC AA
HIGS 43.1	HO06C21	MVR 26	TTA TGC GCC GTT TCA CTT GT

**Fortsetzung von Tab. 6.4**

HIGS 44.1	HO07L24	MVR 26	GAT GCA AAA AGC CAA CAT CG
HIGS 45.1	HO08D16	MVR 26	CTG AGA GCG ATC TCT CCC CTA
HIGS 46.1	HO13H02	MVR 26	GAA GCG GTT GCA GGT GTA GA
HIGS 47.1	HO15J13	MVR 26	CGA ATC GCC ACA CCA AGA AT
HIGS 47.2	HO15J13	CGG CAC GAG GCT CAT TCA AG	GGA TAA ATT TGG GTT GGC AGC ACA
HIGS 47.3	HO15J13	GGT GTG GCG ATT CGT CCT TTA CTG	TTA CAA GAA ATT CAA AAC CAC CAA CAC G
HIGS 47.5	<i>Bgt</i> -DNA	GGT GTG GCG ATT CGT CCT TTA CTG	ATC CGG CTT CTT CGA GTA GTT TTT CAC

**Tab. 6.5: Sequenzen der Primer für die Amplifikation der pflanzlichen GAPDH-Gene**

Primer-Bezeichnung	5'-Primer	3'-Primer
<i>Hv</i> GAPDH (Acc. Nr. M36650)	CTA GCA GCC CTT CCA CCT CTC CA	CAA TGC TAG CTG CAC CAC CAA CTG
<i>Ta</i> GAPDH (Weizen-Cluster TC246724)	TTC CAC CTC TCC AGT CCT TG	CAA CGC TAG CTG CAC CAC TA

**Tab. 6.6: Sequenzen der Primer, die für die Klassifizierung von HIGS 2 verwendet worden (siehe Kapitel 3.4.2)**

Primer-Kombination in Spalte	5'-Primer	3'-Primer
2	AGC CCC ACC GCC ACA GTC ATC	GCT GGA TCG GAT GGA GAA GGA G
3	AGC CCC ACC GCC ACA GTC ATC	GAT GGG GGA GGG CTA CTA CTG G
4	AGC CCC ACC GCC ACA GTC ATC	AAT CCA TTG CAG CCC ATA CAC TTG
5	AGC CCC ACC GCC ACA GTC ATC	CGG GAT CGG ATA GAA TAA GAT TGC AGA ACT A
6	AGC CCC ACC GCC ACA GTC ATC	CCC AGA CAC CAT ATA CCC CTG AAG CA
7	CCC TGC TAA TCC CAC CGA ACC	GCT GGA TCG GAT GGA GAA GGA G
8	CCC TGC TAA TCC CAC CGA ACC	GAT GGG GGA GGG CTA CTA CTG G
9	TCC GAT CCA GCA CCA GAA CCT C	GAT GGG GGA GGG CTA CTA CTG G
10	TCC GAT CCA GCA CCA GAA CCT C	AAT CCA TTG CAG CCC ATA CAC TTG
11	TCC GAT CCA GCA CCA GAA CCT C	CGG GAT CGG ATA GAA TAA GAT TGC AGA ACT A
12	GTG CCC AAT CTA ACG GAA ACC C	CGG GAT CGG ATA GAA TAA GAT TGC AGA ACT A
13	GTG CCC AAT CTA ACG GAA ACC C	CCC AGA CAC CAT ATA CCC CTG AAG CA

**Tab. 6.7: Sequenzen der Primer, die für die Klassifizierung von HIGS 9 verwendet worden (siehe Kapitel 3.4.2)**

Primer-Kombination in Spalte	5'-Primer	3'-Primer
2	CAT GAT CGT GCT GCA TTT CCT GA	GCC TGC CTG TAA CCA CTA ATC G
3	CAT GAT CGT GCT GCA TTT CCT GA	AGC GCC TTT TCC TTC TTC TTG G
4	CAT GAT CGT GCT GCA TTT CCT GA	TAC TAC TGC TTG TTT CTT CCT CGG C
5	TCA CCC TGC TTC ATA CAC CCA ACT	GCC TGC CTG TAA CCA CTA ATC G
6	TCA CCC TGC TTC ATA CAC CCA ACT	AGC GCC TTT TCC TTC TTC TTG G
7	TCA CCC TGC TTC ATA CAC CCA ACT	TTT CTC AAC TCC AAA TAG CAC TCC C
8	TCC CTT TTG TCT TAC GCC CAT AC	TTT CTC AAC TCC AAA TAG CAC TCC C
9	TCC CTT TTG TCT TAC GCC CAT AC	TAC TAC TGC TTG TTT CTT CCT CGG C
10	TCC CTT TTG TCT TAC GCC CAT AC	CAGCACGATCATGGTACACG
11	GGC CGA GTT CCC AGA TAC ATA CA	GCC TGC CTG TAA CCA CTA ATC G
12	GGC CGA GTT CCC AGA TAC ATA CA	TTT CTC AAC TCC AAA TAG CAC TCC C
13	GGC CGA GTT CCC AGA TAC ATA CA	TAC TAC TGC TTG TTT CTT CCT CGG C

**Tab. 6.8: Sequenzen der Primer, die für die Klassifizierung von HIGS 13 verwendet worden (siehe Kapitel 3.4.2)**

Primer-Kombination in Spalte	5'-Primer	3'-Primer
2	TTC GCG GTC TGT ATC GTC TTC ATC T	ATC CAA TCC ACC ATC TCC GTA TCG
3	TTC GCG GTC TGT ATC GTC TTC ATC T	TGC GTG CGC GGG AAA AAG T
4	TTC GCG GTC TGT ATC GTC TTC ATC T	CAG TGC TCC TTG CCT CTT TTG TTA C
5	CGC GCA CGC AGT TTC CAT TG	CAG TGC TCC TTG CCT CTT TTG TTA C
6	GGT GTC CCC TAC GAA CCT CCA GC	ATC CAA TCC ACC ATC TCC GTA TCG
7	GGT GTC CCC TAC GAA CCT CCA GC	TGC GTG CGC GGG AAA AAG T
8	GGT GTC CCC TAC GAA CCT CCA GC	CAG TGC TCC TTG CCT CTT TTG TTA C

**Tab. 6.9: Sequenzen der Primer, die für die Klassifizierung von HIGS 20 verwendet worden (siehe Kapitel 3.4.2)**

Primer-Kombination in Spalte	5'-Primer	3'-Primer
2	ACG CCC TCC TAA CCC TAT TCT TTG A	ATG GGC CCA TCA TTA CAT TAT TGC
3	ACG CCC TCC TAA CCC TAT TCT TTG A	CCC ATC TGG GAG CTT GAT GTG TTC T
4	ACG CCC TCC TAA CCC TAT TCT TTG A	TGT GTC CGG CGC CAT AAA CTC
5	TTG GCA ACG GCC TCA CAG ATG	CCC ATC TGG GAG CTT GAT GTG TTC T
6	TTG GCA ACG GCC TCA CAG ATG	TGT GTC CGG CGC CAT AAA CTC
7	TCC ATG CGG TGA CGA AGA AAA CT	CCC ATC TGG GAG CTT GAT GTG TTC T
8	TCC ATG CGG TGA CGA AGA AAA CT	TGT GTC CGG CGC CAT AAA CTC
9	TCC ATG CGG TGA CGA AGA AAA CT	CCG TGT TTC GGT GGT AGA CTG GG
10	GCT GTA ACC TCG ACA TCA ACC GTA AC	TGT GTC CGG CGC CAT AAA CTC
11	GCT GTA ACC TCG ACA TCA ACC GTA AC	CCG TGT TTC GGT GGT AGA CTG GG

**Tab. 6.10: Sequenzen der Primer, die für die Klassifizierung von HIGS 25 verwendet worden (siehe Kapitel 3.4.2)**

Primer-Kombination in Spalte	5'-Primer	3'-Primer
2	CTC GCG ATT CCA AAC CGA TAA CG	TGC CAG GGG TCT CAG GTC AAT G
3	CTC GCG ATT CCA AAC CGA TAA CG	ATA CAA GGC CTC CAG AGT AAA CAC
4	CTC GCG ATT CCA AAC CGA TAA CG	ATC CAG TTC CTG TAA GAC CAG
5	CTC GCG ATT CCA AAC CGA TAA CG	CCG CAA ATG CGT CTA TTG TC
6	CTC GCG ATT CCA AAC CGA TAA CG	CGC TCG TCA TCA GGA CCA CAG TTC
7	GTC GAC AAC ACT GCC AAC CAC G	TGC CAG GGG TCT CAG GTC AAT G
8	GTC GAC AAC ACT GCC AAC CAC G	ATA CAA GGC CTC CAG AGT AAA CAC
9	GTC GAC AAC ACT GCC AAC CAC G	ATC CAG TTC CTG TAA GAC CAG
10	GTC GAC AAC ACT GCC AAC CAC G	CCG CAA ATG CGT CTA TTG TC
11	GTC GAC AAC ACT GCC AAC CAC G	CGC TCG TCA TCA GGA CCA CAG TTC
12	TTT GCG GCT TAC CCC AAT ACT C	TGC CAG GGG TCT CAG GTC AAT G
13	TTT GCG GCT TAC CCC AAT ACT C	ATA CAA GGC CTC CAG AGT AAA CAC
14	TTT GCG GCT TAC CCC AAT ACT C	ATC CAG TTC CTG TAA GAC CAG
15	TTT GCG GCT TAC CCC AAT ACT C	CGC TCG TCA TCA GGA CCA CAG TTC
16	CAG GCT GGG ATC AAA AAG TCA AAA AC	TGC CAG GGG TCT CAG GTC AAT G
17	CAG GCT GGG ATC AAA AAG TCA AAA AC	ATA CAA GGC CTC CAG AGT AAA CAC
18	CAG GCT GGG ATC AAA AAG TCA AAA AC	ATC CAG TTC CTG TAA GAC CAG
19	GAT CCA AAT ACG GGC TAG TGA CAG	TGC CAG GGG TCT CAG GTC AAT G

## Fortsetzung von Tab. 6.10

20	GAT CCA AAT ACG GGC TAG TGA CAG	ATC CAG TTC CTG TAA GAC CAG
----	------------------------------------	-----------------------------

**Tab. 6.11: Sequenzen der Primer, die für die Klassifizierung von HIGS 31 verwendet worden (siehe Kapitel 3.4.2)**

Primer-Kombination in Spalte	5'-Primer	3'-Primer
2	GAA AAG GGC ACC GGA AAG TCT AAC	CCA CCA GCA CCA GGG AAG CC
3	GAA AAG GGC ACC GGA AAG TCT AAC	AAC CCG CTA GAC ACC ATT ATT TGC
4	CGG TAT TGA AAC TGC GGG AGG AC	TCC GCC TCA TCT TCT GCC TTG TA
5	CGG TAT TGA AAC TGC GGG AGG AC	CCA CCA GCA CCA GGG AAG CC
6	CGG TAT TGA AAC TGC GGG AGG AC	GCG GCG TCA ATC TTC TCG TCA AC
7	CTC GGC AAA TTC GAG CTT ACT GG	GCG GCG TCA ATC TTC TCG TCA AC
8	CTC GGC AAA TTC GAG CTT ACT GG	AAC CCG CTA GAC ACC ATT ATT TGC
9	CGG TCT AGA GTC GTA CGC TTA TTC	CCA CCA GCA CCA GGG AAG CC
10	CGG TCT AGA GTC GTA CGC TTA TTC	AAC CCG CTA GAC ACC ATT ATT TGC

**Tab. 6.12: Sequenzen der Primer, die für die Klassifizierung von HIGS 32 verwendet worden (siehe Kapitel 3.4.2)**

Primer-Kombination in Spalte	5'-Primer	3'-Primer
2	CTT TGA ATA ACG ACT TGA CGC CCT CT	TCA TTC GCA CTC GGA TGG ACT GT
3	CTT TGA ATA ACG ACT TGA CGC CCT CT	TGA CCG ACG GTA TTG CTG GAT TGT A
4	TTG TTT TGT GCC TAG AGT AAG TGC CT	TGG TGC GGG TGT TCT ATC AAT CTA CG
5	TTG TTT TGT GCC TAG AGT AAG TGC CT	TCA TTC GCA CTC GGA TGG ACT GT
6	TTG TTT TGT GCC TAG AGT AAG TGC CT	TGA CCG ACG GTA TTG CTG GAT TGT A
7	CCC ATT TTT CCA ACC CTC TAA CCA	TGG TGC GGG TGT TCT ATC AAT CTA CG
8	CCC ATT TTT CCA ACC CTC TAA CCA	TCA TTC GCA CTC GGA TGG ACT GT
9	CCC ATT TTT CCA ACC CTC TAA CCA	TGA CCG ACG GTA TTG CTG GAT TGT A

**Tab. 6.13: Sequenzen der Primer, die für die Klassifizierung von HIGS 35 verwendet worden (siehe Kapitel 3.4.2)**

Primer-Kombination in Spalte	5'-Primer	3'-Primer
2	GAG CAC TCG ACC TCG CCG TAA ATG	GGG GGC AAA TCT TCC AAC ATC TC
3	GAG CAC TCG ACC TCG CCG TAA ATG	GTC ACC AAT ATT CTC CGA CAA AAA G
4	GAG CAC TCG ACC TCG CCG TAA ATG	CCT AAT TGG ACA GAT GTA TAA CTT TCA GCA CTC A
5	CGA GGG CTT ATT TCT CCA ACC ACG	GGG GGC AAA TCT TCC AAC ATC TC
6	CGA GGG CTT ATT TCT CCA ACC ACG	GTC ACC AAT ATT CTC CGA CAA AAA G
7	CGA GGG CTT ATT TCT CCA ACC ACG	CCT AAT TGG ACA GAT GTA TAA CTT TCA GCA CTC A
8	CGA GGG CTT ATT TCT CCA ACC ACG	GCA AAG CCC TGC AGC AAA ACC TAT AC
9	AGG GTC GAG AAG GTC AAG AAT AAA ACA AAA G	GTC ACC AAT ATT CTC CGA CAA AAA G
10	AGG GTC GAG AAG GTC AAG AAT AAA ACA AAA G	CCT AAT TGG ACA GAT GTA TAA CTT TCA GCA CTC A
11	AGG GTC GAG AAG GTC AAG AAT AAA ACA AAA G	GCA AAG CCC TGC AGC AAA ACC TAT AC
12	AGG GTC GAG AAG GTC AAG AAT AAA ACA AAA G	AAG AAC ATT CAA GCC GGG AG
13	CTC CGC AAG AGC TGA AGA ATG A	CCT AAT TGG ACA GAT GTA TAA CTT TCA GCA CTC A

**Tab. 6.14: Sequenzen der Primer, die für die Klassifizierung von HIGS 36 verwendet worden (siehe Kapitel 3.4.2)**

Primer-Kombination in Spalte	5'-Primer	3'-Primer
2	GCT AGC CAT CTA CTT CTT TTT CTC CTC	GCT CAG CGT ACG GCA TAA CTC C
3	GCT AGC CAT CTA CTT CTT TTT CTC CTC	GAT ATT ACT GCC GTT GAT TTC CCT ACT
4	GCT AGC CAT CTA CTT CTT TTT CTC CTC	GAT ATG GTT CTT GGC TTA TGG GTT GC
5	GCT AGC CAT CTA CTT CTT TTT CTC CTC	CCA GCC GTT GTC CCA TGT TTA TTC
6	GCT CCA CTA CAA TTC TTT TCT TTT CC	GCT CAG CGT ACG GCA TAA CTC C
7	GCT CCA CTA CAA TTC TTT TCT TTT CC	GAT ATT ACT GCC GTT GAT TTC CCT ACT
8	GCT CCA CTA CAA TTC TTT TCT TTT CC	GAT ATG GTT CTT GGC TTA TGG GTT GC
9	GCT CCA CTA CAA TTC TTT TCT TTT CC	CCA GCC GTT GTC CCA TGT TTA TTC
10	CCA TAG TCG GTC ATT ATT CTT CGT A	GCT CAG CGT ACG GCA TAA CTC C
11	CCA TAG TCG GTC ATT ATT CTT CGT A	GAT ATT ACT GCC GTT GAT TTC CCT ACT
12	CCA TAG TCG GTC ATT ATT CTT CGT A	GAT ATG GTT CTT GGC TTA TGG GTT GC
13	CCA TAG TCG GTC ATT ATT CTT CGT A	CCA GCC GTT GTC CCA TGT TTA TTC
14	GTG ATG CTG GGA ATT GGT GAG ACT	GAT ATT ACT GCC GTT GAT TTC CCT ACT

## Fortsetzung von Tab. 6.14

15	GTG ATG CTG GGA ATT GGT GAG ACT	GAT ATG GTT CTT GGC TTA TGG GTT GC
----	------------------------------------	---------------------------------------

**Tab. 6.15: Sequenzen der Primer, die für die Klassifizierung von HIGS 47 verwendet worden (siehe Kapitel 3.4.2)**

Primer-Kombination in Spalte	5'-Primer	3'-Primer
2	CGG CAC GAG GCT CAT TCA AG	GGA TAA ATT TGG GTT GGC AGC ACA
3	CGG CAC GAG GCT CAT TCA AG	ATC CGG CTT CTT CGA GTA GTT TTT CAC
4	AGC GCA TTC GTA AAG GCA GCA G	GGA CGA ATC GCC ACA CCA AGA AT
5	AGC GCA TTC GTA AAG GCA GCA G	GGA TAA ATT TGG GTT GGC AGC ACA
6	AGC GCA TTC GTA AAG GCA GCA G	ATC CGG CTT CTT CGA GTA GTT TTT CAC
7	AGC GCA TTC GTA AAG GCA GCA G	TTA CAA GAA ATT CAA AAC CAC CAA CAC G
8	GGT GTG GCG ATT CGT CCT TTA CTG	GGA TAA ATT TGG GTT GGC AGC ACA
9	GGT GTG GCG ATT CGT CCT TTA CTG	ATC CGG CTT CTT CGA GTA GTT TTT CAC
10	GGT GTG GCG ATT CGT CCT TTA CTG	TTA CAA GAA ATT CAA AAC CAC CAA CAC G
11	TGG TGT CAT CTC TTA CTT GTG C	ATC CGG CTT CTT CGA GTA GTT TTT CAC
12	TGG TGT CAT CTC TTA CTT GTG C	TTA CAA GAA ATT CAA AAC CAC CAA CAC G

**Tab. 6.16: Sequenzen der Primer, die zur Herstellung der Antisense-Konstrukte für VIGS verwendet wurden**

Neben dem verwendeten 5'- und 3'-Primer ist das bei der PCR eingesetzte *Template* aufgeführt. Dabei handelt es sich zum Teil um die Bezeichnung eines HO-EST-Klons der Crest-Datenbank des IPK.

Konstrukt-ID	5'-Primer	3'-Primer	Template
pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS25as	TTA TAT GGA TCC CAT CTT ACA ATG CCG TTT ATC TTC AG	TTA TAT CCC GGG CAC TAG TCA TCT CGG TGC TGT AAA G	HO09P14
pT7-BSMV- $\gamma$ .HIGS35as	TTA TAT GGA TCC AGT ACT CTC CGG CTT CTG CTC A	TTA TAT CCC GGG GTC ACC AAT ATT CTC CGA CAA AAA G	HO06F11
pT7-BSMV- $\gamma$ . HIGS47as	TTA TAT GGA TCC GGT GTG GCG ATT CGT CCT TTA CTG	TTA TAT CCC GGG ATC CGG CTT CTT CGA GTA GTT TTT CAC	<i>Bgt</i> -DNA
pT7-BSMV- $\gamma$ . PDSas (Acc. Nr. BT009315)	TTA TAT TTA ATT AAA AGT TGG TGG GAG TTC CTG TCA TC	TTA TAT CCC GGG GGG TCG GCA AGG TTC GCA GTT C	Weizen- cDNA

**Tab. 6.17: Sequenzen der Primer, die bei der *real time*-PCR eingesetzt wurden**

Es sind sowohl die Primer, die verwendet wurden, um HIGS 47 aus *Bgt* (Kapitel 3.6.2.2) als auch aus *Bgh* (Kapitel 3.7.4) zu amplifizieren.

Primer-Bezeichnung	5'-Primer	3'-Primer
Lipase (Acc. Nr. AW788348)	GCT GGG GTC GCT CGG TTC GTA	CCA ACA AGG TCG GCA TAT TTA GGA
HIGS 47 (Kapitel 3.6.2.2)	TGA GTC ATC CCG ATC GCC ACA GT	AGC GCA TTC GTA AAG GCA GCA G
HIGS 47 (Kapitel 3.7.4)	GCA CCG ACT GCC TGT AAC TTT GG	TCA TGC GAG GAA TGG TCA CTG C

**Tab. 6.18: Sequenzen der Primer, die für die Amplifikation der beiden Wiederholungssequenzen des RNAi-Konstruktes pIPKb007\_HIGS 47.2 und des Hygromycin-Phosphotransferase Hpt<sup>r</sup>-Gens verwendet wurden (Kapitel 3.7.1.1)**

Primer-Bezeichnung	5'-Primer	3'-Primer
Wiederholungssequenz vor dem Intron	AGG CAA CTA GAT AAC CAT TTT CA	GTT TCT TTT GTC GAT GCT CAC C
Wiederholungssequenz hinter dem Intron	GGA TAG CCC TCA TAG ATA GAG TAC TAA CTA A	ATG AGC GAA ACC CTA TAA GAA CCC TA
Hpt <sup>r</sup> -Resistenzgen	GAT CGG ACG ATT GCG TCG CA	TAT CGG CAC TTT GCA TCG GC

**Tab. 6.19: Sequenzen der Primer, die für die Vor-PCR zur Amplifikation der Transkripte aus den Einzelzellproben eingesetzt wurden (Kapitel 3.5)**

Primer-Bezeichnung	5' Primer	3' Primer
<i>Bg</i> GAPDH (Acc. Nr. X99732)	GGT CGT ATA GGC CGC ATT GTC TTC	GTT TCG GCC CAT GGT ATC TCT TCA
<i>Hv</i> GAPDH (Acc. Nr. M36650)	CTA GCA GCC CTT CCA CCT CTC CA	CAA TGC TAG CTG CAC CAC CAA CTG
<i>Bg</i> Mitochondrium ( <i>Bgh</i> -Cluster <i>Bg</i> Con[0399])	AGA CAG CTC GTA TTT TTA TGG GGT AG	GTA CAA CAC TAT TCC ATG CTT CCT ATT C

**Tab. 6.20: Sequenzen der *nested*-Primer, die für die zweite PCR-Reaktion zur Amplifikation der Transkripte aus den Einzelzellproben eingesetzt wurden (Kapitel 3.5)**

Primer-Bezeichnung	5'-Primer	3'-Primer
<i>Bg</i> GAPDH (Acc. Nr. X99732)	GCT GTG AAG TCG AAG TTG TTG CTG TC	ACT AGT CCA TCC TCG ACT GTT TG
<i>Hv</i> GAPDH (Acc. Nr. M36650)	AAC TGT CCT GCT CCT CTT GCT A	CAC CTC TCC AGT CCT TGC TTG AA
<i>Bg</i> Mitochondrium ( <i>Bgh</i> -Cluster <i>Bg</i> Con[0399])	TAA GAT AAC CCA AGT GAT AAT GCT GAC	TGG TAT TTA GGT ACG GTT TTG TTT TCC C

**Tab. 6.21: Sequenzen der Primer, die für die PCR zur Qualitätsprüfung der cDNA aus *Bgt*, von BSMV- infizierten Pflanzen, eingesetzt wurden**

Primer-Bezeichnung	5'-Primer	3'-Primer
<i>Bg</i> GAPDH (Acc. Nr. X99732)	GCC TCG TGC ACA ACT AAC TG	AAC ACG CAT TGC CAT TCC TG
<i>Ta</i> GAPDH (Weizen-Cluster TC246724)	CTA GCA GCC CTT CCA CCT CTC CA	CAA TGC TAG CTG CAC CAC CAA CTG
BSMV-a (Acc. Nr. U35767)	TGT ACG GCG CAA CAT CTC CTC TG	ACC TTC GGG CAC CTG TCT CAC
BSMV-β (Acc. Nr. U35770)	GTT GCC GAT CAG ACT CCA TTG	CTC GCG CCA TAC ATT CCT TTA GA



### 6.3 bekannte Sequenzen der Kandidatengene

**HIGS 2** (basierend auf den EST-Sequenzen von HO04M11S, HO04M11w und HO09D13S)  
 CGGCACGAGGACACTGTCTACCTCTTCAACCTTATTCCATCCATCTCCCTTTGTCTTCATCCAACCT  
 CTCGTCAAGTCTCTACGACTATTCCATCTCGCACCGATCCACATTTAGTCAATTTATTTTCTCAACT  
 TCATTCGCGGGCATCATGAAATCTGCAGTCTTCTCCTTAGCTGCCGCCGCCCTCGCTGCCATAGCC  
 TCGGCCACAGCCCCACCGCCACAGTCATCGACACATGGCTCAGCACCACAAGCGTGACGGTAACA  
 CACCCGTCTGTGGGTACCAAGCCAGAGGTCAAGGTAGTCGATGTCACAACCACTGTTTGGATA  
 GCAGCTGCTGAAACCGAATCGACTTCGATGTTAGCCGCTTCCGCCGTTGTGGCCCCTGCTAATCCC  
 ACCGAACCCAGTCCAATTGAAGCTGAGCCCACTGGTGTTCCTTCTGAAGAGGATGATGGCGATGA  
 GCCCTCACTTCCAGATGTGCCCTTCCCAGATGAGCCTGATCTCGATCTACCCACGCCAGGCGACTT  
 GGAGCCCCAAATTCCTCTTNAACCGACCCCGNAGCTCCTTCTCCATCCGATCCAGCACCAGAAC  
 CTCTGGCACCTCTCAATCCAGAGCCCCGCACTCCCGCACCTGCTGAACCAGAAGTGCCAGCCCAG  
 CCAGCTCCTGTTCCCGCAGCTCCAGCCAATGAGACCGATGTCAACCACGCCCCCAAATTCGCTGA  
 TAGCATGACCGAATTTGCATCTGGCAGCTCATGCTCTGCATCCTCTCCTTGCTCTGGTGATATCAC  
 CTACTACGATCCTGGTGTGGCATGGGTGCTTGC GGATGGCAGAGC<sub>c</sub>ACCAAAAACGAGCCAGTA  
 GTAGCCCTCCCCATCAGTTCATGGGTGCCAATCTAACGGAAACCCCTACTGTGGCAAGACAGT  
 CACCATCAAGCACGGCGGCAAGACCAGCACGGCAAAAATCGTGGACAAGTGTATGGGCTGCAAT  
 GGATTCTCTATCGACCTTAGCGACGCAGCCTTCACACAATTATCAGCCCTCAGCGTCGGACGGAC  
 CGATGCAACTTGGTGGATCAACAATTGATCATTCTTTGGATAGAATACACAAACCCTTTACTTCAC  
 CAAAAGATTGCTGGCCAATTGTGAGGCTGCCACACGGCATTGCTTCAGGGGTATATGGTGTCTGG  
 GACCTTTTTATGAGTTGTTGCAAGACTATCCTGCGGATAGTATGGTGCCAGGAGCACATTCACG  
 ATGACGTGAGATTTTCATGTAAATAGATTTGGTACCTTTTAGTTCTGCAATCTTATTCTATCCGAT  
 CCCG

**HIGS 6** (basierend auf der EST-Sequenz von HO01D20r)

CGGCACGAGGCTATTCTATCTGGTGACACATCCTCCAAGTCCACCAATGAAATTCTTCTCCTTGAT  
 GTTGC GCCTCTATCTCTCGGTATTGAAACTGCGGGAGGACAAATGACAAAATTAATCCTCGAAA  
 CACAACGATTCCACAAAAAATCAGAAGTCTTCTCGACATTCTCAGACAACCAACCAGGAGTGT  
 TGATCCAAGTATTTGAAGGAGAACGCCAACGTACAAAAGACAACAACCTTCTCGGCAAATTCGA  
 GCTTACTGGAATACCACCTGCTCCAAGAGGTGTTCCCCAGATCGAGGTTACTTTCGATTTGGATGC  
 TAATGGAATTATGAATGTCTCTGCTCTTGA AAAAGGGCACCCGAAAGTCTAACAAAATTGTTATCA  
 CCAATGACAAGGGTCGCCTGTCCAAAGAAGACATTGAGCGCATGTTGGCAGAGGCCGAGAAGTA  
 CAAGGCAGAAGATGAGGCGGAGGCTGGACGCATCAGTGCCAAGAACGGTCTAGAGTCGTACGCT  
 TATTCTCTGCGAAACACATTGTCTGATTCAAAGGTTGACGAGAAGATTGACGCCGCTGATAAAGA  
 AAAACTCAAGGCTGAAATTGACAAGACAGTTGCATGGTTAGATGATTCACAAGCAGCCACCAAAA  
 GAAGAATACGAAGAACACCAAAAAGAACTTGAGGCAGTTGCCAACCCAATTATGATGAAGTTCT  
 ACGGTGCTGGTGGAGAGGGCGCTGCTGGCGGCTTCCCTGGTGCTGGTGGATTCCCTGGCGCTGGA  
 GCTGCTCCTGGAGCCACCCATGATGATGGCCCTACTGTGCGAAGAAGTCGACTGAGTAAAATAATG  
 TCATGTTACTTGGGATGTGGTTTTCTTAAAAGTATTTGCAAATAATGGTGTCTAGCGGGTTTTGGCT

ATGATAAGAATGTATGAACTTTCATGCTCGTTTCGAATTTAAAGATAGAATTCTCTCAGCAGTGTC  
TGTTAGTTAAATGAATTTAATCAT

**HIGS 9** (basierend auf den EST-Sequenzen von HO07E08S, HO07E08w, HO02E21S und HO02E21w)

ACGAGGCTTAAGGTCACCAACAGATCTCCGCATCGGCCATCAAGAATCTACCGCCTACAATTGA  
AGTAGCAGACGACGCCACAGTCCTTCAAGTCAAGGAACAATTATCACGATTAACCTCGCCTCTCTC  
CTGATCGTTTGGGTATATTCGATCCAGAAAAGAAGAAGATACTGCGAGATCGCAAAGCATTATT  
CTTCATCAAGATGAGATTGCTACAGAAAGAGAGATACTCGTCAAAGACTTGGGCCCTCAGCTATC  
CTGGACGACAGTTTTTCATTATTGAGTACCTAGGTCCCATTCTACTTCACTTCCTTGTCCCTTTTGT  
TTACGCCCATACATATATGGCAATCGAGAAATACCTCCACTTTCAGCTTCACAATATCTTTCGTGT  
ACCATGATCGTGCTGCATTTCTGAAACGTGAAATCGAAACAATCTTCGTTCAAAATTTTCACTA  
TCAACTATGCCGCTGCGCAATATCTTCAAGAACTCGGCCACTACTGGATTGGATCGGGAGTAGT  
CTTGGCTTACTACGTTTATCACCTGCTTCATACACCCAACCTTGAGTCAGAACTATTAACTATGT  
CAACATGGTGGGTGTAGCCTTATACATATTTGGTGAAATTTCCAACGCCATGCCATCTAACACT  
AAGCCGATTACGGAGCAAGGGTGGAACTGAAAGGGGTGTTCTAGAGGATACGGATTTCGAGTGG  
GTCACTTGCCCTAACTACCTGTTTGGAGATCATCGCCTGGATTGGTATAAACTTAGTCACAAAGAGT  
ATCTCGACAATCATCTTTATCGTAATCGCTTGGGCTCAGATGCACCTATGGGCCAAGAAGAAGGA  
AAAGGCGCTCAGGGCCGAGTTCCCAGATACATACAAAAGAAGCGGAATGTTATCTTCCCTATTT  
TYTAAGGATTACATATGTAAGAATTTTATGTAGTTATGACAGCTGTCTGGTTTTCTTCACCCGATT  
AGTGGTTACAGGCAGGCGTACCTAGATTTATCGGCTCATTGTGGGAGTGCTATTTGGAGTTGAGA  
AAAACGTTTATTATTATGCTTACTGCAATTCGACCGTACGACTAAGGAAAGATTTATACCTAATG  
TATAATCCCCTACTGTTGTCTAGTCTCCGGCAGGATATYTGGAAGTCGGAGGCTCTAGGGTTT  
GCCGAGGAAGAAACAAGCAGTAGTAACGCTCGGCCTTTAATTTATCTTTACTCGGAAKTAATTGT  
TATTTATGATTATTTCCGGAAG

**HIGS 13** (basierend auf den EST-Sequenzen von HO08J20S und HO08J20w)

CGGCACGAGGATTCTCAACACCTGTCAAGTGGTGTCCCCTACGAACCTCCAGCTCTCACTGTAGAG  
TCTGCAGAGCCGAGATTGAGTAACAAAGTCCTCACTTCGAAGAGGATTCCCAATCGCTTTCGCGG  
TCTGTATCGTCTTCATCTCTCAACACATTTCCCTATCACCACTATCATGAAGCTAACCACGATCAG  
ATCAGATGGTAGGGTCGGAGCCCTACTCGTCACCCACCCTTGATCATGGAGGAAAAGCCATCCGA  
TGAGTTTCCGGAGCGTACCCAGCACCCGATACGGAGATGGTGGATTGGATCAAGTCGACCTCGAA  
TGTTACAAAGAAGGGAGATATAGATGAATATGCGCACCTCATGTGGTCCCGGTGTCTAGGCCTCG  
CCTGGCTGGGGCTGCAGGTTTTTTGAGACTTTTTCCCGCGCACGCAGTTTCCATTGCTACCATTTTT  
ATTTTTTTTTGGGTAGAAGGTTCCGTGGAAAAGGTGGCTGAATTCACGGGTAAATACTGAGCTGA  
ATGGCTATTCATCAAGGGGAATATATCAATGATCTTTCAAGTAACAAAAGAGGCAAGGAGCACT  
GTACAAGGTGTGGCCTGGGTCAGAGAGGAGCCCAATGTGCTAGATAGTCATAGACTCAAGTAGT  
ACAATAAAACACACAC

**HIGS 20** (basierend auf den EST-Sequenzen von HO09I03S und HO09I03w)

CGGCACGAGGGTTATTTTCCTTGACCAACCAGTCAATGTCGGATACTCGTACAGTGGTGATTCCG  
 TCAGCACAACCGTCGCAGCAAGCAAAGATATATACGCCCTCCTAACCTATTCTTTGAGCAATTT  
 CCACAATACTCTACCCAGGACTTCCACATTGCCGGGAATCCTATGCTGGCCATTACATTCCGGTC  
 TTCGCTTCCGAGATCCTTTCTCACAAGATCGGAATATCAACCTCAAGTCGGTTCTAATTGGCAAC  
 GGCCTCACAGATGCTCTAACTCAATATGAATATTACAGACCCATGGCATGTGGCCAGGGTGGTCT  
 ACCATCAGCACTTAGTCCAAGTGAGTGCCAGGCAATGGATGAAGCACTTCCACGCTGCCAACGTT  
 TGATACAAACCTGTTATGACTATGAAAGCGCATGGGCTTGTGTTCTGCAAGTATCTACTGCAAT  
 AATGTAATGATGGGCCATTTCAAAGACTGGTCTAAACGTATACGACATGCGTGTTCCATGCGG  
 TGACGAAGAAAACCTTATGCTACACTGGTCTAGGCTGGGTCAGCCAATACCTCAATCAGGAACATG  
 TAATGCGGGAATTGGGAGTtGAGGGTGTCCAGTTTTGAGAGCTGTAACCTCGACATCAACCGTAA  
 CTTTTTGTTCATGGAGACTGGATGCAACCATTTACCTGAAAGTTCCTGACGTACTIONAAAGAGAT  
 CCCCCTGTTAATTTACGCTGGAGACGCAGATTTTCATCTGCAATTGGCTCGGAAACCAGGCCTGGA  
 CTGAGGCACTTGAGTGGCCAGGGCAAGCTGAATTTCAAATGCTCAACGAGAACACATCAAGCT  
 CCCAGATGGGACTAATTACGGAAAGATTAAGAGCAGCGGCAATTTACCTTCTTGCGAGTTTATG  
 GCGCCGGACACATGGTCCCTTACAACCAACCAGTAGCATCACTCGATTTTTGTTAATCGATGGGTA  
 AGCGGAGAGTGGTTCTCACAGGATTAAGTGAAGAAGCATATAAAGTAATTTCTTCCACAAACA  
 GGGGAACGTGAGTGACAATTAGCTCAGTCTGTTCAATTATTCTTTTTTCCAGTCTACCACCGAAA  
 CACGGACCTGTATGTGATTGCTTTAACTCTCTGTTGATATGGTCTTTCCTGTTGTAGCTATTTGAA  
 GCTAGTAATACAAGCATAGCG

**HIGS 25** (basierend auf den EST-Sequenzen von HO09P14S, HO09P14w, HO11N21S, HO14N04S und HO14N04w)

CGGCACGAGGCCACATCCTGCCAGTTGACTATCTCTGCAACAGTTTGAACAACATAAACTAGTAGA  
 ATCATACTGATCACGATTGAAAATTAACATCAAATGAAATCACACGCAATTGCGGCCATTTCCG  
 TGGTGACGGGAGCTCTGATATCACCATCTTCAGGTTCCCTGTTTTCTCGCGATTCCAAACCGATAA  
 CGTCAATAACAGTCAAAGGAAACGCATTTTTTTCAGGGAGACAGCCGATTCTATATCCGTGGAATT  
 GACTACCAGCCTGGTGGATCATCTAAGCTAGTTGATCCCATAGCTGATGAGACAAGTTGTAAGCG  
 CGACATTGCCAAGTTTAAAGAATTAGGTGTGAACACCGTGCGTATTTACACAGTCGACAACACTG  
 CCAACCACGATGCCTGCATGAACGCTCTTGCAGCCGAGGAATTTATTTAGTCCTTGATGTTAAC  
 ACACCCAAATACTCTCTCAACCGTGCAACCCCGGCCCATCTTACAATGCCGTTTATCTTCAGAAC  
 ATATTTGCGACAATAGACGCATTTGCGGCTTACCCCAATACTCTTGCCTTCTTTTCGGGCAATGAA  
 GTCATTAACGATGATTCTACTACACCGTCAGCACCATACGTAAGGCTGTCACACGTGATATGAG  
 ACAATATATTGGCAGCCGTGGTCACCGAAAAATTCCTGTGGGATACTCTGCTGCTGATGTCGACT  
 CTAACCGCCGTGAGATGGCACAGTACATGAACTGTGGTCTGATGACGAGCGAAGTGATTTTTTT  
 GCTTTCAATGATTACTCCTGGTGTGATCCTTCATCGTTTACAACCTCAGGCTGGGATCAAAAAGTC  
 AAAAATTCACAGGATACGGAATTCCTATTTTCTATCGGAATATGGCTGTAACACAAACACTCG  
 CCAATTTACAGGAAGTTGCTTCTTTACAGCACCGAGATGACTAGTGTACTCTGGAGGCCTTGT  
 ATACGAATATACCGAAGAAGGATCCAAATACGGGCTAGTGACAGTCAGCGGAAACACAGTTACT  
 GAAGGACCAGACTTTGCTGCCCTCAAGTCAGCCTTTGCGAAAACTATAAACCCAAGTGGTGATGG

TGGGTACAATACCACCGGCGGAGCGTCTGGATGTCCTAGTAAATCAGCAAACCTGGAACGTAGAA  
 GATGACTCGCTTCCGGCCATACCTAGTGCAGCCTCAGCTTACATGTCGAAGGGCGCAGGCAAAGG  
 TGCTGGTCTTACAGGAACTGGATCGCAAAACGCTGGCGGTGCGTCTACTGGTACAGCTACGAAGG  
 GATCTGGGGCCGTGTCTGCAACTGCCAAATCTAGCAGTCTTGCCAATAGCCTAAACAAGGGTCC  
 ATTGACCTGAGACCCCTGGCAATCGCGGTGATGCTTATCACGCTCACATTTTTTGGGGCTATAGCT  
 TTGTAAGATGTTGTATGAAGAGATGTGGATCAAATGTAGCTAATTAAGGCATTTTTGTAAAGGA  
 AGGCTCTCGTAAAGGGTTAGCCAGGAATAGRAGAGTATCTTATTCTAAAAAAGG

**HIGS 31** (basierend auf den EST-Sequenzen von HO14N21S und HO14N21w)

CGGCACGAGGCTATTCTATCTGGTGACACATCCTCCAAGTCCACCAATGAAATTCTTCTCCTTGAT  
 GTTGCCTCTATCTCTCGGTATTGAAACTGCGGGAGGACAAATGACAAAATTAATTCCTCGAAA  
 CACAACGATTCTACCAAAAAATCAGAAGTCTTCTCGACATTCTCAGACAACCAACCAGGAGTGT  
 TGATCCAAGTATTTGAAGGAGAACGCCAACGTACAAAAGACAACAACCTTCTCGGCAAATTCGA  
 GCTTACTGGAATACCACCTGCTCCAAGAGGTGTTCCCCAGATCGAGGTTACTTTCGATTTGGATGC  
 TAATGGAATTATGAATGTCTCTGCTCTTGAAGGGCACCAGGAAAGTCTAACAAAATTGTTATCA  
 CCAATGACAAGGGTGCCTGTCCAAAGAAGACATTGAGCGCATGTTGGCAGAGGCCGAGAAGTA  
 CAAGGCAGAAGATGAGGCGGAGGCTGGACGCATCAGTGCCAAGAACGGTCTAGAGTCGTACGCT  
 TATTCTCTGCGAAACACATTGTCTGATTCAAAGGTTGACGAGAAGATTGACGCCGCTGATAAAGA  
 AAAACTCAAGGCTGAAATTGACAAGACAGTTGCATGGTTAGATGATTCACAAGCAGCCACCAAA  
 GAAGAATACGAAGAACACCAAAAAGAACTTGAGGCAGTTGCCAACCAATTATGATGAAGTTCT  
 ACGGTGCTGGTGGAGAGGGCGCTGCTGGCGGCTTCCCTGGTGCTGGTGGATTCCCTGGCGCTGGA  
 GCTGCTCCTGGAGCCACCCATGATGATGGCCCTACTGTGCAAGAAGTCGACTGAGTAAATAATG  
 TCATGTTACTTGGGATGTGGTTTTCTTAAAGTATTTGCAAATAATGGTGTCTAGCGGGTTTGGCT  
 ATGATAAGAATGTATGAACTTTCATGCTCGTTTCGAATTTAAAGATAGAATTCTCTCAGCAGTGTC  
 TGTTAGTTAAATGAATTAATCAT

**HIGS 32** (basierend auf der EST-Sequenz von HO15I23w)

CTAGAGAAACCTTGTTTTGTGCCTAGAGTAAGTGCCTACGTTTTGTTTCGCAAGGATAGTGAAATA  
 TAAGCTGTTTGTATACACAAATCCCATTTTTCCAACCCTCTAACCAATTACAGAACCTAATGTTAC  
 AAGCCTCGACTAATAATTGTCTTTGGCCCGTGACACTTGCCTTTAAACAAAGGACATACTATATTAC  
 TATAAAGACAAAATCTGGGCCAATTTAACATGTACATGAGTCTACTTGAAAGCTTTACCGAACAG  
 TAAAACCTGTAATTGATCGTAGATTGATAGAACACCCGCACCAGCGACACCACGGAGGATATTG  
 GCTCCAGCACCTTTGAATAACGACTTGACGCCCTCTTTGGCAATAATTTGGCGTCCGGCGTCAAG  
 GGAGGATTTATACTTGACAGCTTCACCAGATGTCATCATCATCCGACGACGAATAGTGTCTAATG  
 GGTAAGATGCGATACCAGCTCCAGTTGTGACAGTCCATCCGAGTGCGAATGAAGCAAGGAAGTT  
 ACCTTCGAGAGGCCCAACAAGTACAACCTGGTTTGATAGAATCGTACATGCCGAAGTAGAGACCA  
 CGGTAAACCACTATACCCAGAACCGAGGGCATGAAACCACGGTACAATCCAGCAATACCGTCCG  
 TCATCATGGTCTTCTTGTACACGTCCACCAATCCATTGAATTGACGCTCGCC

**HIGS 35** (basierend auf den EST-Sequenzen von HO06F11S und HO06F11w)

CGGCACGAGGGTTCGAGAAGGTCAAGAATAAAACAAAAGGATTCAAGGGATCTGTCGAAACATG  
TCTCTGGGTGGAGGCAAATCTCGAGACTCGACCTCGCCGTAATGGGGCAGTATCAGCAGGTCT  
CCACTTCGCCGTGGCTGCTGGAAATGACAATGATGATGCTTGTAAGTACTCTCCGGCTTCTGCTCA  
ACAAGCCATTACAGTTGGAGCCTCAACTTTGTCCGATTTCGAGGGCTTATTTCTCCAACCACGGAC  
AATGTGTTGATGTTTTTCTCCCGGCTTGAATGTTCTTTCTACATGGAAAGGAAGCAGAGATGCTG  
TTAATACGATATCCGGTACATCTATGGCATCCCCACACGTCGCTGGACTCATGGCATATTATTTGT  
CTCTCCAACCCGAAGCGGATTCTGACTTTGCTACTACAATGCTCTCTCCGCAAGAGCTGAAGAAT  
GATATAATCGCCGCCAGCACAAGGGAGATGTTGGAAGATTTGCCCCAAATACTCCTAATTATTT  
GATTTGGAACGGCGGAGGTTTGTCTAACCTCTCTGCAATTGTCAAGACAGTTGACCGCTCCTACG  
ATGAATTCATTCAGAGGAAAACACTTCCACTATGGAGTCTTTCAAGGAATATTTTCAAGAAGAA  
ATTGACTTTTTTGTCTGGAGAATATTGGTGACAAGGTTGAAGAAGCAATAAACGAAGCTGAAGCTGT  
TTCCAGGGAGATAGCTGATGCCGTTAGCCTGAGTTTACACGAGCTTTGCGATGAATTTGGAGTCT  
AAATAGTGTCAAATGGTTAGAGTATCGATACGTTAACTAGCTAATGAGTGCTGAAAGTTATACAT  
CTGTCCAATTAGGAGACTGCCTGAATTACTAGAGGTATAGGTTTTGCTGCAGGGCTTTGCATTCTA  
TTTTGTTTTTCAATAGGTTTCATACTCATAACAAGTGTT

**HIGS 36** (basierend auf den EST-Sequenzen von HO06C14S, HO06C14w, HO23J08S und HO23J08w)

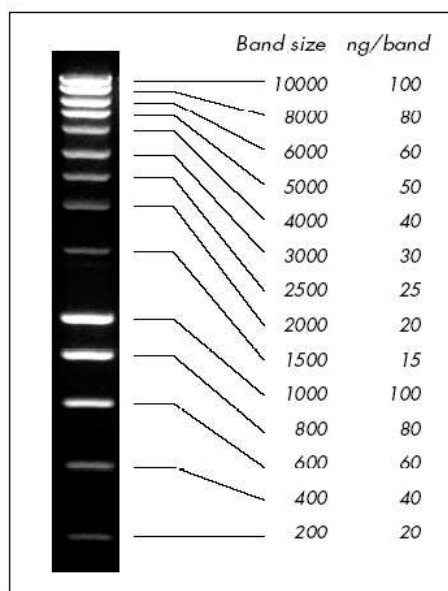
CATTTTGATGAATCTTTTCGTATTTTCGGCTAGCCATCTACTTCTTTTTCTCCTCTTTTTCTTGATCC  
TTTGCTACCGGTAGCTTAAAGGTATCCGGTTTCCTATCAATACCAGGCCAACTTGCTCCCATGCC  
GAAGTACCCCTTCAAATTTCTAAAGGCTTGTTAATTCTAATGGCTCCACTACAATTCTTTTC  
TTTTCTCATCATATCGAATTTAGTGTAGCCAGTCAGAGGGAAATCTTTTCTCAGAGGATGGCCG  
TCAAAGCCATAGTCGGTCATTATTTCTCGTAAGTCAGGATGACCGACAAAAAACTCCAAACAT  
GTCATACACCTCCCCTCGTACCAATTGGCGCCATCGTATAAGCTAGTGATGCTGGGAATTGGTG  
AGACTTCGTCTGCATATGTTTTGACTCGAATCCTGGAGTTATGCCGTACGCTGAGCATGTTGTA  
CTATCTCGAATCTTTGGTCTCTAGTAGGGAAATCAACGGCAGTAATATCTGAAATTTGGGTAAAT  
TCTGCAGCTGTGTTGATTTTAGGAACTGAACTGGTATCACTCCGGCCGGGAAATGTAGAT  
TACCAACTCATCTTTCCATAACGAAAATTGTTGTATGACTTTGGAATGCAACCCATAAGCCAAG  
AACCATATCGATGCATGTCATCTGCTATTGTCATATATTTATCGGCAGGATTGATTAGAGGTGCAC  
GTAAGCCACCAAGGGAGTCTGCCTTCTTTGGGCATGCCTCATGTTAGGTGTTGGATCTCCAGAG  
ATAACCACGTGTCCGGATCGAGTGGAATAAATGGTCAATAAACATGGGACAACGGCTGGTCC  
CTCTACCACGAATGAACGAAGTGGTGAGAGCTTAAGTTGGCCGGTTAAGAGCTTAGGCGTCATT  
TTCAATCCTCGTGCCG

**HIGS 47** (zum Teil basierend auf den EST-Sequenzen von HO15J13S und HO15J13w)

CTCATTCAAGATTTATCAAATCCTACCTCATCAATAAACCGAGACACACCGACATGGACTACAGA  
ACTCTTCGCCAGCTATGCCTCTGTTGTAGATGCACTAGCACCTTATCCTAATGTTCTTGGCTTCTTT  
GCTGGCAATGAAGTTTCAAATGAGGTTAACAATACGCAAGCGAGCGCATTTCGTAAGGCAGCAG

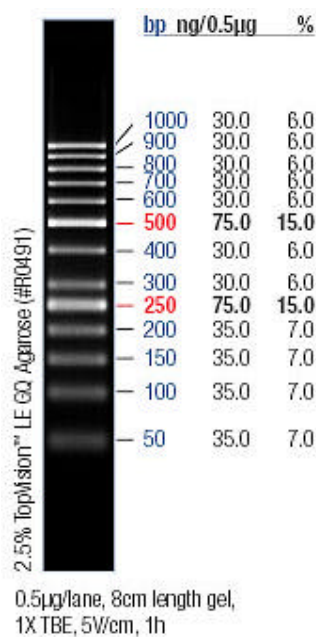
TTCGAGATATAAAAGCGTACATAAAAACAAAGAATTATCGACCCATAGGCGTAGGATATGCTAC  
 CAATGATGATCCTGCTATCCGTATTCCTCTAGCTCATTACTTTAACTGTGGCGATCGGGATGACTC  
 AATCGACTTTTGGGGTTATAACATATATTCTTGGTGTGGCGATTTCGTCCTTTACTGACTCAGGCTA  
 CGACCAACGTACTCTAGAGTTTGCCAAC TATTCTGTTCTGCCTTCTTTGCCGAATATGGCTGCAA  
 TCAAATCCGTCCTCGCAAATTTACCGAGGTTCAAGCCATATATGGTAAACAAATGACTAATGTTT  
 GGTCTGGTGAATTATGTACATGTA CTTC AAGAAGCAAATGACTTTGGTCTTGTTAAAGTCAAA  
 AGTGGTAAGGTTGAGAAGTTACCAGACTTCTCTGCCTTGGCCAAACA ACTCAACTCGGTTTCTCC  
 CAGCAACACTCCAGCTTCTGCATATTCAGTTACCAACACCGTAGCACAAGCATGTCCTGCCACTG  
 GTGTGTCTTGGTCTGCTTCTAGTGTCTTGCCTCCTATCGCAAATCCTGACCTATGCAAATGCATGG  
 TGTCATCTTACTTGTGCTGCCAACCCAAATTTATCCGATAAAGATATCGGGgGCCTTTTCAGCT  
 CTGTGTGTGGTCTCgATAAAAAGTCATGCGAGGGCATTAGCGCCAATGCTACTACTGGAAAATAT  
 GGTGCTTACTCTATGTGTTTGCCAAAAGAGCAACTATCGTTTGCCATGGACCAGTACTATAAGTCT  
 CAGAAAAAAGCACCGACTGCCTGTA ACTTTGGTGGAAATGCGAAGATCCAATCCGCATCAGTGG  
 CTGGATCTTGTGAAAACTACTCGAAGAAGCCGGATCGTCTGGCACAGGTGTAGTAACTGCGGTA  
 CCAACCAATGCTGGGTCTTCTTGA ACTCTGGCGGGAAATCCAGCAAAGTAGCTCTGCTGGTGC  
 AGTGACCATTCTCGCATGAATATGGATTTTGTGCAATTAGGGATGACTTGGTGACATTAGCTAT  
 GGCGGGGGCATGCATGATTCTGTTGTAGTCAGTATGTA ACTTGGACGTTTCACGTGTTGGTGGTTT  
 TGAATTTCTTGTA AACTTTAGTCAATAGCGAAATGGAGAACTATCCTTTACTAAAAAAAAAAAA  
 AAAAAA

#### 6.4 Beschreibungen der verwendeten Größenstandards



**Abb. 6.1:** Größenstandard SmartLadder von Eurogentec (SERAING)

Quelle: <http://www.eurogentec.com/uploads/TDS-MW-1700-10.pdf>



**Abb. 6.2:** Größenstandard ‚GeneRuler 50bp DNA Ladder‘ (Fermentas)

Quelle: <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/generulers.htm#50bp>

## 6.5 Expressionsdaten der ausgesuchter Kandidatengene

**Tab. 6.22:** Accession-Nr. der EST-Klone, deren Expressionsdaten (Both et al., 2005b) in Abb. 4.1 verwendet wurden

Kandidaten-ID	Accession-Nr.	Kandidaten-ID	Accession-Nr.
HIGS 2	AW791359.1	HIGS 32	AW791879.1
	AW792021.1		AW788299.1
	AW789106.1		AW791207.1
HIGS 13	AW791498.1	HIGS 35	AW791828.1
			AW791939.1
HIGS 20	AW791970.1		AW791669.1
	AW791304.1		AW791528.1
	AW792643.1		AW790864.1
	AW792608.1		AW791222.1
HIGS 25	AW790943.1	HIGS 47	AW789466.1
HIGS 31	AW791082.1	HIGS 9	AW791418.1
	AW792103.1		
	AW788438.1		
	AW788107.1		
	AW791548.1		

## 7. Zusammenfassung

Obligat biotrophe Phytopathogene wie der Getreidemehltau *Blumeria graminis* stellen eine ernstzunehmende Gefahr für die Landwirtschaft dar. Trotzdem ist diese Pathogengruppe noch relativ unerforscht, und ihre molekulare Analyse gestaltet sich als schwierig, weil diese Pilze sich nicht auf künstlichen Medien kultivieren lassen. Dadurch sind genetische Transformation oder die Kultivierung von Mutanten schwierig wenn nicht unmöglich.

In dieser Arbeit wurde das Phänomen des *host-induced gene-silencing* (HIGS) in *B. graminis* vorgestellt. Dabei war es möglich durch *in planta* exprimierte RNAi-Konstrukte gegen pilzliche Gene die Anfälligkeit des Wirt-Pathogen-Systems zu reduzieren.

Mittels TIGS-Experimenten konnte in der Gersten-*Bgh*-Interaktion für zehn unterschiedliche Gene aus *Bgh* nachgewiesen werden, dass die Expression von RNAi-Konstrukten im Wirt zu einer Reduktion der Anfälligkeit führt.

Für drei dieser Kandidatengene konnte dieser Effekt mittels VIGS-Experimenten mit BSMV in der Weizen-*Bgt*-Interaktion bestätigt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass RNAi unterschiedlicher Gene zu unterschiedlichen Wachstumsstörungen bei *Bgt* führte. So konnte durch RNAi gegen *BgGTF1* eine verringerte Haustorienbildung und durch RNAi gegen *BgGTF2* verringertes Hyphenwachstum induziert werden.

Mittels mehrerer transgener Gerstenlinien, die ein RNAi-Konstrukt gegen *BgGTF1* trugen, wurde der Beweis erbracht, dass HIGS auf der Expression des RNAi-Konstruktes im Wirt beruht und nicht auf der Aufnahme von Plasmid-DNA durch den Pilz.

Es wurden drei Arbeitshypothesen aufgestellt. Die erste Hypothese, welche besagt, dass HIGS auf der Aufnahme von Plasmid-DNA oder BSMV-Partikeln beruht, konnte mit den Experimenten an den transgenen Pflanzen widerlegt werden.

Die zweite Hypothese besagt, dass der Pilz mRNA in die Wirtszelle sekretiert, um den Stoffwechsel des Wirts zu seinen Gunsten zu manipulieren. HIGS findet also in der Wirtszelle statt.

Die dritte Hypothese schlägt vor, dass das RNAi-Konstrukt im Wirt exprimiert wird, der Pilz unspezifisch dsRNA oder siRNA-Moleküle aufnimmt, und das *Silencing* des Zielgens im Pilz stattfindet.



Es wurde kein schlüssiger Nachweis für die Sekretion von pilzlichen Transkripten in den Wirt erbracht, und es war auch nicht möglich nachzuweisen, dass der Transkriptgehalt des Zielgens im Pathogen durch HIGS herunterreguliert wurde. Anhand der durchgeführten Experimente ließ sich nicht nachweisen, ob das *Silencing* der Zielsequenz im Pathogen stattfindet oder in der Pflanze, nachdem der Pilz mRNA in seinen Wirt sekretiert hatte. Weitere Experimente unter Verwendung von *in situ* Techniken können möglicherweise Aufschluss über die Wirkungsweise von HIGS geben.

## Summary

Obligate biotrophic phytopathogens such as the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* represent a serious danger for agriculture. Nevertheless this group of pathogens is still relatively unexplored, and its molecular analysis is quite difficult because these fungi cannot be cultivated on artificial media. Thus genetic transformation or the cultivation of mutants is difficult if not impossible.

In this work the phenomenon of host-induced gene-silencing (HIGS) in *B. graminis* was described. Thereby it was possible to reduce the susceptibility of the host-pathogen-system through *in planta* expressed RNAi constructs against fungal genes.

By means of TIGS experiments it could be demonstrated that the expression of ten different RNAi constructs against genes from *Bgh* reduces the susceptibility of the barley-*Bgh*-interaction.

For three of these candidate genes this effect could be confirmed by means of VIGS experiments using BSMV in the wheat-*Bgt*-interaction. In addition it was shown that it was possible to inhibit fungal growth at different stages with antisense constructs against these candidate genes. RNAi of *BgGTF1* caused a reduced haustorium formation whereas RNAi against *BgGTF2* reduced hyphal growth.

By means of several transgenic barley lines, which carried an RNAi construct against *BgGTF1*, evidence was provided that HIGS is based on the expression of the RNAi construct in the host and not on uptake of plasmid DNA by the fungus.

Three working hypotheses were raised. The first hypothesis, which says that HIGS is based on the uptake of plasmid DNA or BSMV particles could be disproven by the results from transgenic plants.

The second hypothesis suggests secretion of mRNA by the fungus into the host cell in order to manipulate the host metabolism in favour of infection. Silencing through HIGS takes place in the host cell.

The third hypothesis proposes that the RNAi construct in the host is expressed and the fungus inadvertently absorbs dsRNA or siRNA molecules and silencing of the target gene takes place in the fungus.

No conclusive proof for the secretion of fungal transcripts into the host was produced and it was not possible to prove that the transcript abundance of the target gene in the pathogen was reduced by HIGS. With the preformed experiments it was not possible to prove whether silencing of the target sequences takes place in the pathogen or in the plant after the fungus secreted mRNA into its host.

More dedicated experiments including *in situ* techniques will be required to obtain a clearer picture as to the mode of action of HIGS.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

geboren am 08. August 1977 in Remscheid

Geschlecht: weiblich

Familienstand: ledig

## Schulbildung

1984 – 1988      Grundschule in Remscheid  
1988 – 1997      Gymnasium in Remscheid  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

## Studium

10/1997 – 09/1999    Grundstudium der Biologie an der Universität Osnabrück  
Diplomvorprüfungen in den Fächern Botanik, Zoologie, Physik und  
Allgemeine Chemie

10/1999 – 03/2003    Hauptstudium in Biologie an der Universität Göttingen  
Hauptfach: Botanik; Nebenfächer: Mikrobiologie und Biochemie  
Abschluss: Diplom-Biologin mit der Abschlussnote ‚sehr gut‘

05/2002 – 03/2003    Diplomarbeit am Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissen-  
schaften der Universität Göttingen bei Prof. Dr. R. Tischner zum  
Thema ‚Expressionsstudien zum Nitrattransporter von *Chlorella* und  
Identifikation seiner Promotorregion‘

05/2004 – 06/2008    Doktorarbeit am Institut für Pflanzengenetik und  
Kulturpflanzenforschung in Gatersleben zum Thema: Pflanzen-  
vermittelte Unterdrückung der Genexpression in *Blumeria graminis* –  
Eine neuartige Methode zur Erzeugung von Resistenz

## Publikationen

Koltermann M., Moroni A., Gazzarini S., Nowara D., Tischner R.

Cloning, functional expression and expression studies of the nitrate transporter gene from *Chlorella sorokiniana* (strain 211-8k)

Plant Mol Biol 2003 Jul 52(4): 855-64

Douchkov D., Nowara D., Zierold U. and Schweizer P.

A high-throughput gene-silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells

MPMI 2005; 18 (8): 755-761

Dong W., Nowara D. and Schweizer P.

Protein polyubiquitination plays a role in basal host resistance of barley

Plant Cell 2006;18 (11):3321-31

## Vorträge

Evidence for plant-mediated gene silencing in *Blumeria graminis*

Jahrestagung der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft (DPG)

März 2006 in Berlin, Deutschland

## Poster

Host-induced gene silencing in *Blumeria graminis*

XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions

Juli 2007 in Sorrento, Italien

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden, die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden.

Des Weiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Halle/Saale, Juni 2008