



Etablierung einer Mehltaresistenz in Weizen durch Suppression von MLO

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologe Jan Hendrik Riechen

geboren am 25.02.1979 in Lübeck

(2012)

Referent: Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen

Korreferent: Dr. habil. Patrick Schweizer

Tag der Promotion: 26.01.2012

Zusammenfassung

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung einer Resistenz gegen Mehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) bei Weizen, die durch RNAi-vermittelte Abregulation von endogenem *Mlo* erzielt werden soll. Dem Transmembran-Protein MLO ist die Funktion eines zentralen Regulators des programmierten Zelltodes zugeschrieben und *mlo*-Gerstenpflanzen weisen eine vollständige Penetrationsresistenz gegen Gerstenmehltau auf.

Für die Etablierung der Resistenz wurden Weizenpflanzen der Zuchtlinie Bobwhite durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer unter Verwendung einer *Mlo*-RNAi Expressionskassette erstellt, die durch den epidermisspezifischen *GstA1*-Promotor reguliert ist. Neben diesen im Rahmen dieser Arbeit erstellten Linien standen bereits vor Beginn der eigenen experimentellen Arbeiten weitere, mittels biolistischem Gentransfer generierte Bobwhite Linien zur Verfügung, die ein funktionell identisches RNAi-Konstrukt tragen. Um für die Analysen genetisch homogenes Material verwenden zu können, wurden aus den biolistisch-transformierten Weizenlinien mittels embryogener Pollenkultur doppelhaploide (vollständig homozygote) Linien erzeugt. Die Identifikation potentiell homozygoter Linien, die aus der Agrobakterien-vermittelten Transformation stammen, erfolgte hingegen anhand von Segregationsanalysen des Selektionsmarkergens *HPT* in der T2-Generation.

Eine phänotypische Evaluierung der Mehltau-Anfälligkeit der homozygot transgenen Linien im Vergleich zu Wildtyp Pflanzen erfolgte mittels Blattsegmentbonituren. Die Linien, die in diesen Analysen die geringsten Anfälligkeitswerte zeigten, wurden einer detaillierteren molekularbiologischen Charakterisierung unterzogen. Diese umfasste den Nachweis der transgenen Sequenz auf genomischer Ebene mittels PCR, die Bestimmung der Anzahl der Transgenkopien in Gel-Blot Experimenten und die Bestimmung der Transkriptabundanz von endogenem *Mlo* in einer *real-time* RT-PCR.

Dabei wurden zwei transgene doppelhaploide Linien identifiziert, die eine statistisch signifikante Verminderung der Anfälligkeit gegenüber Mehltau im Vergleich zum Wildtyp zeigten und eine hohe Anzahl (>5) an Transgenkopien aufwiesen. Zudem konnten weitere transgene Linien mit einer geringeren Anzahl an integrierten Transgenkopien identifiziert

Zusammenfassung

werden. Diese zeigten zwar nach Inokulation mit *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* im Vergleich zum Wildtyp konsistent niedrigere Mittelwerte der Anfälligkeit, ein statistisch signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht belegt werden.

Die Studie ergab, dass die Abregulation von *Mlo* auch bei Weizen zu einer verringerten Anfälligkeit gegenüber Mehltau führen kann, wie aus Gerste und Arabidopsis bekannt ist. Die Effektivität der RNAi-Konstrukte ist jedoch offensichtlich von ihrer im Genom der transgenen Linien vorliegenden Anzahl abhängig.

Stichworte: Mehltau, *Mlo*, Resistenz, RNAi, Weizen

Abstract

Abstract

Aim of this work has been the establishment of a powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) resistance in wheat by RNAi-mediated knockdown of endogenous *Mlo*. The transmembrane MLO protein is supposed to be a central regulator of programmed cell death. Barley *mlo* plants possess a broad-spectrum penetration resistance to the powdery mildew.

Stable transgenic wheat plants of the breeding line Bobwhite were generated by Agrobacterium-mediated gene transfer. The transformation was performed using a construct carrying an *Mlo*-RNAi expression cassette under control of the epidermis-specific *GstA1* promoter. In addition to these lines some Bobwhite lines which were transformed by biolistic gene transfer of a functionally identical *Mlo*-RNAi construct were already available at the beginning of the present study. In order to take advantage of genetically homogenous material in the following analysis the biolistically transformed lines were used to generate (entirely homozygous) doubled haploids by means of embryogenic pollen culture. Identification of putatively homozygous lines obtained *via* Agrobacterium-mediated transformation was performed by segregation analysis with regard to the selectable marker gene *HPT* in the T2 generation.

Rating of (homozygous) transgenic lines for susceptibility to powdery mildew in comparison to wild-type plants was performed by means of a detached leaf assay. Lines showing the lowest susceptibility values in preliminary tests were subjected to further detailed molecular analysis, which included the detection of the transgenic sequence at the genomic level by PCR, the determination of transgene copy numbers by gel blot analysis as well as the quantification of transcript abundance of endogenous *Mlo* using real-time RT-PCR.

In this study two high (>5) copy doubled haploid lines were identified that showed a statistically significant reduction in susceptibility after being challenged by powdery mildew in comparison to wild-type plants. In addition several low copy lines consistently showed lower mean values of susceptibility in comparison to the wild-type controls, yet statistical significance of this difference was not found.

Abstract

The results of this study suggest that a reduced susceptibility to powdery mildew can be achieved by down-regulation of *Mlo* in wheat, as is already known in barley and Arabidopsis. However the efficiency of RNAi constructs is apparently dependent upon their copy number present in the genome of the transgenic lines, suggesting that RNAi in wheat is a quantitative phenomenon.

Keywords: *Mlo*, powdery mildew, resistance, RNAi, wheat

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung und Vorkommen von Weizen.....	1
1.2 Echter Getreide Mehltau.....	3
1.3 Pflanze-Pilz Interaktion	4
1.4 Resistenzen und Abwehr von Mehltau	6
1.4.1 Rassenspezifische Resistenz	8
1.4.2 <i>mlo</i> -Resistenz.....	9
1.4.2.1 MLO	9
1.4.2.2 Mechanismus der Resistenz und pleiotrope Nebeneffekte in <i>Mlo</i> -Mutanten.....	11
1.5 Posttranskriptionelle Gensuppression (RNAi)	14
1.6 Genetische Transformation.....	21
1.7 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material und Methode	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Antibiotika	25
2.1.2 Oligonukleotide.....	25
2.1.3 Enzyme	25
2.1.4 Allgemein verwendete Medien und Lösungen	26
2.1.4.1 Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	26
2.1.4.2 Medien für die Anzucht von Bakterien.....	26
2.1.4.3 Medien für die Transformation und Regeneration von Weizen.....	27
2.1.4.4 Medien für die Mikrosporenkultur.....	30
2.1.5 Verwendete Vektoren	31
2.1.6 Bakterienstämme.....	32
2.1.7 Pathogene	33

Inhaltsverzeichnis

2.1.8 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen.....	33
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA	34
2.2.1.2 Isolierung von RNA.....	35
2.2.1.3 Plasmid-Isolation	35
2.2.1.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäure.....	35
2.2.2 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.3 Auftrennen von DNA-Proben durch Agarosegelelektrophorese.	38
2.2.4 Elution von DNA aus Agarosegelen	39
2.2.5 Gel-Blot Analyse	39
2.2.5.1 Restriktion genomischer Weizen-DNA.....	39
2.2.5.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	40
2.2.5.3 Kapillarblot	41
2.2.5.4 Erstellung von DIG-markierten Sonden durch PCR	41
2.2.5.5 DNA-Hybridisierung und Nachweis spezifischer DNA- Sequenzen	41
2.2.6 Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	42
2.2.7 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen ..	44
2.2.7.1 Kompetente <i>E. coli</i>	44
2.2.7.2 Kompetente Agrobakterien des Stammes <i>AGL-1</i>	45
2.2.7.3 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen.....	45
2.2.7.4 Transformation von Agrobakterien	46
2.2.8 Biolistische Transformation von Weizen	46
2.2.9 Agrobakterien-vermittelte Transformation von Weizen	46
2.2.9.1 Isolierung unreifer Embryonen.....	46
2.2.9.2 Anzucht der Agrobakterien.....	47
2.2.9.3 Kokultur unreifer Embryonen mit Agrobakterien	47
2.2.9.4 Kallusentwicklung und Regeneration von Pflanzen.....	48
2.2.10 Erstellung doppelhaploider Weizenpflanzen.....	48
2.2.10.1 Anzucht und Ernte des Donormaterials.....	49

Inhaltsverzeichnis

2.2.10.2	Oberflächensterilisation der unreifen Ähren	49
2.2.10.3	Isolierung und Vorbehandlung unreifer Pollen	50
2.2.10.4	Isolierung und Vorkultur von Stempeln	51
2.2.10.5	Embryogene Pollenkultur	51
2.2.10.6	Regeneration	52
2.2.10.7	Ploidiebestimmung	53
2.2.11	Statistische Auswertung	53
2.2.12	Inokulation mit <i>Bgt</i> und Durchführung der Phänotypisierung	54
3	Ergebnisse	57
3.1	Analyse der <i>GstAl_P::TaMlo</i> -RNAi Nachkommenschaften	58
3.1.1	Erstellung der homozygoten <i>GstAl_P::TaMlo</i> -RNAi Linien und deren Nachkommenschaften	58
3.1.2	Sequenzierung von <i>HvMla</i>	62
3.1.3	Bewertung der Anfälligkeit der <i>GstAl_P::TaMlo</i> -RNAi-DH Linien gegenüber <i>Bgt</i>	64
3.1.4	Einzelblattevaluierung der Anfälligkeitsausprägung ausgewählter <i>GstAl_P::TaMlo</i> -RNAi-DH Linien gegen <i>Bgt</i>	68
3.1.5	Molekularbiologische Charakterisierung ausgewählter <i>pGstAl_P::TaMlo</i> -RNAi-DH Linien	72
3.1.5.1	PCR-basierte Segregationsanalyse anhand der <i>Mla</i> -Intronsequenz	72
3.1.5.2	Nachweis der <i>TaMlo</i> -RNAi <i>repeats</i> in genomischer DNA der ausgewählten <i>GstAl_P::TaMlo</i> -RNAi-DH-Linien	74
3.1.5.3	Gel-Blot-Hybridisierung	76
3.1.5.4	Semi-quantitative Expressionsanalyse der endogenen <i>Mlo</i> -Abundanz in epidermaler cDNA	80
3.1.5.5	Abundanz von <i>Mlo</i> -RNA in Epidermis und Restblatt	83
3.1.6	Analyse zur Spezifität der RNAi Sequenzen im Konstrukt <i>GstAl_P::TaMlo</i> -RNAi	86
3.2	Analyse der <i>pGstAl_P::HvMlo</i> -RNAi Pflanzen	88
3.2.1	Erstellung des Vektors <i>pGstAl_P::HvMlo</i> -RNAi	88
3.2.2	Analyse zur Spezifität der RNAi Sequenzen im Konstrukt <i>GstAl_P::HvMlo</i> -RNAi	89

Inhaltsverzeichnis

3.2.3	Gentransfer des <i>pGstAI_P::HvMlo</i> -RNAi Konstruktes mittels <i>A. tumefaciens</i> in Weizen	93
3.2.4	Identifikation von putativ homozygoten T2-Familien mittels Segregationsanalyse des <i>HPT</i> -Gens	94
3.2.5	Nachweis der <i>HvMlo</i> -RNAi- <i>repeats</i> in genomischer DNA der <i>GSTAI_P::HvMlo</i> -RNAi T2-Linien	99
3.2.6	Gel-Blot-Hybridisierung mit einer <i>HPT</i> -Sonde	101
3.2.7	Phänotypisierung der <i>GstAI_P::HvMlo</i> -RNAi Linien	103
4	Diskussion	105
4.1	Transformationsmethode und Transformationseffizienz	105
4.2	Methode der Resistenzbewertung	109
4.3	Molekularbiologische Analysen der <i>GstAI_P::Mlo</i> -RNAi vermittelten Resistenz in Weizen	112
4.3.1	<i>GstAI_P::TaMlo</i> -RNAi DH-Linien	112
4.3.2	<i>GstAI_P::HvMlo</i> -RNAi Linien	122
5	Ausblick	127
6	Literatur	129

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AGT	Appressorialer Keimschlauch (<i>appressorial germ tube</i>)
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
As	antisense
Avr-Gen.....	Avirulenz-Gen
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis f.sp. hordei</i>
<i>Bgt</i>	<i>Blumeria graminis f.sp. tritici</i>
Blast	<i>Basic local align search tool</i>
Bp	Basenpaare
CAMV	Blumenkohl Mosaik Virus (<i>Cauliflower mosaic virus</i>)
cDNA.....	komplementäre DNA
DCL	<i>DICER-like</i>
DIG	Digoxigenin
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tage nach Infektion (<i>days post infection</i>)
dpp	Tage nach Bestäubung (<i>days post pollination</i>)
dsRNA	Doppelstrang-RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESH.....	elongierte sekundäre Hyphe (<i>elongated secondary hyphe</i>)
f. sp.....	Forma specialis
FRET.....	<i>fluorescent resonance energy transfer</i>
g	mittlere Erdschwerebeschleunigung ($1 g = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
<i>GAPDH</i>	<i>GLYCERINALDEHYD-3-PHOSPHAT DEHYDROGENASE</i>
<i>GSTA1</i>	<i>GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE A1</i>
h	Stunde (<i>hour</i>)
<i>HPT</i>	<i>HYGROMYCIN PHOSPHO TRANSFERASE</i>
HR	hypersensitive Reaktion
<i>Hv</i>	<i>Hordeum vulgare</i> (Gerste)
IE	unreife Embryonen (<i>immature embryos</i>)
IPK	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung

Abkürzungsverzeichnis

LB	linke Erkennungssequenz der T-DNA (<i>left border</i>)
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
miRNA	<i>micro RNAs</i>
<i>Mla</i>	<i>mildew locus A</i>
<i>Mlo</i>	<i>mildew locus O</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
<i>PAMP</i>	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
<i>PAT</i>	PHOSPHINOTRICIN ACETYL TRANSFERASE
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDS	PHYTOENE DESATURASE
PGT	Primärer Keimschlauch (<i>primary germ tube</i>)
PGTS	<i>posttranscriptional gene silencing</i>
PLS	<i>physiological leaf spots</i>
<i>Pm-Gen</i>	<i>R-Gene in Weizen</i>
PRB	AG Pflanzliche Reproduktionsbiologie
RB	rechte Erkennungssequenz der T-DNA (<i>right border</i>)
RdRPs	<i>RNA dependant RNA polymerases</i>
<i>R-Gen</i>	Resistenz-Gen
<i>RISC</i>	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz (Technologie)
<i>Ror-Gen</i>	<i>Required for mlo resistance-Gen</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
siRNA	small interfering RNA
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive
T0	transgene Generation 0 (Primärtransgene)
T1	transgene Filialgeneration 1
T2	transgene Filialgeneration 2

Abkürzungsverzeichnis

T3	transgene Filialgeneration 3
<i>Ta</i>	<i>Triticum aestivum</i> (Weichweizen)
T-DNA	DNA-Sequenz, die durch <i>A. tumefaciens</i> in das pflanzliche Genom integriert wird	
TG1	transgene Linie 1
TG2	transgene Linie 2
Ti-Plasmid	<i>tumor-inducing plasmid</i> (aus <i>A. tumefaciens</i>)

1 Einleitung

Belegt durch archäobotanische Funde gehörte der Vorläufer des modernen Weizens zu den Pflanzen, die als erstes von Menschen genutzt wurden. Das geographische Zentrum der intensiven Nutzung des Weizens konnte auf das Gebiet östlich des Mittelmeeres über Ostanatolien bis ins Euphrat- und Tigris-Stromland eingegrenzt werden („fruchtbarer Halbmond“), wobei der Anbau und die Zucht von Einkorn in der Region Nordsyrien schon um etwa 10.000-9.000 v. Chr. nachgewiesen wurde (Zohary 1988). Ein wichtiges Zuchtziel war neben dem Kornertrag und der Standfestigkeit auch seit jeher die Selektion von krankheitsresistenten Sorten, da besonders in Monokultur angebaute Pflanzen kontinuierlich einer Vielzahl von unterschiedlichen Krankheitserregern mit epidemischem Potenzial ausgesetzt sind. Pathogene Pilze stellen neben Bakterien und Viren eine der Hauptursachen von Pflanzenkrankheiten dar. Jedes Jahr kommt es zum Befall von Weizenbeständen durch das weltweit verbreitete pilzliche Pathogen Mehltau, welches zu erheblichen Ernteeinbußen führt.

1.1 Bedeutung und Vorkommen von Weizen

Mit Weizen wird eine Reihe von Pflanzenarten der Gattung *Triticum* L. bezeichnet, die zu der Familie der Süßgräser (*Poaceae*) gehören. Die Gattung umfasst die sechs Spezies *Triticum monococcum* (AA Genom), *Triticum urartu* (AA Genom), *Triticum turgidum* (AABB Genom), *Triticum timopheevii* (AABBGG Genom), *Triticum aestivum* (AABBDD Genom) und *Triticum zhukovsky* (AAAAGG Genom). Die Gattung wird zusätzlich je nach dem Ploidiegrad der Spezies in drei Sektionen eingeteilt. Sektion Monococcum besteht aus den diploiden Spezies, Sektion Dicoccoidea aus den tetraploiden Spezies und Sektion Triticum aus den hexaploiden Spezies. Die Sektion Dicoccoidea enthält agronomisch genutzte Arten wie Hartweizen (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) wobei die Sektion Triticum Dinkel (*Triticum aestivum* subsp. *spelta*) und Weichweizen (*Triticum aestivum* subsp. *aestivum*) beinhaltet. Dabei ist

Einleitung

Weichweizen aus der gesamten Gattung mit Abstand die wirtschaftlich wichtigste Spezies (Carena 2009).

Weichweizen ist ein kleistogames einjähriges Gras, welches die größte Anbaufläche aller Kulturpflanzenarten einnimmt und damit eine der größten Kalorienquellen der Menschheit bildet. Die Produktionsmenge von Weizen belief sich im Zeitraum von 2007-2008 auf 683 Millionen metrische Tonnen weltweit und liegt damit nur knapp hinter Reis und Mais (FAO, 2008).

Weichweizen findet vorrangig in der menschlichen Ernährung sowie als Tierfutter Verwendung. Es gibt jedoch noch eine Vielzahl anderer Produkte, bei denen Weizen als Ausgangsstoff dient. Aus den Karyopsen werden Stärke, Gluten und Öl gewonnen, die in weiteren Veredelungsschritten zu Produkten wie Papier, Klebstoff, Verdickungsmittel, kosmetischer Puder, Creme, Verpackungsmaterial sowie Dämmschaum verarbeitet werden (Kahlon 1989; Popineau *et al.* 2002; Maningat and Seib 2010). Ein an Bedeutung gewinnender ökonomischer Einsatz von stärkehaltigen Substanzen liegt in der Herstellung von Bioethanol durch Fermentation (Carena 2009). Ebenfalls findet das vegetative Pflanzenmaterial neben der traditionellen Verarbeitung zu Textilien, Filtern und Sorptionsmitteln auch als Energielieferant bei der Verfeuerung Anwendung (Carena 2009).

T. aestivum verfügt über ein allohexaploides Genom ($2n=6x=42=AABBDD$). Es umfasst $\sim 16 \times 10^9$ Basenpaare und anhand von Analysen des D-Genoms konnte abgeleitet werden, dass etwa 90% des Genoms aus repetitiven Sequenzen bestehen (Li *et al.* 2004). Der genetische Ursprung des Weizens ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass *T. aestivum* über keinen ohne den Einfluß des Menschen entstandenen hexaploiden Vorfahren verfügt (Kilian *et al.* 2007). Eine treibende Kraft in der Diversifizierung der Gattung *Triticum* war die Allopolyploidisierung durch Hybridisierung mit der Gattung *Aegilops*. Die Entstehung des Weichweizens erfolgte durch die Hybridisierung des tetraploiden Weizens *Triticum turgidum* (AABB Genom) mit *Aegilops tauschii* (DD Genom)

Einleitung

(Kihara 1965). Der Ursprung des B-Genoms ist noch umstritten (Kilian *et al.* 2007), wobei das A-Genom aus dem wilden diploiden Weizen *T. urartu* stammt (Dvorak *et al.* 1993).

1.2 Echter Getreide Mehltau

Der echte Getreide Mehltau *Blumeria graminis* ist ein Erreger von Pflanzenkrankheiten, die durch Ascomyceten (Schlauchpilze) der Ordnung Erysiphales verursacht werden (Hückelhoven 2005). Die Erysiphales sind eine monophyletische Gruppe obligat biotropher Ektoparasiten, die sowohl dikotyle als auch monokotyle Pflanzen in ihrem Wirtsspektrum aufweisen. *B. graminis* befällt ausschließlich Gräser wie Weizen, Gerste, Roggen, Hafer sowie verschiedene andere monokotyle Pflanzen, die jedoch nur von einer speziellen Unterform (forma specialis, f.-sp.) des Pilzes befallen werden können. Das Wirtsspektrum dieser spezialisierten Unterformen beschränkt sich auf die jeweilige Art der Wirtspflanze wobei eine Infektion einer nah verwandten Spezies praktisch ausgeschlossen ist. Somit ist z.B. die Unterform *B. graminis* f. sp. *hordei*, die auf Gerstenarten spezialisiert ist, nicht in der Lage Weizenarten zu befallen und ebenso ist *B. graminis* f. sp. *tritici* auf Weizenarten in seinem Wirtsspektrum begrenzt.

Eine Infektion mit Mehltau führt in den gemäßigten Klimazonen in der Regel zu einem Ertragsverlust von 5-15% bei Gerste bzw. Weizen. In Ausnahmefällen kann dieser bis zu 25% betragen. Pflanzen, die von *B. graminis* befallen sind, weisen einen charakteristischen Phänotyp auf. Auf den befallenen Blättern bildet sich ein weißes Myzel, welches runde bis ovale Pusteln aufweist. Physiologisch wirkt sich der Befall der Pflanze durch eine eingeschränkte Photosyntheseleistung aus, während gleichzeitig die Transpirations- und Respiationsleistung der Pflanze ansteigt. Als Konsequenz ergibt sich eine Verminderung der Anzahl von Seitentrieben und Ähren, des Wurzelwachstums und des Kornertrages, der

Einleitung

insbesondere aufgrund verminderter Korngöße sowie des Proteingehalts der Körner beeinträchtigt wird.

Die Ausbreitung von Mehltau erfolgt über Konidien. Konidien sind asexuell entstandene Sporen, die in einer Vielzahl gebildet und durch den Wind verbreitet werden. Da eine einzelne Mehltaukolonie bis zu 200.000 Konidien hervorbringen kann, reichen schon vereinzelt Kolonien aus, um im Feldanbau eine epidemieartige Befallssituation hervorzurufen.

Neben der asexuellen Vermehrung des Pathogens durch Konidien ist auch eine sexuelle Form bekannt. Dabei bilden sich Ascosporen in Kleistothecien aus, die dem Pathogen neben der genetischen Rekombination die Möglichkeit bietet, ungünstige Umweltbedingungen wie z.B. Trockenheit (Johnston 1997) in einer Dauerform zu überbrücken.

1.3 Pflanze-Pilz Interaktion

Die zytologischen Vorgänge während einer Infektion sind in der Gersten-*B. graminis* f. sp. *hordei*-Interaktion ausgiebig studiert worden. Sie beginnen mit der Landung eines Konidiums auf dem Blatt des potentiellen Wirtes. Zuerst bildet das Konidium eine extrazelluläre Matrix aus, welche sowohl der Anheftung (Wright *et al.* 2002) als auch der Kommunikation zwischen dem Wirt und dem Pathogen dient (Zhang *et al.* 2005).

Anschließend bildet sich nach etwa 30 Minuten der primäre Keimschlauch (PGT), welcher nach zwei Stunden mit einer Länge von 5-10 µm fertig ausgebildet ist. Die Funktion des PGT ist noch nicht abschließend geklärt und dient vermutlich der Wasseraufnahme als auch der Erkennung des Wirtes (Carver and Bushnell 1983; Carver and Ingerson 1987).

Der zweite Keimschlauch, auch appressorialer Keimschlauch genannt (AGT), bildet sich etwa 3-8 Stunden nach dem ersten Kontakt mit dem Wirt. Er verfügt

Einleitung

über eine Länge von 30-40 μm und bildet am Ende eine hakenförmige Struktur, die als Appressorium bezeichnet wird. Das Appressorium bringt wiederum den so genannten Penetrationsschlauch hervor, der zur Durchdringung der Zellwand des Wirtes dient. Die treibende Kraft bei der Überwindung der pflanzlichen Zellwand ist dabei eine Kombination aus enzymatischer Lyse der Zellwand und eines punktuell ausgeübten Druckes des Pilzes, der durch Turgor erzeugt wird (Francis *et al.* 1996; Pryce-Jones *et al.* 1999).

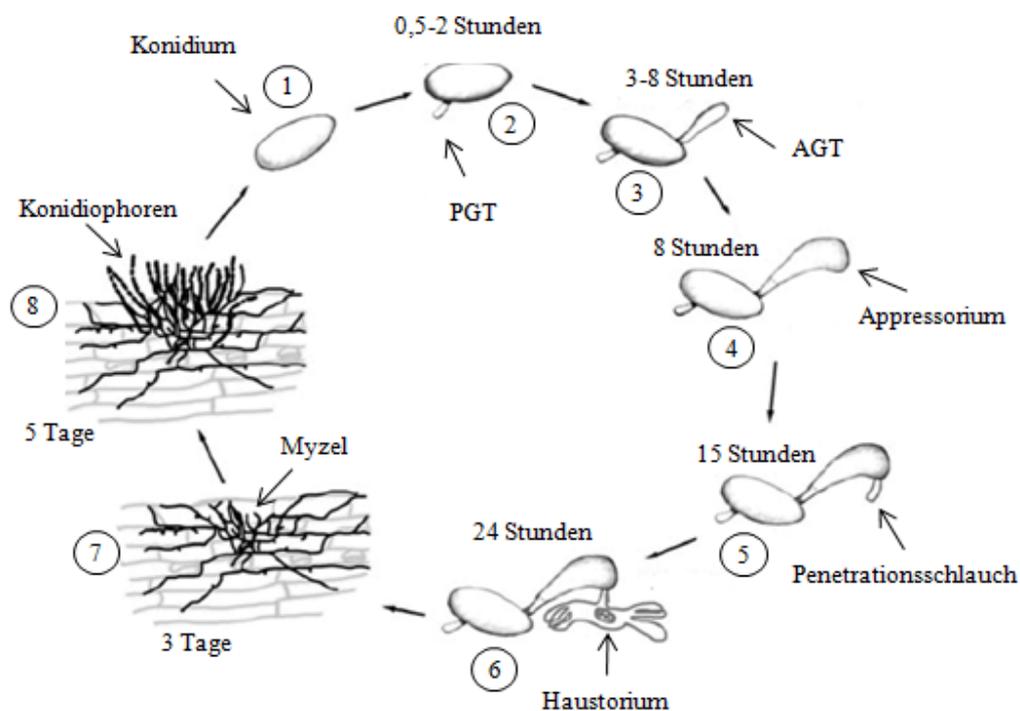


Abb. 1: Asexueller Lebenszyklus von *B. graminis* (abgewandelt nach (Both *et al.* 2005)). Nach der Landung des Konidiums auf der Blattoberfläche des Wirtes bildet sich zuerst der primäre Keimschlauch („PGT“) und anschließend der appressoriale Keimschlauch („AGT“). Der AGT differenziert sich danach weiter zu einem Appressorium aus, welches nach etwa 15 Stunden einen Penetrationsschlauch ausbildet. Nachdem der Penetrationsschlauch die Zellwand der Epidermiszelle überwunden hat, formt sich ein Haustorium. Nach etwa drei Tagen kommt es zu der Bildung von makroskopisch sichtbarem Myzel, welches nach weiteren zwei Tagen Konidiophoren bildet, von denen sich neue Konidien abschnüren.

Einleitung

Nachdem die Zellwand durchdrungen ist, bildet sich aus dem Penetrationsschlauch das Haustorium aus. Dabei handelt es sich um eine Struktur des Pilzes, die der Aufnahme von Nährstoffen dient und sich zwischen der Zellwand und der Plasmamembran der Wirtszelle etabliert. Morphologisch besteht das Haustorium aus einem zentralen blasenförmigen Körper, aus dem an den Polen bis zu zehn fingerförmige Ausstülpungen eine Oberflächenvergrößerung bewirken. Dabei erreicht ein durchschnittliches Haustorium eine Gesamtoberfläche von 120-150 μm^2 (Zhang *et al.* 2005).

Nach der Etablierung des Haustoriums ist die Voraussetzung der Nährstoffversorgung gesichert und die weitere Proliferation des Pilzes findet auf der Blattoberfläche in Form von elongierten sekundären Hyphen (ESH) statt. Diese ESHs bilden wiederum neue AGTs aus, die weitere Epidermiszellen befallen und sekundäre Hyphen hervorrufen. Nach drei bis vier Tagen ist die Mehltaukolonie so weit entwickelt, dass sie makroskopisch erkennbar ist. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zur Produktion von Konidiophoren, von denen sich reife Konidien abschnüren (Abb. 1).

Während des gesamten Proliferationszyklus interagiert *B. graminis* ausschließlich mit Epidermiszellen des Wirtes. Es kommt nicht zu einer Ausbildung von Haustorien in einer anderen Gewebeschicht und auch das Myzel des Pilzes bleibt auf die Blattoberfläche beschränkt. *Blumeria graminis* befällt auf diese Weise ausschließlich nur die oberirdischen vegetativen Pflanzenteile.

1.4 Resistenzen und Abwehr von Mehltau

Da es sich bei *Blumeria* um ein sehr weit verbreitetes Pathogen handelt, welches auch zu erheblichen Ertragseinbußen führt, wird kontinuierlich an Maßnahmen zu dessen Bekämpfung gearbeitet. Neben der Verwendung von Fungiziden werden auch natürliche Resistenzmechanismen untersucht und genutzt. Dabei wurden stellvertretend für Getreide anhand des Pathosystems Gerste-Mehltau ausführliche

Einleitung

Analysen durchgeführt, die zur Unterscheidung von sechs verschiedenen Mechanismen der Resistenzvermittlung führten (Jorgensen 1994). Dazu zählen die Nichtwirts-Resistenz (Heath 2000; Schweizer 2007), die Basalresistenz (Jones and Dangl 2006), die rassenspezifische Resistenz, die *mlo*-vermittelte Resistenz, die partielle Resistenz (Jorgensen 1994), die induzierte Resistenz (Jorgensen 1994; Kogel and Langen 2005) sowie die passive Resistenz (Jorgensen 1994). Im Folgenden soll auf einige grundlegende Resistenzformen als auch auf ausgewählte spezielle Formen der Resistenz eingegangen werden, die in der Arbeit Anwendung fanden.

Neben der Nichtwirts-Resistenz basiert das Immunsystem von Pflanzen grundsätzlich auf der Basalresistenz, die durch weitere individuell vererbte rassenspezifische Resistenzen ergänzt werden kann. Die Nichtwirts-Resistenz ist dabei definiert als die robuste Resistenz aller Genotypen einer Pflanzen-Spezies gegenüber allen bekannten Rassen und Isolaten einer nicht angepassten pathogenen Spezies und stellt die stärkste und dauerhafteste Form der Resistenz dar.

Bei dem Befall einer potentiellen Wirtspflanze durch ein Pathogen stellt die Basalresistenz die erste Linie der Abwehr nach der Überwindung von präformierten physikalischen Barrieren wie Trichomen oder einer wachshaltigen Kutikula dar. Die Basalresistenz beschreibt zudem die Fähigkeit der Pflanze, anhand von konservierten Rezeptoren eine Vielzahl von ebenso hoch konservierten pathogenen Motiven zu erkennen und daraufhin eine Abwehrreaktion einzuleiten. Diese hoch konservierten Motive des Pathogens werden übergreifend als *PAMPs* (*pathogen associated molecular pattern*) bezeichnet. Die Basalabwehr stellt wahrscheinlich auch einen Teil der Nichtwirts-Resistenz dar, kann aber von wirtsangepassten Pathogenen unterdrückt werden. Eine Taktik des Pathogens zur Unterwanderung der Basalresistenz des Wirtes ist der Einsatz von speziellen Molekülen, die als Effektoren oder Virulenzfaktoren

Einleitung

bezeichnet werden. Diese Moleküle dienen dazu, die Wahrnehmung des Pathogens durch die Pflanze zu vermeiden oder die Immunantwort des Wirtes zu unterdrücken. Eine Gegenmaßnahme der Wirtspflanze gegen diese Umgehung der Basalabwehr stellt die rassenspezifische Resistenz da, die im Folgenden näher dargestellt werden soll.

1.4.1 Rassenspezifische Resistenz

Die rassenspezifische Resistenz der Wirtspflanze beruht auf Resistenzgenen (*R*-Genen), welche es ihr ermöglichen, Pathogenrassen zu erkennen, die über das korrespondierende Avirulenzgen (*Avr*-Gen) verfügen. Nicht selten handelt es sich bei den von dem Pathogen eingeschleusten Effektoren (Virulenzfaktoren) zur Unterdrückung der Basalabwehr um die Moleküle, die im Ergebnis der Koevolution als Avirulenzfaktoren vom Wirt erkannt werden. Kommt es bei einem Befall zu einer direkten oder indirekten Interaktion der Genprodukte des *R*-Gens mit dem entsprechenden *Avr*-Gen, wird in der infizierten Wirtszelle eine Abwehrreaktion eingeleitet (Dangl and Jones 2001). Diese spezifische Interaktion wurde als Gen-für-Gen Hypothese schon erstmals 1942 durch Flor formuliert und in den folgenden Jahren vielfach bestätigt (Flor 1971). Bei dieser Abwehrreaktion handelt es sich in der Regel um eine hypersensitive Reaktion (HR), die mit dem kontrollierten Absterben der attackierten Zelle endet.

Ein Beispiel hierfür ist das *R*-Gen *Mla* der Gerste. Wird eine Epidermiszelle, die über das Genprodukt von *Mla-1* verfügt, von einem Mehltau infiziert, welcher wiederum das korrespondierende *Avr*-Gen exprimiert, kommt es zu der Einleitung des Zelltodes in eben dieser Zelle, die eine weitere Ausbreitung des Pathogens verhindert (Hückelhoven *et al.* 1999).

Bei Gerste werden die Loci, auf denen die *R*-Gene liegen, allgemein als *Ml(Lokus)* bezeichnet, wobei die *R*-Gene, die in der Interaktion von Weizen und

dem korrespondierendem *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* fungieren, als *Pm*-Gene bezeichnet werden (Singrun *et al.* 2003; Yahiaoui *et al.* 2006; Wicker *et al.* 2007).

1.4.2 *mlo*-Resistenz

Sowohl in der monokotylen Gerste (*Hordeum vulgare*) als auch in der dikotylen Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) ist die Anwesenheit einer respektive drei (spezifischen/r) Isoform(en) des heptahelicalen Plasmamembranmoleküls MLO notwendig, um eine Infektion durch Mehltau zu ermöglichen. Bei *mlo* handelt es sich um eine monogene Resistenz, die aufgrund ihrer Beständigkeit gegenüber allen bekannten Mehltausisolaten als Breitbandresistenz bezeichnet wird (Jorgensen 1992). Im Gegensatz zu rassenspezifischen Resistenzen, die üblicherweise nach spätestens einigen Jahren von dem Pathogen überwunden werden, tragen in Deutschland sowie in Großbritannien seit 1993-94 bereits 70% der angebauten Sommergerstensorten das rezessive *mlo*-Allel (Lyngkjaer *et al.* 2000). Trotz dieser langen und intensiven Nutzung ist bisher noch kein wesentlicher Bruch der Resistenz zu verzeichnen. Dies unterstreicht den hohen praktischen Nutzen dieser Resistenz.

1.4.2.1 MLO

Das aus Gerste isolierte WT-Allel (Wildtyp) von *Mlo* umfasst 1.599 Basenpaare (bp) und kodiert für ein 533 Aminosäuren (AS) umfassendes Protein, dem eine Funktion als negativer Regulator des programmierten Zelltods zugeschrieben wird (Büschges *et al.* 1997). Die aus der AS-Sequenz abgeleitete Topologie des Proteins beschreibt ein integrales Transmembranprotein, welches in der Plasmamembran lokalisiert ist und in dieser mit sieben hydrophoben Helices verankert ist (Devoto *et al.* 1999). Der cytoplasmatische C-Terminus besitzt eine amphiphile α -Helix, die als Calmodulin Bindedomäne fungiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine kalziumabhängige Bindung von Calmodulin einen entscheidenden Einfluss auf die vermittelten Resistenzeigenschaften hat. *In vivo* Versuche zeigten eine um die Hälfte verminderte Anfälligkeit in WT-

Einleitung

Pflanzen, in denen die Calmodulin-Bindung gestört war (Kim *et al.* 2002). Vorläufige Daten geben Grund zu der Annahme, dass MLO Homooligomere bildet und auch mit verschiedenen Domänen aus dem Zytoplasma interagiert (Elliott *et al.* 2005). Zudem konnten an *Mlo*-Gersten Mutanten gezeigt werden, dass Punktmutationen in der zweiten und dritten zytoplasmatischen Region eine besonders starke Auswirkung auf die Ausbildung der Resistenz nehmen. Dies lässt darauf schließen, dass diese Regionen eine besondere Funktion für die Gersten Mehltau Interaktion darstellen müssen (Panstruga *et al.* 2010).

Der Nachweis der ersten Weizen *Mlo*-Homologe erfolgte durch die Hybridisierung einer Wurzel-cDNA Bank mit einer *Mlo*-Sonde aus Gerste. Dabei wurden die drei homologen Sequenzen *TaMlo-1A*, *TaMlo-1B* und *TaMlo-1D* identifiziert (Elliott *et al.* 2002). Durch die mittlerweile vollständige Sequenzierung des Reis- (*Oryza sativa*) und des Ackerschmalwand- (*A. thaliana*) Genoms ist zudem bekannt, dass diese Modellpflanzen eine Vielzahl an *Mlo*-Homologen aufweisen. In *A. thaliana* konnten 15 *Mlo*-Homologe (Devoto *et al.* 2003) und in *O. sativa* zwölf homologe *Mlo*-Sequenzen (Liu and Zhu 2008) identifiziert werden. Anhand der damit vorliegenden *Mlo*-Sequenzen aus *A. thaliana* und *O. sativa* konnten durch einen Abgleich von cDNA Datenbanken in einer *in silico* Analyse bisher insgesamt sieben *Mlo*-Homologe in *T. aestivum* identifiziert werden (Konishi *et al.* 2010). Die Homologe weisen eine eher geringe Sequenzhomologie auf Aminosäureniveau auf, die eine Spanne von 26% bis zu 51% zwischen den einzelnen Homologen umfasst (Konishi *et al.* 2010). Zudem zeigten Expressionsanalysen in einer *real-time* PCR in Spross- als auch in Wurzel Proben aus zwei Wochen alten Pflanzen eine differenzierte Expression der einzelnen Homologe, nachdem man sie unter osmotischen oder Salz-Stress Bedingungen angezogen hatte (Konishi *et al.* 2010).

1.4.2.2 Mechanismus der Resistenz und pleiotrope Nebeneffekte in *Mlo*-Mutanten

Die Abwesenheit der *Mlo*-Genfunktion durch natürliche (Piffanelli *et al.* 2004) oder künstliche Mutationen (Büschges *et al.* 1997; Piffanelli *et al.* 2002) führt zu dem Unvermögen des Gerstenmehltaus, die Zellwand der Wirtszelle zu durchdringen. Dies hat seine Ursache in der Bildung von Papillen (lokal induzierte Zellwandverstärkungen) an den Infektionsstellen, die eine Penetration der Zellwand durch das Pathogen verhindern. Bei der Bildung von Papillen handelt es sich keineswegs um ein für die *mlo*-Resistenz spezifisches Phänomen, sondern es kann ebenso in der basalen als auch Nichtwirts-Resistenz und nach einer Verwundung beobachtet werden (Aist 1976).

Neben der Mehлтаuresistenz zeigen Gersten *mlo*-Mutanten, die nicht von einem Mehлтаubefall betroffen sind, die spontane Bildung von Papillen, physiologische Blattflecken (PLS) sowie eine verfrühte Blattseneszenz. Diese pleiotropen Nebeneffekte führen zu einem verminderten Ertrag in nicht infizierten Beständen von etwa fünf Prozent und weisen darauf hin, dass die Abwesenheit von MLO einen regulatorischen Einfluss auf die Bildung der Papillen und die Einleitung des Zelltods hat (Wolter *et al.* 1993).

Diese pleiotropen Nebeneffekte könnten auch der Grund sein, weshalb es in der Evolution von Gerste nicht zu einer Selektion des *mlo*-Genotyps gekommen ist. Das einzige natürliche Auftreten der *mlo*-Resistenz konnte in einer Gersten-Landrassen in Äthiopien beschrieben werden (Jorgensen 1992). Es ist anzunehmen, dass die natürlichen *mlo*-Mutanten durch einen temporär hohen Selektionsdruck durch Pathogenbefall aufgetreten sind und nachträglich das Merkmal durch menschliche Selektion fixiert wurde. Somit wird offenbar das *Mlo*-Allel in der natürlichen Selektion bevorzugt.

Der mechanistische Zusammenhang zwischen der Abwesenheit von MLO und dem Auftreten der pleiotropen Nebeneffekte konnte experimentell noch nicht

Einleitung

eindeutig geklärt werden. Allerdings war die Bildung der spontanen Appositionen auf Epidermiszellen beschränkt und abhängig von dem Alter sowie dem Genotyp der Pflanzen (Wolter *et al.* 1993). Obwohl sich die spontan gebildeten Papillen gegenüber den Mehltau-induzierten Papillen hinsichtlich verschiedener histochemischer Färbungen von Callose (Resorzin-Blau, Anilin-Blau) glichen, konnte eine Diskrepanz zwischen den beiden Papillentypen anhand einer Fuchsin Färbung nachgewiesen werden. Dabei ließen sich die Pathogen-induzierten Papillen durch Fuchsin anfärben, während dies in den spontan gebildeten Papillen nicht möglich war. Ein weiterer Aspekt, in dem sich die *mlo*-Resistenz gegenüber einer rassenspezifischen *R*-Gen vermittelten Abwehrreaktion unterscheidet, ist die fehlende Einleitung einer hypersensitiven Reaktion nach der Bildung der Papillen (Peterhänsel *et al.* 1997).

Neben einer erhöhten Sensibilität gegenüber abiotischem Stress zeigen *mlo*-Pflanzen eine weitere Besonderheit. Obwohl sie von der rassenspezifischen *mlo*-Resistenz gegenüber dem biotrophen Mehltaupilz geschützt sind, reagieren sie gegenüber hemibiotrophen Pilzen wie *Magnaporthe oryzae* (Reisbranderreger) anfälliger. Dieses Phänomen ist bei Pflanzen mit rassenspezifischen Resistenzen wie der *Mla*-Resistenz nicht zu beobachten (Jarosch *et al.* 1999).

Bei der Analyse der molekularen Grundlagen des Resistenzmechanismus wurde mit *Ror2* (*Required for mlo-resistance 2*) ein Gen kloniert, welches für die Vermittlung der Resistenz eine elementare Aufgabe leistet. In *ror2/mlo*-Mutanten konnte eine partielle Wiederherstellung der Anfälligkeit nachgewiesen werden (Freialdenhoven *et al.* 1996; Collins *et al.* 2003). *Ror2* kodiert für ein in der Plasmamembran lokalisiertes Syntaxin. Syntaxine gehören in die Protein-Superfamilie der SNARE-Proteine und damit zu elementaren Bestandteilen des Vesikelfusionsapparates in Eukaryoten (Bock *et al.* 2001). Studien zu der Lokalisierung der beiden Proteine zeigten, dass Fluorophor-markiertes ROR2 und MLO in einem transienten Ansatz an den Stellen akkumulierten, an denen der Pilz

Einleitung

die Penetration der Zellwand unternahm (Bhat *et al.* 2005). Zudem konnten in FRET (*fluorescent resonance energy transfer*) Analysen an Gerstenblättern als auch in *Yeast-split Ubiquitin* Experimenten eine direkte Interaktion zwischen ROR2 und MLO nachgewiesen werden (Bhat *et al.* 2005). Es ist somit vorstellbar, dass MLO die SNARE-vermittelten Vesikeltransportprozesse an der Plasmamembran durch Exozytose oder Vesikelfusionsprozesse moduliert (Bock *et al.* 2001; Collins *et al.* 2003; Schulze-Lefert 2004). Eine mögliche Funktion der Vesikel wäre dabei der Transport von regulatorischen Proteinen oder sekundären Metaboliten, die der Abwehr des Pathogens an der Penetrationsstelle dienen.

Obwohl es bisher noch kein klares zellbiologisches Modell für die Anfälligkeit auslösenden Eigenschaften des MLO-Proteins gibt, sind Theorien vorgestellt worden, die einen möglichen Ablauf des Infektionsprozesses zu erklären versuchen. Die erste Theorie beschreibt eine klassische Erkennung des Pathogens anhand von PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*) und der Induktion der Abwehr, die mit der Akkumulation der Stress-induzierten Proteine wie MLO und ROR2 an der Infektionsstelle abschließt. In diesem Szenario wird MLO/ROR2 als Ziel eines Effektors des Pathogens verstanden, der zu einer Unterdrückung der eigentlichen Abwehrreaktion führt (Abb. 2).

Einleitung

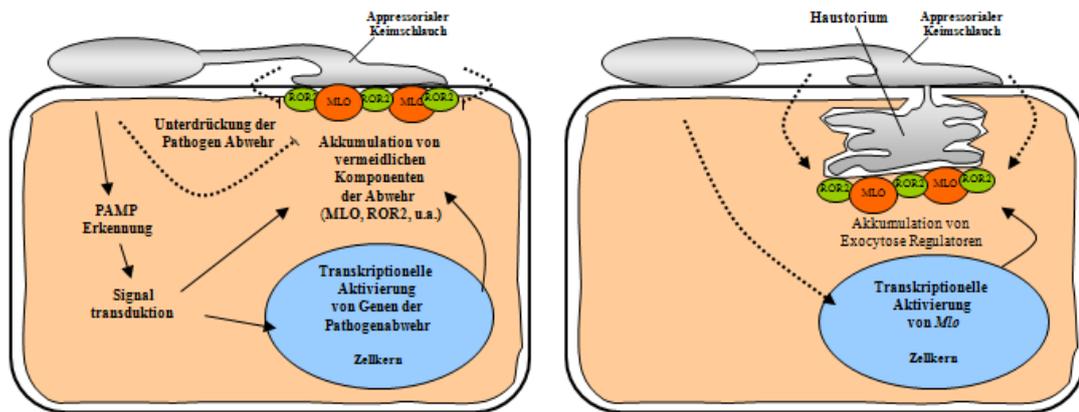


Abb. 2: Schematische Darstellung der Rolle von MLO und ROR2 während des Infektionsverlaufes von Mehltau in einer epidermalen Wirtszelle (Abbildung nach Panstruga, 2005). Eine der beiden Theorien über die Funktion von *Mlo* unterstützt die Rolle des MLO/ROR2 Komplexes als ein Ziel für pathogene Effektoren. Dabei kommt es nach der Erkennung der PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*) zur Aktivierung von Abwehrreaktionen seitens der Pflanze. Die Abwehrmaßnahmen werden durch Effektoren des Pathogens unterdrückt, die spezifisch mit dem MLO/ROR2 Komplex interagieren (linke Seite). In dem zweiten Szenario ist der MLO/ROR2 Komplex als Teil des Vesikelfusionsapparates notwendig, um den Einbau von Membranbestandteilen zu modulieren, die bei der Einstülpung der Plasmamembran während der Ausbildung des Haustoriums notwendig sind.

Ein weiterer Erklärungsansatz schlägt vor, dass es nach einer Infektion zu einer Induktion der Genexpression von *Mlo* und *Ror2* kommt, die wiederum lokal an der Penetrationsstelle akkumulieren. In diesem Fall wird der MLO/ROR2 Komplex in seiner Funktion als Vesikelfusionsregulator verstanden, der eine erhöhte Exocytoserate von Plasmamembranmaterial an der Penetrationsstelle einleitet, die für die Ausbildung des Haustoriums benötigt wird (Panstruga 2005).

1.5 Posttranskriptionelle Gensuppression (RNAi)

Eine der wichtigsten Herausforderungen der postgenomischen Ära ist die Untersuchung der Funktion einzelner Gene. Eine direkte Herangehensweise für diese Aufgabe ist die Inaktivierung eines Gens durch Veränderungen der codierenden DNA-Sequenz. Die Manipulation des Genoms durch die Insertion von Transposons bzw. von T-DNA Sequenzen ist eine gängige Praxis für die Erzeugung von Mutanten (Page and Grossniklaus 2002). Diese Methode ist zwar

Einleitung

für einige Modellpflanzen sehr effizient, kann aber nicht beliebig auf andere Spezies übertragen werden. Dabei sind verschiedene Aspekte, wie die fehlende Kenntnis der genomischen Sequenz, eine allgemeine Unzugänglichkeit der Pflanze für die genetische Transformation im Hochdurchsatz oder hohe genetische Redundanz durch Polyploidie zu nennen. Eine Alternative zu der Manipulation der genetischen Information auf der genomischen Ebene bietet der Mechanismus der RNA-Interferenz-Technologie (RNAi).

Bisher konnten verschiedene Wege der RNA-abhängigen Gensuppression in Pflanzen identifiziert werden. Ein Signalweg zur post-transkriptionellen Gen Suppression (PTGS, *post transcriptional gene silencing*) führt über die cytoplasmatische siRNA- (small interfering RNA) Suppression (Hamilton and Baulcombe 1999). Eine weitere Möglichkeit bietet die negative Regulation der Genexpression von endogenen *messengerRNAs* (mRNAs), die durch Bindung an eine spezifische microRNA (miRNA) direkt für den Abbau markiert werden oder in der Translation arretiert werden. Dieser Signalweg dient der Pflanze für post-transkriptionelle Expressionsregulierung während der Entwicklung und als Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren (Baulcombe 2004). Die dritte aus Pflanzen bekannte Form der RNA-vermittelten Gensuppression erfolgt durch die Methylierung von Histonen, die zu der Unterdrückung der Transkription führt. Diese Transkriptionssuppression (TGS, *transcriptional gene silencing*) durch DNA-Methylierung kann dabei sowohl durch virale oder transgene RNAs (Wassenegger *et al.* 1994; Mette *et al.* 2000) als auch durch siRNAs (*small interfering RNAs*) (Zilberman *et al.* 2003) induziert werden.

Für die in der Arbeit angewendete Form der Expression von doppelsträngigen RNA-Fragmenten (dsRNA) wird angenommen, dass sie eine Gensuppression über den siRNA-Signalweg induzieren. Es ist aber nicht auszuschließen, dass auch exogene dsRNAs für den miRNA-vermittelten Signalweg rekrutiert werden (Baulcombe 2004). Im Folgenden sollen die grundlegenden Mechanismen der

Einleitung

siRNA-vermittelten Gensuppression dargestellt werden. Die Einleitung einer siRNA-bedingten Gensuppression erfolgt durch die Präsenz von doppelsträngiger RNA im Cytoplasma der Wirtszelle und dient der Pflanze ursprünglich als Schutz vor Viren. Das Erbgut pflanzlicher RNA-Viren liegt als einzelsträngige (ssRNA) oder direkt als doppelsträngige RNA in dem Cytoplasma der Wirtszellen vor. Im Falle von ssRNA Strukturen kann die Bildung von dsRNA-Strukturen z.B. durch Replikation-Intermediate oder als Sekundärstrukturen einer selbstkomplementären ssRNA erfolgen. Alternativ kann die initiale Bildung einer dsRNA aus einer aberranten RNA auch durch eine *de novo* Synthese des komplementären Stranges ohne die Abhängigkeit einer doppelsträngigen Initialsequenz (Primersequenz) geschehen. Dafür sind eine Gruppe von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (RdRPs) verantwortlich, die sowohl für die Einleitung als auch für die Aufrechterhaltung des PTGS und des TGS eine zentrale Rolle spielen. Wie in diesem Fall die Identifikation einer solchen aberranten ssRNA im Vergleich zur endogenen mRNA erfolgt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings wird bisher die Hypothese favorisiert, dass die Identifikation über die fehlenden Prozessierungsmerkmale einer endogenen mRNA wie z.B. der Erkennung des CB-Proteins (*cap-binding protein*) oder dem Poly-A Schwanz erfolgt (Baulcombe 2004). Jedoch kann auch die Überexpression eines Transgens zu der Einleitung von PTGS führen, wie in *A. thaliana* gezeigt wurde. Bei diesem als Kosuppression bezeichneten Phänomen wiesen hoch exprimierende Transgene mit einem WT-Hintergrund nur 20% des Expressionsniveaus von Transgenen mit einem *sgs2*-Hintergrund (100%) auf, die über keine funktionellen RdRPs verfügen (Butaye *et al.* 2004).

Nach der Bildung wird die dsRNA im Cytoplasma der Pflanze durch ein DICER-ähnliches RNaseIII-Enzym (DCL) (Hamilton and Baulcombe 1999; Zamore *et al.* 2000; Djikeng *et al.* 2001; Tang and Galili 2004) erkannt und unabhängig von der Sequenz in doppelsträngige RNA-Fragmente (siRNAs, *small interfering RNAs*) geschnitten. Die Entstehung der miRNAs erfolgt parallel zu den siRNAs durch

Einleitung

DCL-Enzyme. Sie werden jedoch aus endogenen inversen repetitiven RNA-Sequenzen gebildet, die ihren Ursprung im Zellkern haben.

In *A. thaliana* sind bisher vier Mitglieder der DCL-Enzymfamilie identifiziert (Schauer *et al.* 2002), die zum Teil über redundante Funktionen verfügen. Dabei ist DCL-1 für die Biogenese von microRNAs (miRNAs) notwendig (Xie *et al.* 2004). DCL-3 hingegen ist für die Bildung von siRNA Fragmenten notwendig, die beim Chromatin assoziierten TGS eine Rolle spielen (Xie *et al.* 2004). Zudem bildet DCL-3 längere siRNA Fragmente (24 bp) als DCL-1 (21 bp) und ist bei der Regulation von Transposons beteiligt (Hamilton *et al.* 2002). Die Funktion von DCL-2 und DCL-4 konnten noch nicht eindeutig belegt werden, allerdings zeigen DCL-2 Mutanten ein temporär herabgesetztes siRNA Niveau nach dem Befall durch TCV (*turnip crinckle virus*) (Xie *et al.* 2004), obwohl andere Viren keine solche Reaktion induzierten. Dies lässt auf eine Funktion von DCL-2 in der siRNA-vermittelten Abwehr gegen Viren vermuten. Die Rolle von DCL-4 ist bisher unbekannt.

Nach der Bildung der initialen siRNAs kommt es zu der Bindung von einzelsträngigen siRNA- und miRNA-Fragmenten über Mitglieder der Proteinfamilie ARGONAUT (AGO), die im RISC Komplex (*RNA-induced silencing complex*) von zentraler Bedeutung sind. Die gebundene RNA-Sequenz dient dem RISC-Komplex als eine Art Sonde, die für die Erkennung aller komplementären Sequenzen in der Zelle erforderlich ist. Kommt es zur Hybridisierung einer komplementären Sequenz eines solchen aktivierten RISC-Komplexes, wird die so erkannte RNA wiederum spezifisch abgebaut.

Die Rolle der AGO-Proteinfamilie hat dabei eine zentrale Rolle in der RNA-vermittelten Gensuppression. In *A. thaliana* konnten zehn *Ago*-Homologe identifiziert werden, die unterschiedliche Funktionen haben. So sind AGO-1 Mutanten in *A. thaliana* nicht zur siRNA- und miRNA-vermittelten cytoplasmatischen Gensuppression und AGO-4 Mutanten zeigen kein Chromatin-

Einleitung

assoziiertes TGS (Zilberman *et al.* 2003). Die direkte Interaktion konnte in *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden, in der das AGO-2 Protein über die PAZ (piwi-argonaut-zwille) Domäne eine direkte Bindung mit der siRNA eingeht (Lingel *et al.* 2003). Hierbei war es in dem RISC Komplex lokalisiert, in dem es zu der Spaltung der Ziel-mRNA kam (Hammond *et al.* 2001). Zudem konnte in der Spaltheife (*Saccharomyces pombe*) ein AGO-Protein in dem RITS Komplex (*RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing complex*) identifiziert werden, welches für das Chromatin-assoziierten TGS notwendig ist (Verdel *et al.* 2004).

Der Effekt des PTGS wird zusätzlich verstärkt, indem die gebildeten siRNAs als Initialsequenzen (Primer) an komplementären Sequenzen für die Synthese weiterer dsRNA durch die RdRPs verwendet werden können. In dem Fall kann es auch zu einer Bildung von siRNA-Fragmenten kommen, die ihren Ursprung in einer endogenen mRNA-Sequenz des Wirts haben, die komplementär zu dem aktivierten ARGONAUT-RISC-Komplex ist. Dieser endogene Amplifikationsmodus kann selbst bei einer sehr geringen Expression bzw. beim Auftreten der dsRNAi Sequenz zu einer effizienten post-transkriptionellen Abregulation der Zielsequenz führen (Lipardi *et al.* 2001) (Sijen *et al.* 2001) (Abb. 3).

Einleitung

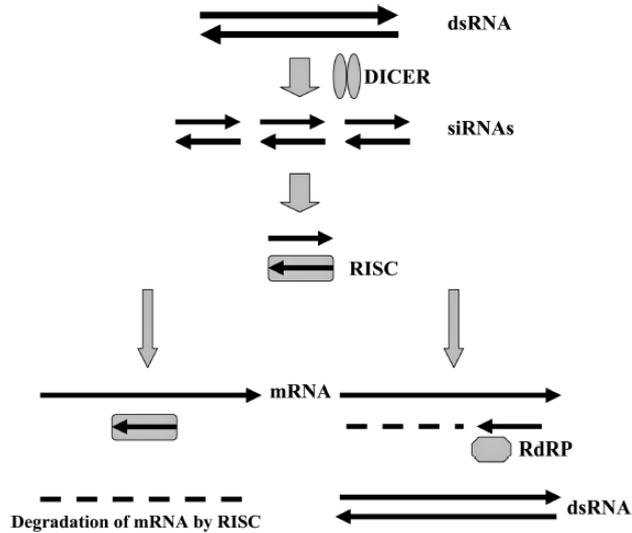


Abb. 3: Schematische Darstellung des RNAi-Prozesses (nach Travella et al, 2009). Der Prozess beginnt mit der enzymatischen Hydrolyse einer Doppelstrang RNA (dsRNA) durch das zytoplasmatisch lokalisierte Enzym DICER. Dabei werden siRNAs (small interfering RNAs) gebildet nachfolgend von einem Enzym namens RISC (*RNA induced silencing complex*) gebunden und als eine Art Sonde verwendet werden. Bindet dieser aktivierte RISC-Komplex eine zur Sonde komplementäre Sequenz, baut er diese ab. Eine Art selbst-amplifizierenden Effekt erhält der RNAi-Mechanismus durch RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRPs), die vorab gebildete siRNAs als Primer verwenden, um neue dsRNAs zu bilden und damit den RNAi-Effekt zu amplifizieren.

Eine der wichtigen Eigenschaften für eine antivirale Abwehr ist die zellübergreifende systemische Ausbreitung des Schutzes nach einer lokalen Infektion. Bei der Ausbreitung wird ein Kurzstrecken- und ein Langstreckentransportsystem unterschieden. Der Kurzstreckentransport umfasst die Reichweite von einigen Zellen und verläuft vermutlich über die Ausbreitung eines 21 bp-langen siRNA Signals (Himber *et al.* 2003) über die Plasmodesmen der Pflanze. Der Langstreckentransport hingegen beruht vermutlich auf 24 bp langen siRNA Fragmenten, da virale Proteine, welche die systemische Ausbreitung der RNAi Aktivierung hemmen, zudem auch die Bildung dieser siRNAs blockieren (Baulcombe 2004).

Einleitung

Die RNAi-vermittelte Abregulation von endogenen Transkripten wurde bereits sehr effizient bei verschiedenen Pflanzenspezies wie der Ackerschmalwand und Mais (McGinnis *et al.* 2007) als auch Weizen (Dubcovsky *et al.* 2007) gezeigt. Dabei vermitteln Konstrukte, die eine selbst-komplementäre RNA kodieren und deren einzelne invertierte RNA-Sequenzen durch ein Intron getrennt waren, eine bis zu 100%-ige Herabregulation der Zielsequenzen viraler bzw. endogener Gene (Smith *et al.* 2000).

In Weizen bietet sich die Anwendung der RNAi-vermittelten Expressionsregulierung besonders an, da diese Art über ein sehr großes Genom verfügt (16.000 Mb), welches zudem aus drei homöologen Teilgenomen besteht (A, B und D). Durch die drei Teilgenome des Weizens sind von der überwiegenden Anzahl der Gene zwei bis drei (homöologe) Kopien vorhanden, wobei die Mehrzahl dieser homöologen Gene auch koreguliert sind (Mochida *et al.* 2003). Dies führt zu einer hohen funktionellen Redundanz in hexaploidem Weizen, welche genetische Manipulation auf genomischer Ebene aufwendig und weniger erfolgversprechend macht.

Funktionelle Untersuchungen konnten belegen, dass eine transiente Expression von dsRNAi Konstrukten in Weizen- (und Gersten-) Epidermiszellen zu einer Herabregulation der Zielgene führt (Schweizer *et al.* 2000; Assaad *et al.* 2004; Douchkov *et al.* 2005). Ebenso konnte die Anwesenheit von siRNAs, RdRPs und die Bildung von DICER-ähnlichen Enzymen in Weizenkeimlingen nachgewiesen werden (Tang *et al.* 2003). Auch in stabil transformierten Weizenpflanzen, in die eine dsRNAi-Kassette gegen das Markergen *CHALCONE SYNTHASE* biolistisch eingebracht wurde, konnte über mehrere Generationen ein eindeutiger Phänotyp nachgewiesen werden (Travella *et al.* 2006). Dies zeigt, dass auch im hexaploiden Weizen der Einsatz von stabil exprimierten dsRNAi-Konstrukten nicht nur für die Genfunktionsanalyse Verwendung finden kann, sondern ebenso für die nutzungsorientierte Anwendung eine Bedeutung haben könnte.

1.6 Genetische Transformation

Die erste genetische Transformation von Pflanzen(zellen) erfolgte 1983 mit der Integration von bakteriellen Antibiotikaresistenzgenen durch das bodenbürtige, gram-negative Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* in Tabak (Barton *et al.* 1983; Herrera-Estrella *et al.* 1983). In den folgenden Jahren entwickelte sich das Methodenspektrum und erweiterte die Anzahl der transformierbaren Spezies auf über 50 Arten (Datta 2007). Wie auch für andere wirtschaftlich bedeutende Nutzpflanzen, bestand erhebliches Interesse an der genetischen Transformation von Weizen.

Ein Problem bei der Transformation von monokotylen Pflanzen, zu denen eine Vielzahl der agronomisch genutzten Pflanzen wie Reis, Mais, Gerste sowie Weizen gehören, ist, dass sie nicht dem natürlichen Wirtsspektrum von *A. tumefaciens* entsprechen und sich daher der Transformation auf diesem Wege als schwer zugänglich erweisen. Die erste genetische Transformation von Weizen erfolgte daher erst 1992 durch direkten Gentransfer mittels Partikelbeschuss (auch als „biolistische Transformation“ bezeichnet) von embryogenem Kallusgewebe (Vasil *et al.* 1992). Bei direktem Gentransfer handelt es sich um ein Verfahren, in dem freie Plasmid-DNA direkt in die Zielzelle eingebracht wird. In dem Fall des Partikelbeschusses werden kleine Gold- oder Wolframpartikel üblicherweise mit einem Gemisch von zwei Vektoren beschichtet, um eine ungekoppelte Integration in das Pflanzengenom zu favorisieren. Einer der Vektoren trägt das zu transformierende Effektorgen, während der zweite Vektor ein Selektionsmarkergen trägt. Diese Partikel werden dann durch den Druck von komprimiertem Helium entweder in Zellen von embryogenem Kallusgewebe oder direkt in Zellen von unreifen Embryonen geschossen. Bei einem Bruchteil der Zellen, die durch solch einen Partikel getroffen werden, kommt es zu einer stabilen Integration der transgenen DNA. Diese Zellen können dann durch Selektion und geeignete Proliferations- und Regenerationsmethoden vermehrt werden, um daraus transgene Pflanzen zu regenerieren.

Einleitung

Die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von Weizen wurde erstmals 1997 publiziert (Cheng *et al.* 1997). Die Grundlage der *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation beruht auf dem Vorkommen des Ti-Plasmids (*tumor inducing* Plasmid) und der damit verbundenen Fähigkeit der Agrobakterien, einen speziellen bakteriellen DNA-Abschnitt in das Genom der pflanzlichen Wirtszelle zu übertragen. Dieser spezielle DNA-Abschnitt wird als T-DNA bezeichnet und ist auf dem Ti-Plasmid lokalisiert. Zusätzlich trägt das Ti-Plasmid auch eine Gruppe von Genen, die als *vir*-Gene bezeichnet werden und die für die Erkennung, Aktivierung und Übertragung der T-DNA in das pflanzliche Genom verantwortlich sind. Die Erkennung der T-DNA-Sequenz erfolgt dabei durch flankierende Sequenzen, die je nach Lage als linke (LB, *left border*) bzw. rechte (RB, *right border*) Grenzsequenz bezeichnet werden. Nicht-modifizierte Agrobakterien tragen auf der T-DNA-Sequenz Gene, welche die Bildung einer tumorartigen Wucherung namens Wurzelhalsgalle an der Pflanze hervorrufen. Diese entsteht, indem die transformierten Zellen pflanzliche Hormone produzieren, die eine intensive Proliferation dieser Zellen anregt. Zudem produzieren diese Zellen auch je nach Agrobakterienstamm eine seltene Aminosäure, die nur von Agrobakterien verstoffwechselt werden kann und den Bakterien als C- und N-Quelle dient.

Für die biotechnologische Nutzung wurde das Ti-Plasmid isoliert und die T-DNA (einschließlich der Tumor-induzierenden Gene) mit den flankierenden LB- bzw. RB-Erkennungssequenzen durch molekularbiologische Methoden entfernt. Danach wurden die Tumor-induzierenden Gene, die auf der T-DNA lokalisiert waren, durch eine MCS (*multiple cloning site*) ersetzt und die LB-MCS-RB Sequenz in einen neuen Vektor eingebracht. Bei diesem neuen Vektor handelt es sich um einen so genannten *shuttle vector*, der sowohl eine Replikation in *Agrobacterium* als auch in *E. coli* zulässt. Nun können Gene, die für eine Transformation in Pflanzen von Interesse sind, *in vitro* in den *shuttle vector* eingebracht werden. Erfolgt die Transformation eines solchen *shuttle Vectors* in

Einleitung

einen Agrobakterienstamm, der ein Ti-Plasmid ohne eigene T-DNA trägt, erkennen die *vir*-Gene die rekombinante T-DNA *in trans* und übertragen diese bei geeigneten Bedingungen in eine pflanzliche Wirtszelle. In der Regel enthält die rekombinante T-DNA neben dem zu untersuchenden Gen zusätzlich ein Selektionsgen, welches der Anreicherung der transformierten Zellen in der Gewebekultur dient. Die funktionelle Kombination des *shuttle Vectors* mit der transgenen T-DNA-Sequenz und des im *Agrobacterium* verbliebenen entschärften Ti-Plasmids bezeichnet man als „Binärvektor“.

Mit den beiden gängigen Transformationsmethoden für Weizen sind sowohl verschiedene Vor- als auch Nachteile verbunden. Bei dem biolistischen Gentransfer wird eine Vielzahl von Genkopien durch einen physikalischen Prozess in die Pflanzenzelle eingebracht. Zum einen ist diese Methode nicht auf ein bestimmtes Wirtspektrum limitiert. Zum anderen werden typischerweise mehrere Transgenkopien pro Zelle in das pflanzliche Genom integriert (Hansen & Wright, 1999) und es kommt in vergleichsweise vielen Fällen zu einer unvollständigen Integration bzw. Rekombination der Sequenzen. Außerdem ist die für beide Gentransfermethoden erforderliche Präparation und Vorkultivierung der unreifen Embryonen sehr zeitaufwendig. Bezüglich der Transformationseffizienz sind mit beiden Methoden vergleichbare Werte erzielt worden (Hensel *et al.* 2009), wobei in der praktischen Routinearbeit etwa ein bis zwei transgene Pflanzen pro 100 inokulierten Embryonen erreicht werden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung und anschließende Analyse einer Mehltairesistenz bei Weizen durch die Abregulation des endogenen *Mlo*-Gens mittels RNAi.

Bisherige Versuche, eine *mlo*-vermittelte Resistenz im agronomisch bedeutenden Weizen mittels Selektion oder Mutation zu etablieren, scheiterten an der komplexen, amphitriploiden Organisation des Weizengenoms und der damit einhergehenden genetischen Redundanz. So wurden weder natürliche noch künstliche *mlo*-Weizenlinien gefunden. Eine biotechnologische Herangehensweise an dieses Problem soll im Folgenden vorgestellt werden.

Dabei wird eine *Mlo*-spezifische RNAi-Kassette unter der Kontrolle des epidermispezifischen Promotors *GstA1* exprimiert. Die Verwendung dieses Promotors dient dabei in erste Linie der Vermeidung der aus *mlo*-Gersten Mutanten bekannten pleiotropen Effekte. Dabei geht man von der Tatsache aus, dass in photosynthetisch aktivem Gewebe kontinuierlich ROS (*reactive oxygen species*) wie Superoxid (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet werden, die durch ihre starken oxidativen Eigenschaften ein starkes Zellgift darstellen. Kommt es in einer Zelle zu einer unzureichenden Entgiftung, leitet diese Zelle die Apoptose ein. Da *Mlo* als negativer Regulator des Zelltodes angesehen wird, beginnen *Mlo*-defiziente Zellen bereits bei einer vergleichsweise geringen ROS Akkumulation mit der Einleitung der Apoptose. Durch die gezielte Suppression von *Mlo* in der Epidermis, die zudem die einzige Gewebeschicht darstellt, mit der Mehltau interagiert, kann der Vorteil einer Mehltau-Resistenz genutzt werden, ohne dass die photosynthetisch aktiven Gewebe eine verringerte Toleranz gegenüber ROS aufweisen.

2 Material und Methode

2.1 Materialien

2.1.1 Antibiotika

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antibiotika-Stammkonzentration und der eingesetzten Endkonzentration bei der Anwendung. Alle aufgelisteten Antibiotika wurden als wässrige Lösung mit bidest. H₂O angesetzt, wobei Rifampicin in DMSO gelöst wurde.

	<u>Stammkonz.</u>	<u>Endkonz.</u>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Benzimidazol	40 mg/ml	200 ppm
Carbenicillin	10 mg/ml	100 µg/ml
Cefotaxim	200 mg/ml	500 µg/ml
Rifampicin	10 mg/ml	50 mg/ml
Spectinomycin	10 mg/ml	50 µg/ml

2.1.2 Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Metabion (Planegg, Deutschland). Eine Auflistung der verwendeten Primer ist in Abschnitt 2.2.2. gegeben.

2.1.3 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme sowie andere DNA-modifizierende Enzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland) bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet.

Material und Methode

2.1.4 Allgemein verwendete Medien und Lösungen

2.1.4.1 Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung von DNA

<u>1x TAE</u>		<u>1x TBE</u>	
Tris-Puffer, pH 7,85	242gl ⁻¹	Tris-Puffer	242gl ⁻¹
Eisessig	57,1ml ⁻¹	Borsäure	55gl ⁻¹
EDTA (0,5M, pH:8)	100ml ⁻¹	EDTA (0,5M, pH:8)	40 ml

10x Ladepuffer

Bromphenolblau	0,01% (w/v)
Glycerin	10% (v/v)
TAE	1x

2.1.4.2 Medien für die Anzucht von Bakterien

MG/L Medium

Mannitol	5g/l
L-Glutaminsäure	1g/l
KH ₂ PO ₄	250mg /l
NaCl	100mg /l
MgSO ₄	100mg /l
Biotin	4µl aus 1mg/10ml Stock
Trypton	5g/l
Hefeextrakt	2,5g/l
pH (mit KOH)	auf 7,0

für Festmedium

Agar (1,2%)	12g / l
-------------	---------

LB Medium

Trypton	10 gl ⁻¹
Hefeextrakt	5 gl ⁻¹
NaCl	5 gl ⁻¹
pH	auf 7,4
Agar	1,5% (w/v)

Material und Methode

SOC-Medium

Trypton	20 g ^l ⁻¹
Hefeextrakt	5 g ^l ⁻¹
NaCl	0,5 g ^l ⁻¹
KCl (1 M)	2,5 ml
pH:	7,0
(mit NaOH)	
Lsg. autoklavieren	
Sterilfiltriert dazu	
MgCl ₂ (1M)	10 ml
Glukose(1M)	20 ml

2.1.4.3 Medien für die Transformation und Regeneration von Weizen

Bei den hier dabei verwendeten Abkürzungen handelt es sich um MS (Murashige and Skoog, Duchefa Nr. M0221), K4N (Kumlehn *et al.* 2006), K4N Mikroelemente (Kumlehn *et al.*, 2006), B5 (Gamborg B5 Vitamin Mix; Duchefa Nr. G0415) und Hygromycin (Hygromycin B, Roche Nr. 10843555001). Die für die Medien verwendeten Komponenten wurden entweder durch Sterilfiltration (stf.) mit einem Flaschenaufsatzfilter („500ml Bottle Top Filter“, Corning Incorporated, Corning, USA) oder durch Autoklavieren (akl.) sterilisiert.

WPCM

MS Minerale	4,3gL ⁻¹
CuSO ₄	5µM
Glutamin	0,5gL ⁻¹
Maltose	40gL ⁻¹
Casein Hydrolysat	0,1gL ⁻¹
pH	5,8
Phytigel	2,5gL ⁻¹
<hr/>	
autoklavieren	
MS Vitamine, stf.	103,1mgL ⁻¹
Dicamba, stf.	8mgL ⁻¹

Material und Methode

WPTM

MS Minerale	4,3gL ⁻¹
CuSO ₄	5μM
Glutamin	0,5 gL ⁻¹
2,4-D	2mgL ⁻¹
Mannitol	63,75gL ⁻¹
Maltose	40gL ⁻¹
Casein	
Hydrolysat	0,1gL ⁻¹
pH	5,8
<hr/>	
autoklavieren	
MS Vitamine, stf.	103,1mgL ⁻¹

WCCM

MS Minerale	4,3 gL ⁻¹
L-Cystein	0,8gL ⁻¹
Glutamin	0,5gL ⁻¹
2,4-D	6mgL ⁻¹
Glucose	15gL ⁻¹
Saccharose	15gL ⁻¹
Casein Hydrolysat	0,1gL ⁻¹
pH	5,8
<hr/>	
autoklavieren	
MS Vitamine	103,1mgL ⁻¹
Acetosyringone	500μM

Material und Methode

WCIM

MS Minerale	4,3gL ⁻¹
CuSO ₄	5μM
Glutamin	0,5gL ⁻¹
2,4-D	2mgL ⁻¹
Maltose	40gL ⁻¹
Casein Hydrolysat	0,1gL ⁻¹
pH	5,8
Phytigel	3gL ⁻¹

autoklavieren

MS Vitamine, stf.	103,1mgL ⁻¹
Timentin, stf.	150mgL ⁻¹

WRM

K4N Mineralien	s. o.
B5 Vitamine, stf.	112 mgL ⁻¹
L-Glutamine	146 mgL ⁻¹
6-BAP	0,225 mgL ⁻¹
Maltose	36 gL ⁻¹
pH	5,8
Phytigel	3 gL ⁻¹
Timentin, stf.	150 mgL ⁻¹
Hygromycin, stf.	25 mgL ⁻¹

2.1.4.4 Medien für die Mikrosporenkultur

SMW1 Medium

CaCl ₂ x 2H ₂ O, stf.	1 mM
K Mikro Elemente, akl.	1x
KCl, stf.	20 mM
KH ₂ PO ₄ , stf.	1 mM
Maltose I, stf.	0,3 M
MES pH 6,5, stf.	
MgSO ₄ x 7H ₂ O, stf.	1 mM
NaFeEDTA, stf.	100 µM
NaOH	pH:6,5
A. bidest., akl.	ad Endvolumen
<hr/>	
Cefotaxime, stf.	100 mgl ⁻¹
2-HNA, akl.	12,5 mgl ⁻¹

WPM1 Medium

2,4-D, stf.	1mM
Gamborg B5 Vitamine	1000x
Glumaine, stf.	0,25M
Kinetin, stf.	1mg/ml
Maltose I, stf.	1M
NaFeEDTA, stf.	75mM
NaOH	6N
PAA, stf.	1mg/ml
WP Makro Elemente, stf.	10x
WP Mikro Elemente, stf.	1000x
A. bidest., akl.	ad Endvolumen
<hr/>	
Cefotaxime, stf.	200mg/ml
Timentin, stf.	40mg/ml

modifiziert nach Konzak
et al. 1999 (NPB99)

2.1.5 Verwendete Vektoren

Der verwendete Vektor *pGstA1_P::TaMlo-RNAi* basiert auf einem Derivat des Phagemids pBluescript (Stratagene, La Jolla, USA) und wurde von den Kooperationspartnern Patrick Schweizer der AG Transkriptomanalyse (IPK Gatersleben, Deutschland) sowie Ralph Panstruga des MPI für Züchtungsforschung (Köln, Deutschland) bereitgestellt.

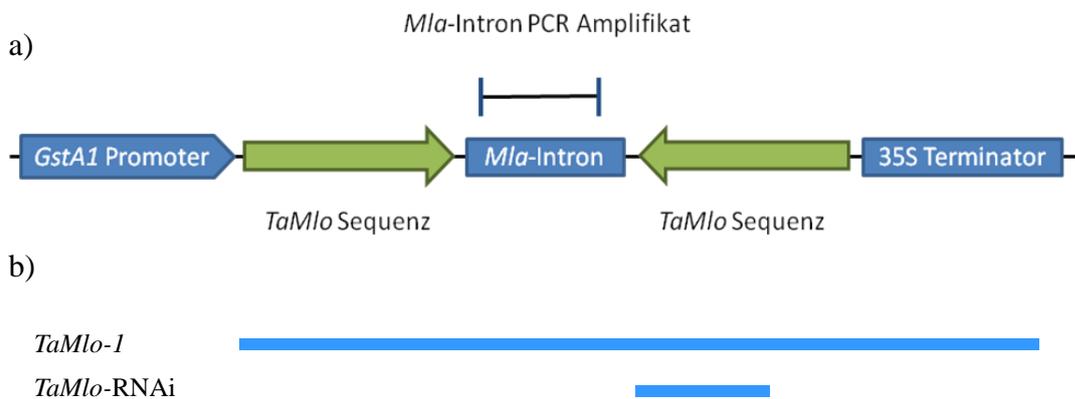


Abb. 4: a) Schematische Darstellung des Vektors *pGstA1_P::TaMlo-RNAi*, der für die biolistische Transformation verwendet wurde. Die Expression der *TaMlo*-RNAi-Kassette wird durch den epidermisspezifischen Promotor *GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE A1* (*GstA1*) aus Weizen gesteuert. Die in dem Vektor verwendeten *Mlo*-Sequenzen stammen aus Weizen und unterscheiden sich ausschließlich hinsichtlich der Orientierung innerhalb des Vektors. Die beiden *Mlo*-Sequenzabschnitte sind durch ein *Mla*-Intron aus Gerste unterbrochen. Den Abschluss der RNAi-Kassette bildet ein *CaMV 35S* Terminator („Cauliflower mosaic virus“ = Blumenkohl Mosaik Virus). b) Schematische Lage des 304 bp langen *TaMlo*-RNAi Sequenzabschnitts in der cDNA Sequenz von *TaMlo1* (GenBank: AF361933).

Der Vektor trägt eine RNAi-Kassette mit einer 304 bp langen Sequenz aus der *TaMlo-1* cDNA (GenBank: AF361933; von Bp 480-784) unter Kontrolle des epidermisspezifischen *GstA1*-Promotors aus Weizen (Altpeter *et al.* 2005). *Sense*- und *antisense*-Strang werden von einem *Mla*-Intron aus Gerste (*Hordeum vulgare*) unterbrochen (Abb. 4 und s. Anhang).

Material und Methode

Das Konstrukt *GstAI_P::HvMlo-RNAi* basiert auf dem Vektor *ZmUbi_P::RNAi* (pIPK 007) (Himmelbach *et al.* 2007), in den im Rahmen dieses Projektes der epidermisspezifische *GstAI*-Promotor kloniert wurde. Dies erfolgte, indem der *ZmUbi_P::RNAi* Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* linearisiert wurde und die entstandenen Enden mittels dNTPs und einer T4-Polymerase aufgefüllt wurden. Anschließend wurde die *UBIQUITIN*-Promotorsequenz durch die Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *KpnI* herausgeschnitten und das verbleibende Vektorrückgrad isoliert.

Der *GstAI*-Promotor stammt ursprünglich aus dem Vektor *GstAI_P::TaPERO* (Altpeter *et al.* 2005) und wurde in den Zwischenvektor pPS41 übertragen. Das Promotorfragment wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* / *SmaI* aus dem Vektor pPS41 ausgeschnitten und das daraus resultierende 2.591 bp große Promotorfragment gerichtet über die *KpnI* Schnittstelle in das vorhandene Vektorrückgrad des RNAi-Vektors ligiert. Bei diesem Vektor handelt es sich um einen „Destination Vector“ des GATEWAY Klonierungssystems (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

Parallel dazu wurde eine 545 bp lange *HvMlo*-Sequenz (s. Anhang) aus Gerste über eine *SwaI* Schnittstelle in den Vektor *pIPKTA38* (Douchkov *et al.* 2005) eingebracht und wie in Himmelbach *et al.* (Himmelbach *et al.* 2007) in einer LR-Reaktion in den *pGstAI_P::RNAi* Vektor rekombiniert. Der resultierende Vektor wurde als *pGstAI_P::HvMlo-RNAi* bezeichnet (s. Anhang)

2.1.6 Bakterienstämme

E. coli Stamm: *DH10B* (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Genotyp: F⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara, leu) 7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ⁻

Material und Methode

Agrobakterienstamm: *AGL-1*

Genotyp: *AGL-0* (C58 pTiBo542) *recA::bla*, T-Region deletiert Mop(+) Cb (R)
(*AGL-0* basiert auf dem Stamm EHA101 mit deletierter T-DNA, zusätzliche
Deletion des *aph* Gens) (Lazo *et al.* 1991)

2.1.7 Pathogene

Die Inokulationsversuche wurden mit Sporen vom Echten Mehltau des Weizens (*Blumeria graminis* (DC) f. sp. *Speer tritici*, *Bgt*) des Stammes FAL 92315 durchgeführt. Die Erhaltung des Weizenmehltaus erfolgte auf der hoch anfälligen Weizensorte „Kanzler“. Hierzu wurden je 60 Körner in fünf 18 cm Töpfen mit IPK Erdgemisch (s. Anzuchtbedingungen) gekeimt. Die Anzucht der Wirtspflanzen erfolgte im Gewächshaus bei 16 Stunden Licht (Natriumhalogendampflampen) bei $21\pm 1^\circ\text{C}$ sowie 8 Stunden Dunkelheit bei $17,5\pm 0,5^\circ\text{C}$ über einen Zeitraum von zwei Wochen. Nach der Inokulation wurde der Mehltau für sieben Tage bei 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit in einem Lichtschrank (SANYO Biomedical MLR-350; Tokio, Japan) bei konstanten 20°C angezogen. Nach sieben Tagen gebildete Mehltaukonidien wurden für die Inokulationsversuche verwendet.

2.1.8 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Als Donormaterial für die Transformation wurden Weizenpflanzen verwendet, die dem so genannten Zuchtmaterial „Bobwhite“ angehören. Hierbei handelt es sich um einen Überbegriff für alle Sommerweizen-Nachkommenschaften, die bei der Kreuzung CM33203 mit der Rasse Aurora//Kalyan/Bluebird/Woodpecker durch das CIMMYT (*Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo*, Internationales Mais und Weizen Forschungszentrum, Mexiko) Anfang der 1970er Jahre entstanden. Die verschiedenen Nachkommenschaften weisen eine hohe Variabilität hinsichtlich ihrer phänotypischen als auch agronomischen Eigenschaften auf (Warburton *et al.* 2002).

Material und Methode

Für die Transformation des *pGstAI_P::HvMlo-RNAi* Konstruktes wurde eine Bobwhite Linie verwendet, die von der Universität von Florida („Institut of Food and Agricultural Science“, IFAS, Gainesville, FL, USA) Mitte der 1990er Jahre zur Verfügung gestellt wurde und seitdem als Donormaterial für die Weizentransformation in der AG Pflanzliche Reproduktionsbiologie (PRB, IPK Gatersleben, Deutschland) dient.

Die Aussaat der Donorpflanzen erfolgte in IPK Erdmischung (10% Weißtorf; 45% Kompost, gesiebt und gedämpft; 20% Sand; 25% Substrat II, Klasmann, Geeste, Deutschland) in 150er Quickpot-Standardpalette (30 x 30 x 65 mm Kavität, Herkuplast, Ering am Inn, Deutschland) bzw. für die Inokulationsversuche in 96er Quickpot Standardpaletten (38 x 38 x 78 mm Kavität, Herkuplast, Ering am Inn, Deutschland). Die nachfolgende Anzucht erfolgte für zwei Wochen in einem Phytoschrank bei 12 h Licht/ 14°C sowie 12 h Dunkelheit/ 12°C. Anschließend wurden die Pflanzen in 16 cm Töpfe mit einem identischen Erdgemisch umgesetzt und in einer Phytokammer bis zum Ährenschieben unter identischen Bedingungen kultiviert. Danach wurden die Pflanzen in das Gewächshaus bei 16 h Licht/ 22°C sowie 8 h Dunkelheit/ 20°C überführt. Das Abreifen erfolgte ebenfalls in einem Gewächshaus bei 16 h Licht/ 22°C und 8 h Dunkelheit bei 20°C.

Dieses Protokoll wurde als Standard-Anzuchtprotokoll verwendet. Abweichungen hiervon sind in anderen Protokollen vermerkt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mittels einer Phenol/ Chloroform/ Isoamyl (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) Extraktion (Sambrook 2001). Das Ausgangsmaterial waren Pflanzen, die für zwei Wochen nach allgemeinem Anzuchtprotokoll kultiviert wurden. Für die Extraktion wurden

Material und Methode

je Pflanze zwei drei Zentimeter lange Blattsegmente in einem Sicherheitsreaktionsgefäß mit einer 35 mm Stahlkugel in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend in einer Schwingmühle (MM 400, Retsch, Haan, Deutschland) bei 28 Hertz für zwei Minuten gemörsert und die genomische DNA nach Protokoll (Sambrook 2001) isoliert.

2.2.1.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels einer Phenol/ Isothiocyanat Extraktion (TRIzol, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Anzucht, Auswahl sowie der mechanische Aufschluss des Blattgewebes erfolgte wie bei den Proben bei der DNA-Isolation. Nach der Isolierung wurde die RNA noch einer DNase Behandlung nach Anleitung des Herstellers mit dem Kit „DNA-free“ (Ambion, Darmstadt, Deutschland) unterzogen und die Integrität in einem Agarosegel überprüft.

2.2.1.3 Plasmid-Isolation

Die Isolierung von extrachromosomaler Plasmid DNA aus Bakterien erfolgte nach Anleitung des Herstellers unter Verwendung von Silika Gel-Säulen (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland) aus einer über Nacht angezogenen Bakterienkultur. Die Inkubationsbedingungen dieser Kultur erfolgten unter Selektionsdruck eines Antibiotikums in LB-Medium bei 37°C in einem 20 ml Kulturröhrchen.

2.2.1.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäure

Die Quantifizierung von isolierten Nukleinsäuren erfolgte mittels eines Photometers (Biophotometer & UVette 220-1600 nm; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Dazu wurde eine Probe 1:100 verdünnt und die Konzentration nach Herstellerangaben bestimmt.

2.2.2 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Analyse von Transformationsereignissen, zur Vervielfältigung von Ziel-DNA als auch für die Generierung von Hybridisierungs sonden wurden PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Reaktionen wurden wie folgt mit Komponenten der Produktreihe „GoTaq“ (Promega, Mannheim, Deutschland) angesetzt (Tab. 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung der Komponenten eines PCR-Ansatzes

Komponente	Menge in μl (20 μl Ansatz)
GoTaq PCR Puffer (5x)	4
GoTaq Polymerase	0,2
dNTP (10mM)	0,5
DNA Template (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1
Oligo 1 (10 pmol μl^{-1})	0,5
Oligo 2 (10 pmol μl^{-1})	0,5
H ₂ O	13,3

Die Amplifikation wurde bei folgenden Bedingungen durchgeführt (Tab. 3).

Tabelle 3: Standard-Programm für die Durchführung einer PCR

Temperatur (°C)	Dauer (Sek.)	Zyklenanzahl
95	120	variabel
95	30	
variabel	30	
72	variabel	
72	120	
4	∞	

Material und Methode

Folgende Oligonukleotide fanden in dieser Arbeit Verwendung (Tab. 4).

Tabelle 4: Liste der in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Name	5'--> 3' Sequenz
Bie371	GAAGGGATAGCCCTCATAGATAG
Bie372	AAACAAATGCAGTATGAAGATACAC
Bie400	TCACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG
Bie482	ACAGGCAGCTAGCTCTCGAA
Mla-Intron-F	CTGGCATAAGCAGTTCACACTAAACGG
Mla-Intron-R	GCCTCCAATCGTATGATGAACAAAATG
RNAiTamloK1-F	TGTGGTGCTCCCTGCTCTGT
RNAiTamloK1-R	TCGAGCCCAGCAACAAGTTC
RNAiTamloK2-F	TCATTTTGTTCATCATACGATTGGAGG
RNAiTamloK2-R	TGGAACCAGAAGAAGCTTGTGCTG
TaGAPDH-F	CAATGCTAGCTGCACCACCAATG
TaGAPDH-R	CTAGCAGCCCTCCACCTCTCCA
Tamlo-F	GCTCCACATATTCATCTTCGT
Tamlo-R	TCTCTGTCTCCCATTCTTCC

und wurden mit Ausnahme der Oligonukleotide Bie371, Bie372, Bie400 und Bie482 bei Standard-Bedingungen in den PCR-Reaktionen eingesetzt (Tab. 5).

Tabelle 5: Übersicht über die Annealing-Temperatur (T_{ann}) und die in dem PCR-Programm verwendete Elongationszeit der in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Name	T_{ann} (°C)	Elongationszeit (Sek.)
<i>HYG</i> -F	60	60
<i>HYG</i> -R	60	60
<i>Mla</i> -Intron-F1	61	60
<i>Mla</i> -Intron-R1	61	60
<i>Mlo</i> -end-RT-F1	61	40
<i>Mlo</i> -end-RT-R1	61	40
RNAiTamlo1K-F	55	60
RNAiTamlo1K-R	55	60
RNAiTamlo2K-F	55	60
RNAiTamlo2K-R	56	60
TaGAPDH-RT-F1	60	60

Material und Methode

Für die Amplifikation der beiden inversen RNAi-Zielsequenzen (RNAi-*repeats*) des Vektors *GstA1_P::HvMlo*-RNAi musste von den Standardbedingungen abgewichen und eine *touchdown* PCR durchgeführt werden. Dabei wurden die Oligonukleotide Bie 482/Bie 372 für die erste Kasette und die Oligonukleotide Bie 371/Bie 400 für die zweite Kasette verwendet. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tab. 6).

Die in der PCR Reaktion amplifizierten DNA-Fragmente wurden routinemäßig in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 6: Programm für die Durchführung einer *touchdown* PCR

Temperatur (°C)	Dauer (Sek.)	Zyklenanzahl
95	120	1
95	30	10
60-50	30	10 / Dekrement pro Zyklus 1°C
72	60	10
95	30	30
50	30	
72	90	
72	120	1
4	∞	

2.2.3 Auftrennen von DNA-Proben durch Agarosegelelektrophorese

Das Auftrennen von DNA hinsichtlich ihrer Fragmentgröße erfolgte elektrophoretisch in einem Agarosegel. Dazu wurde 1% (w/v) Agarose in 1xTAE-Puffer eingewogen und aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (Stammkonz. 1% (w/v)) je 100 ml flüssigem Agarosegels erfolgte nach dem Abkühlen auf <55°C. Das Gel wurde

Material und Methode

anschließend in einem Schlitten mit entsprechendem Kamm für mindestens 30 min ausgehärtet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x TAE Puffer bei 100 V bis eine hinreichende Trennung der Banden erkennbar war. Die Dokumentation des Ergebnisses wurde mit der Geldokumentationseinheit „GeneGenius“ (Syngene, Cambridge, England) durchgeführt.

2.2.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland).

2.2.5 Gel-Blot Analyse

Für die Bestimmung der Kopienzahl der Transgene in den stabil transformierten Pflanzen wurden Hybridisierungsexperimente mit DIG-markierten DNA-Sonden durchgeführt. Dafür wurden Pflanzen für zwei Wochen angezogen und deren DNA wie bereits beschrieben isoliert.

2.2.5.1 Restriktion genomischer Weizen-DNA

Die Restriktion der genomischen Weizen DNA wurde abgewandelt nach Sambrook et al. (Sambrook 2001) wie folgt angesetzt (Tab. 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung eines Ansatzes für die Hydrolisierung von genomischer DNA bei der Durchführung eines Gel-Blot Experiments

Komponente	Menge
gen. DNA	15 µg
Spermidin (40 mg ml ⁻¹)	8 µl
REN-Puffer (10x)	8 µl
REN (10 U µl ⁻¹)	8 µl
H ₂ O	ad 80 µl

Material und Methode

Bei der verwendeten Restriktionsendonuklease (REN) handelte es sich um *HindIII* mit dem entsprechenden Puffer (Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland). Die Restriktion erfolgte über Nacht bei 37°C. Nachträglich wurde die fragmentierte DNA mittels Ethanolpräzipitation gefällt und in 40 µl TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Ethanolpräzipitation erfolgte, indem ein Zehntel Volumen 3 M Na-Acetat (pH:5,2) zu der Probe zugegeben und durch Invertieren gemischt wurde. Anschließend wurden die Proben mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol aufgefüllt, erneut durch Invertieren gemischt und bei 4°C für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5424R, Hamburg, Deutschland). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 800 µl eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen und wieder bei 4°C für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Nachdem sich das Ethanol vollständig verflüchtigt hatte, wurde das Pellet in 40 µl TE Puffer resuspendiert und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.5.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung genomischer DNA wurde in einem 0,7% (w/v) Agarosegel in 0,5x TBE Puffer in einem 25 x 27 cm Gelschlitten durchgeführt. Die DNA Proben (40 µl) wurden mit je 6 µl Probenauftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zuerst wurden die Proben für 1 h bei 3,3 V/cm elektrophoretisch getrennt, gefolgt von einer Auftrennung über Nacht bei 0,6 V/cm. Nachdem das Ergebnis der Hydrolyse als Bilddatei dokumentiert worden war, wurde das Gel für den Kapillartransfer auf eine Nylonmembran vorbereitet. Dazu wurde das Gel für max. 20 min in einer 0,25 M HCl Lösung kontinuierlich geschwenkt und anschließend mit dest. H₂O gespült. Die Denaturierung der DNA erfolgte indem das Gel für je zwei mal 15 min in Denaturierungspuffer (1,5 M NaOH; 0,5 M Tris-HCl, pH 8) auf einem Orbitalschüttler inkubiert und anschließend wieder in dest. H₂O gespült wurde. Die abschließende Neutralisierung des Gels erfolgte, indem das Gel wiederum für

Material und Methode

zwei mal 15 min in einem Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris-HCL; 3 M NaCl, 0,1 M Tris) inkubiert und nach dem Abspülen des Gels mit H₂O in 20x SSC Puffer (3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH:7) äquilibriert wurde.

2.2.5.3 Kapillarblot

Die Immobilisierung der DNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers für 3 h mit einer TurboBlotter Kapillartransfer Apparatur (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) auf positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim, Deutschland), die vorher in 2xSSC 5 min äquilibriert wurde. Als Transferpuffer wurde 20xSSC Puffer verwendet. Abschließend wurde die DNA kovalent in einem UV-Ofen für 3 min bei 1.200 $\mu\text{joule min}^{-1}$ auf die Membran fixiert, mit dest. H₂O gespült und danach in einem PE Beutel bei -20°C gelagert.

2.2.5.4 Erstellung von DIG-markierten Sonden durch PCR

Die Markierung der Sonden mit DIG (Digoxigenin) erfolgte durch den Einbau von DIG-markierten dUTP Molekülen in einer Standard PCR, in der lediglich der dNTP Mix gegen PCR DIG Labeling Mix (Roche, Mannheim, Deutschland) ersetzt wurde. Als Template für die Amplifikation der *Mla*-Intron-DIG Sonde wurde der Transformationsvektor *pGSTA1_P::TaMlo-RNAi* und die Oligonukleotide *Mla*-Intron-F und *Mla*-Intron-R verwendet. Die Erstellung der *Hyg*-DIG-Sonde erfolgte durch eine PCR mit den Oligonukleotiden *HYG-F* und *HYG-R* und dem Transformationsvektor *pGstA1_P::HvMlo-RNAi* nach Standardbedingungen der entsprechenden Oligonukleotide (s. 2.2.2).

2.2.5.5 DNA-Hybridisierung und Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen

Die Vorhybridisierung der Membran erfolgte indem die Hybridisierungslösung („DIG-EasyHyb Granules“, Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben vorbereitet und auf 45°C temperiert wurde. Als nächstes wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre eingebracht und mit je 10 ml Hybridisierungslösung je 100 cm² Membran in einem Hybridisierungsofen (OV5,

Material und Methode

Biometra, Göttingen, Deutschland) bei 45°C rotierend für 30 min inkubiert. Je 2 µl der DIG-Sonde wurden pro ml des Hybridisierungspuffers für 10 min in kochendem Wasser denaturiert und anschließend in einem Eiswasserbad weitere 10 min abgekühlt. Nachdem die Vorhybridisierungslösung durch ein identisches Volumen des Hybridisierungspuffers ersetzt worden war, wurde die denaturierte Sonde in die Hybridisierungsröhre gegeben und bei konstanter Rotation über Nacht in einem Hybridisierungsofen bei 45°C mit der Membran inkubiert.

Unspezifische Bindungen auf der Membran wurden durch das zweimalige Waschen der Membran mit 2xSSC + 0,1% (w/v) SDS bei RT bei kontinuierlicher Agitation in der Hybridisierungsröhre für je 5 min vermieden. Darauf folgte erneut ein zweimaliges Waschen für je 15 min mit 0,5xSSC + 0,1% SDS bei 65°C.

Die Detektion der Sonde erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Kit „DIG Wash and Block Buffer Set“ (Roche, Mannheim, Deutschland).

2.2.6 Quantitative *real-time* PCR

Die Synthese der cDNA aus mRNA erfolgte aus 1 µg RNA nach Angaben des Herstellers mit dem Kit „iScript cDNA Synthesis Kit“ (BioRad, München, Deutschland) und den darin enthaltenen *PolyA*-Oligonukleotiden. Der Reaktionsansatz für die quantitative PCR wurde mit dem Kit „GoTaq qPCR Master Mix“ (Promega, Mannheim, Deutschland) erstellt und die Reaktion (Tab. 8) in eine „Microamp Optical 384-well Reaction Plate“ pipettiert und mit dem entsprechenden „Microamp Optical Adhesive Film“ (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verschlossen.

Material und Methode

Tabelle 8: Zusammensetzung eines Ansatzes für die Durchführung einer *real-time* RT-PCR-Reaktion

Komponente	Menge in μl (10 μl Ansatz)
GoTaq qPCR Master Mix (2x) inkl. GoTaq	5
cDNA Template	1
Oligo 1 (10 pmol μl^{-1})	1
Oligo 2 (10 pmol μl^{-1})	1
H ₂ O	2

Bei den verwendeten Oligonukleotiden handelte es sich für den Nachweis des endogenen *Mlo* um die Primerkombination Ta*Mlo*-F/ Ta*Mlo*-R und für die Normalisierung der Proben untereinander um die Primerkombination TaGAPDH-F/ TaGAPDH-R. Zusätzlich wurden bei jedem Lauf eine Verdünnungsreihe für die Kalibrierung aus WT-Proben (von unverdünnt bis zu einer 3.125fachen Verdünnung) als auch eine Negativkontrolle mit durchgeführt, die keine Template-DNA enthielt. Jede der durchgeführten Messungen umfasste fünf technische Replikate. Die Reaktion als auch die Datenerfassung erfolgten mit einer qPCR-Einheit „7900 Fast Real Time PCR Instrument“ (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit folgendem Programm (Tab. 9).

Material und Methode

Tabelle 9: Programm für die Durchführung einer real-time RT-PCR Reaktion

Temperatur (°C)	Dauer (Sek.)	Zyklenanzahl
50	120	
95	300	
95	15	40
60	60	
95	15	
60	15	Dissoziations- schritt
95	15	

Die Transkriptabundanzen wurden in Relation zu den Kalibrierungskurven bestimmt und anhand von *GAPDH* und unter Verwendung der Software *Sequence Detection Software* (SDS 2.2.2, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) normalisiert. Die Daten von transgenen und azygoten Linien wurden hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz mit dem Programm „Sigma Stat 3.0“ (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) analysiert.

2.2.7 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen

2.2.7.1 Kompetente *E. coli*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in 10 ml LB Medium, welches mit dem *E. coli* Stamm *DH10B* angeimpft wurde. Die Kultur wuchs für 16 h bei 37°C und 200 rpm. Mit 400 µl der über Nacht angezogenen Vorkultur wurden 400 ml LB in einem 1 L Kolben inokuliert. Die Kultur entwickelte sich bei 37°C unter Schütteln (200rpm) für 4-5 h bis eine optische Dichte von $A_{600nm}=0,5-0,8$ (Eppendorf BioPhotometer, Hamburg, Deutschland) erreicht wurde. Dann wurde die Bakteriensuspension 20 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 15 min bei 5.000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 5B mit Rotor GS3, vertrieben durch Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland). Nach dem Verwerfen des

Material und Methode

Überstandes wurde das Pellet mit 400 ml eiskaltem sterilem bidest. H₂O gewaschen und erneut für 20 min bei 4.000 rpm pelletiert. Der Waschschrift wurde mit 200 ml eiskaltem sterilem bidest. H₂O wiederholt und die Bakterien erneut pelletiert (20 min, 4.000 rpm in Sorvall RC 5B). Als nächstes wurde das Pellet in 25 ml eiskaltem sterilen 10% (w/v) Glycerin gewaschen und nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4.000 rpm in 3 ml sterilem eiskaltem 10% (w/v) Glycerin resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in Aliquots zu je 50 µl portioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei minus 80°C gelagert (nach (Sambrook 2001)).

2.2.7.2 Kompetente Agrobakterien des Stammes *AGL-1*

Die Durchführung ist identisch mit dem Protokoll für die Erstellung von *E.coli* (s. 2.2.7.1) mit folgenden Abweichungen. Bei dem verwendeten Medium handelt es sich um das MG/L Medium (Garfinkel and Nester 1980). Die Anzucht der Bakterien erfolgt bei 28°C. Und die pelletierten Bakterien wurden in eiskaltem sterilem HEPES-Puffer (1 mM HEPES, pH 7) gewaschen.

2.2.7.3 Transformation von *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurde ein 50 µl Glycerinaliquot der chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und parallel dazu der für die Transformation bestimmte Vektor in einem Endvolumen von 5 µl auf 1-5 ng eingestellt. Die Vektor DNA wurde der Bakteriensuspension zugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Bakterien-Gemisch in eine Elektroporationsküvette („Gene Pulser Cuvettes“ 20 mm Elektrodenabstand, Biorad, Deutschland) gefüllt und ein elektrischer Puls einer Stärke von 2,5 kV bei 200 Ohm für 4-5 ms in einem Gene Pulser II (Biorad, München, Deutschland) ausgelöst. Direkt nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 500 µl 37°C warmen SOC-Medium aufgenommen und bei 37°C für 30 min bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4.000 rpm für 8 min pelletiert und 350 µl des Überstandes verworfen und das Pellet in den verbleibenden 150 µl

resuspendiert. Als letzter Schritt wurde die Bakteriensuspension auf eine LB-Agarplatte mit entsprechender Antibiotikakonzentration ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.7.4 Transformation von Agrobakterien

Die Transformation der elektrisch kompetenten Agrobakterien folgte dem Protokoll der Transformation der elektrisch kompetenten *E. coli* mit folgenden Abweichungen. Die Inkubation der Agrobakterien erfolgte bei 28°C, die Inkubationsphase direkt nach der Elektroporation erstreckte sich auf 3 h und die Bakterien wurden auf MG/L-Medium ausplattiert.

2.2.8 Biolistische Transformation von Weizen

Die biolistische Transformation von Weizen mit dem Vektor *GstA1_P::TaMlo-RNAi* wurde nach Altpeter et al. (Altpeter *et al.* 1996) als Kotransformation mit dem Selektionsgen *pat* (*PHOSPHINOTRICIN ACETYL TRANSFERASE*) auf einem gesonderten Vektor durchgeführt und erfolgte vor Anfertigung dieser Arbeit (A. Varshney). Daraus wurden fünf stabil-transformierte Pflanzen regeneriert, die ohne weitere Selektion und nähere Charakterisierung in die T3 Generation überführt wurden.

2.2.9 Agrobakterien-vermittelte Transformation von Weizen

Die Transformation von Bobwhite wurde anhand von unreifen Embryonen (IEs = *immature embryos*) mit dem Agrobakterienstamm *AGL-1* durchgeführt.

2.2.9.1 Isolierung unreifer Embryonen

Die IEs wurden von Karyopsen isoliert, die 12-16 dpp alt waren (dpp=“days post pollination“). Dazu wurden die Karyopsen zuerst von der Ähre getrennt und anschließend oberflächensterilisiert. Dies erfolgte, indem die Karyopsen für 3 min in einer 70% (v/v) Ethanol Lösung in einer Blaudeckelflasche mit einem Magnetührer (300 rpm) inkubiert und danach für weitere 15 min in einer

Material und Methode

5% (v/v) Hypochlorid Lösung mit 0,1% (v/v) Tween die gleiche Behandlung erfuhren. Nach der Oberflächensterilisation wurden die Karyopsen mehrmals in sterilisiertem bidest. H₂O gespült, bis kein Chlorgeruch mehr wahrzunehmen war.

Die Isolierung der IEs erfolgte unter sterilen Bedingungen mit einer Pinzette und einer Lanzettnadel unter einem Binokular. Je 50 der IEs wurden mit dem Scutellum nach oben zeigend auf WPC-Medium (WPCM, *wheat pre-culture medium*) gelegt und für fünf Tage in Dunkelheit bei 24°C vorinkubiert.

2.2.9.2 Anzucht der Agrobakterien

Die Anzucht der Agrobakterien des Stammes *AGL-1* erfolgte in MG/L Medium über Nacht bei 28°C in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 180 rpm ohne Selektionsdruck. Die Bakterienkultur wurde für die Kokultur mit den IEs verwendet als die Suspension eine OD₆₀₀=2-2,5 aufwies. Als Inokulum dienten Glycerolstammlösungen. Für diese Glycerolstammlösungen wurde vorab eine Agrobakterienkultur in MG/L Medium mit entsprechenden Antibiotikakonzentrationen bis zu einer OD₆₀₀= 2.0 angezogen und je 200 µl dieser Kultur mit weiteren 200 µl sterilem 15% (v/v) Glycerol versetzt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.9.3 Kokultur unreifer Embryonen mit Agrobakterien

Nach der Vorkultur wurden je 50 IEs für 2-4 h in 2,5 ml flüssiges WPT-Medium (WPTM, *wheat pre-treatment medium*) in einer 6-Kavitätenschale (Greiner, Essen, Deutschland) übertragen. Nach dem Verwerfen des WPT Mediums wurden je Kavität 600 µl der Agrobaktériensuspension zu den IEs pipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension gründlich mit einer Pipette abgesaugt und die IEs für zwei mal zehn Minuten in 2,5 ml WCC-Medium (WCCM, *wheat co-culture medium*) inkubiert. Danach wurden je 25 IEs in eine Petrischale (Ø=5,5cm, Greiner, Essen, Deutschland) übertragen, in dem sich ein mit 400 µl WCCM +100 mgL⁻¹ Larcoll angefeuchtetes Filterpapier

(Ø=5 cm) befand. Die IEs wurden dabei auf ein Häufchen zusammengeschoben, die Petrischale mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA) verschlossen und für drei Tage bei Dunkelheit und bei 21°C inkubiert.

2.2.9.4 Kallusentwicklung und Regeneration von Pflanzen

Nach der Kokultivierung wurden die IEs auf WCI-Medium (WCIM, *wheat callus induction media*) übertragen. Dabei wurden je 25 IEs wieder vereinzelt auf eine Petrischale mit dem Scutellum nach oben zeigend überführt und bei 24°C und Dunkelheit für 10 Tage inkubiert. Als nächstes wurden die Embryonen wiederum bei identischen Bedingungen für sieben Tage auf neues WCIM mit 20 mgL⁻¹ Hygromycin (Roche, Mannheim, Deutschland) überführt.

Anschließend wurden je 10 Kalli auf WR-Medium (WRM, *wheat regeneration media*) mit 25 mgL⁻¹ Hygromycin überführt und erneut für zwei Wochen bei 136 µmol⁻¹m⁻² Photonen Flux für 16 h bei 22°C inkubiert. Kalli, die über grüne Gewebebereiche verfügen, wurden erneut bei identischen Bedingungen auf neues WRM Medium mit 25 mgL⁻¹ Hygromycin gelegt. Die Prozedur wurde erneut für 14 Tage auf WRM Medium ohne Hygromycin wiederholt und Regenerate, die eine Sprossformation zeigten, in Glasröhrchen (Flachbodenglas mit Deckel, 100 mm, Ø25 mm) mit 4,5 ml WRM überführt. Nach der Bildung von Wurzelgewebe wurden die Pflanzen in Erde überführt und bis zur Saatgutgewinnung nach Standardprotokoll behandelt.

2.2.10 Erstellung doppelhaploider Weizenpflanzen

Die Erstellung der doppelhaploiden Weizenpflanzen erfolgte über eine embryogene Pollenkultur *in vitro* in Anlehnung an das Protokoll von Liu et al (Liu et al. 2002).

2.2.10.1 Anzucht und Ernte des Donormaterials

Die Anzucht von je 20 Donorpflanzen pro Nachkommenschaft erfolgte nach Standardbedingungen. Die Ernte der unreifen Pollen erfolgte, als sich die oberste Blüte 1-2cm unterhalb der Blattspreitenbasis des Fahnenblattes ertasten ließ. Je Experiment wurden etwa neun Ähren für eine Isolierung verwendet.

Die vollständig geernteten Halme wurden etwa drei Zentimeter unterhalb des zweiten Nodiums (von oben gezählt) abgeschnitten und in kochend heißes Leitungswasser gestellt, so dass das zweite Nodium gerade untergetaucht war. Dies erfolgte bis keine Luftblasen mehr aus dem Halm entwichen. Die Ähren konnten nun bis zu einer Woche in sterilisiertem Leitungswasser bei 4°C mit einem PE Beutel (Autoklavierbeutel) abgedeckt gelagert werden oder direkt für die Pollenisolierung verwendet werden.

2.2.10.2 Oberflächensterilisation der unreifen Ähren

Zuerst wurden die Ähren gründlich mit 70% (v/v) Ethanol abgesprüht und danach je drei Ähren zusammen in ein Flachbodenglas mit Deckel gegeben und das Röhrchen mit 1,5% (v/v) Hypochlorid befüllt. Für 10 min wurde bei mehrfachem Invertieren inkubiert und anschließend die Flüssigkeit verworfen. Alle folgenden Arbeiten wurden von nun an unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Ähren wurden mit sterilem Einwegpapiertuch abgetrocknet und danach zurück ins Glasröhrchen gegeben. Unter mehrfachem Invertieren wurden die Ähren in autoklaviertem Leitungswasser für zehn Minuten gewaschen, die Flüssigkeit verworfen sowie erneut mit sterilem Papiertuch abgetrocknet. Der Waschschrift wurde zweimal mit autoklaviertem bidest. H₂O wiederholt und schließlich die Ähren gründlich zwischen zwei sterilen Papiertüchern durch leichtes Drehen getrocknet. Die sterilisierten Ähren konnten nun in einer Petrischale (Ø=35 mm) kurzfristig gelagert werden.

2.2.10.3 Isolierung und Vorbehandlung unreifer Pollen

Hüll- und Deckspelzen wurden entfernt und die freigelegten Antheren vorsichtig in einen auf 4°C vorgekühlten Mixeraufsatz („Laboratory Blender 7011S“, Waring Commercial, Torrington, USA) gegeben. Die Antheren wurden in 20 ml 0,3 M Mannitol-Lösung (auf Eis vorgekühlt, sterilfiltriert) suspendiert und die Antheren durch zweimaliges Mixen für je 10 sek auf der Stufe „low“ aufgeschlossen. Zwischen beiden Mixvorgängen wurde der Mixeraufsatz mehrmals invertiert. Die Suspension unreifer Pollen wurde anschließend über ein Wilsonsieb (Maschenbreite 100 µm, CLF; England) in eine Magentabox (Ga-7 Box, Magenta Corporation, Chicago, USA) überführt. Der Mixeraufsatz wurde mit 0,3 M Mannitol-Lösung nachgespült und die Suspension ebenfalls in das Sieb gegeben. Das im Sieb verbliebene Homogenisat wurde mit einer Pinzette leicht ausgepresst und danach wieder zurück in den Mixeraufsatz überführt. Anschließend wurden 10 ml der 0,3 M Mannitol-Lösung in den Mixeraufsatz gegeben und erneut für zwei mal fünf Sekunden auf der Stufe „low“ gemixt. Dazwischen wurde der Mixeraufsatz wieder mehrfach invertiert. Die entstandene Pollensuspension wurde wie vormals über den Filter in die Magentabox überführt und der Mixeraufsatz noch einmal ohne weiteres Mixen mit 10 ml 0,3 M Mannitol nachgespült und ebenfalls über den Filter mit der restlichen Pollensuspension vereinigt. Nachfolgend wurde die Suspension unreifer Pollen in ein 50 ml Schraubdeckelröhrchen (Greiner, Essen, Deutschland) überführt und in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5810 R, Hamburg, Deutschland) bei 100 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 5 ml 0,55 M Maltose (auf Eis vorgekühlt, sterilfiltriert) resuspendiert. Dann wurde die unreifen Pollen in ein 12 ml PE-Schraubdeckelröhrchen („12 ml steril TC-Tube“, Greiner, Essen, Deutschland) überführt und die vormals verwendeten 50 ml Schraubdeckelröhrchen mit 1,5 ml 0,3 M Mannitol (auf Eis vorgekühlt, sterilfiltriert) gespült, um mit dieser Lösung vorsichtig die Pollensuspension in dem 12 ml Schraubdeckelröhrchen zu überschichten. Eine Dichtegradientenzentrifugation erfolgte wiederum bei 100 g und 4°C für 10 min

Material und Methode

in der Tischzentrifuge. Die entstandene Bande aus unreifen Pollen wurde mit einer Pipette abgenommen und die angereicherte Suspension in ein neues 50 ml Schraubdeckelröhrchen übertragen. Dann wurde das Gesamtvolumen der Suspension mit 0,3 M Mannitol (auf Eis vorgekühlt, sterilfiltriert) auf 20 ml aufgefüllt und die unreifen Pollen bei 100 g bei 4°C für 10 min pelletiert. Nachdem der Überstand verworfen und dem Pellet möglichst vollständig die restliche Mannitol-Lösung entzogen wurde, erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 1 ml SMW1 Medium (vorab frisch angesetzte Stammlösung von 1-HNA, Timentin und Cefotaxin zugegeben). Diese Suspension wurde gleichmäßig auf zwei beschichtete 35 mm Petrischalen verteilt und die verbliebenen unreifen Pollen erneut zweimal mit je 1 ml SWM1 Medium aufgenommen und ebenfalls gleichmäßig auf die zwei 35 mm Petrischalen verteilt. Abschließend wurden die Petrischalen mit Nescofilm (Nesco, Osaka, Japan) verschlossen und für zwei Tage bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

2.2.10.4 Isolierung und Vorkultur von Stempeln

Für die Isolierung von Stempeln für die Vorkultur wurden Ähren verwendet, deren oberste Blüten maximal einen Zentimeter aus der Blattscheide herausragten und die gerade zu alt waren, um daraus unreife Pollen zu gewinnen. Nach der Ernte wurden die Ähren oberflächensterilisiert und anschließend in Abfolge zuerst Hüll- und Deckspelze sowie die Antheren entfernt. Danach wurden je 20 Stempel in eine 35 mm Petrischale (Greiner, Essen, Deutschland) mit 2 ml WPM-Medium präpariert und die Petrischale mit Nescofilm verschlossen. Die so gewonnenen Stempel wurden entweder sofort verwendet oder für einen Tag bei 4°C dunkel gelagert und dann verwendet.

2.2.10.5 Embryogene Pollenkultur

Für die *in vitro* Kultur zur Entstehung embryogener Pollen wurde für jedes 35 mm Schälchen aus der Vorkultur ein 12 ml Schraubdeckelröhrchen mit je 3 ml 0,55 M Maltose (vorher direkt aus der Stammlösung sterilfiltriert) vorgelegt und

Material und Methode

vorsichtig die vorbehandelte Suspension unreifer Pollen darüber geschichtet. Die 35 mm Schälchen wurden nochmals mit 1 ml 0,3 M Mannitol nachgespült und mit der bereits überschichteten Pollensuspension vereinigt. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde bei 100 g für 10 min durchgeführt und danach die Interphasebande mit unreifen Pollen in ein steriles 50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Die angereicherte Pollensuspension wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 ml mit 0,3 M Mannitol (sterilfiltriert) aufgefüllt und erneut bei 100 g für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in dem Volumen WPM1 Medium resuspendiert, so dass sich eine Populationsdichte von 50.000 unreifen Pollen pro Milliliter Medium ergab. Entsprechend dem Volumen der entstandenen Pollenkultur wurden je 5 ml der Pollenkultur in eine 6 cm Schale mit je 20 Stempeln oder je 2 ml der Pollenkultur in eine 35 mm Petrischale mit je acht Stempeln überführt. Anschließend wurden die Kulturen für vier Wochen bei 25°C und Dunkelheit in einem Klimaschrank bis zum Entstehen kleiner Kalli inkubiert.

2.2.10.6 Regeneration

Die Regeneration erfolgte indem je 25 Kalli auf 10 cm Petrischalen mit K4NB Medium umgelegt und bei 24°C für eine Woche im Dunkeln inkubiert wurden. In dem folgenden Schritt wurden die Platten für eine weitere Inkubationsphase für drei mal zwei Wochen in einem Lichtschrank mit 9 h bei Licht $136 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ Photonen Flux und 15 h Dunkelheit bei konstanten 22°C inkubiert, wobei jeweils alle zwei Wochen das Medium erneuert wurde. Anschließend wurden die Regenerate in Magentaboxen umgesetzt und bei identischen Bedingungen nochmals für zwei mal zwei Wochen inkubiert. Die daraus entstandenen Regenerate wurden anschließend in IPK Erdgemisch getopft und nach Standardbedingungen angezogen.

2.2.10.7 Ploidiebestimmung

Die Identifizierung der spontan doppelhaploiden Pflanzen erfolgte durch die Messung der Ploidie der entstandenen Regenerate. Dazu wurden für jede zu messende Probe in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen 2 ml dest. H₂O vorgelegt und auf Eis vorgekühlt. Von jeder Pflanze wurde ein 3-5 cm langes Blattsegment abgeschnitten und in je ein Röhrchen überführt. Zusätzlich wurden noch von drei bis vier diploide Wildtyp Pflanzen des verwendeten Genotyps Blattsegmente geerntet, die für die Kalibrierung der Messung verwendet wurden. Die Gewinnung der Zellsuspension für die Messung erfolgte, indem die Blattsegmente in den Deckel einer 10 cm Petrischale mit 2,9 ml Cy Stain UV Ploidie-Puffer (auf Eis, vor Licht geschützt, Partec; Münster, Deutschland) überführt wurden und danach mit einer Stahlbürste mehrfach über das Blatt gerieben wurde. Das Blatt wurde danach verworfen und die Zellsuspension über einen Cell Trics Filter (30 µm, Partec, Münster, Deutschland) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und verschlossen auf Eis bei Dunkelheit gelagert. Die eigentliche Messung der Ploidie erfolgte nach Herstellerangaben mit einem „CyFlow Ploidy Analyser“ (Partec, Münster, Deutschland).

2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand des Programms „Sigma Stat 3.0“ (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) indem die experimentell ermittelten Rohwerte (Einzelwerte) der Nachkommenschaften direkt gegeneinander verglichen wurden. Waren die Daten normalverteilt, wurde eine ein-faktorieller ANOVA (*one-way ANOVA*) durchgeführt. Lag keine Normalverteilung der Werte vor, so wurde ein Rang-basierter ANOVA Test („ANOVA on ranks“) durchgeführt. Bei der eigentlichen Varianzanalyse wurden die durch das Programm vorgeschlagenen Verfahren verwendet, die bei den entsprechenden Auswertungen angegeben sind.

2.2.12 Inokulation mit *Bgt* und Durchführung der Phänotypisierung

Der Ablauf der Phänotypisierung begann mit dem Auflegen der Blattsegmente auf einem 1%igen (w/v) Phytoagargel mit 0,002% (w/v) Benzimidazol in eine biologische Testschale (23 x 23 cm, Schütt, Göttingen, Deutschland). Danach erfolgte die Inokulation indem die Schalen in einem Inokulationsturm (112 cm x 62 cm x 53 cm) gestellt wurden und die Konidien von den infizierten Pflanzen aus der Instandhaltungskultur in den Behälter gepustet wurden. Anschließend wurde der Inokulationsturm mit einem Deckel verschlossen und für 10 min die Sedimentation der Konidien abgewartet. Die Überprüfung der erreichten Konidiendichte wurde durch mikroskopische Betrachtung eines mitgeführten Objektträgers ermittelt, der mit den Schalen in den Inokulationsturm gelegt wurde. Die Prozedur wurde so lange wiederholt, bis eine Konidiendichte von 150-200 Konidien pro mm² erreicht war. Die Blattsegmente wurden in den Testschalen, die zur Belüftung Löcher in dem Deckel hatten, für die Dauer der Inkubation in einem klimatisierten Raum bei etwa 20°C an einem Nordfenster (kein direktes Sonnenlicht) gelagert.

Dabei wurde zur Bewertung der Anfälligkeit der Blattsegmente die Ermittlung der Fläche der makroskopisch auf Blattsegmenten gewachsenen Mehltaukolonie 7 dpi zu Grunde gelegt. Diese künstliche Inokulation wurde dabei mit einer relativ hohen Inokulationsdichte der Mehltausporen durchgeführt (150-200 Konidien / mm²), die so in der Natur unüblich ist, jedoch eine experimentelle Evaluierung der Merkmalsausprägung ermöglicht. Für die Analyse wurden je 30 Blattsegmente von zwei (DH) Linien (TG1 und TG2) mit 36 Blattsegmenten des Wildtyps (WT) verglichen. Für die 3-wöchige Anzucht in Pflanzkästen mit 96 Kavitäten wurden die Pflanzen randomisiert ausgesät. Anschließend wurden Blattsegmente der Pflanzen abgeschnitten und mit der Pflanzenanzucht entsprechend der randomisierten Anordnung auf einer Schale mit Phytoagar aufgelegt und künstlich mit Mehltau inokuliert. Die Ermittlung der Befallsfläche erfolgte weitere sieben Tage später mit dem Computer-gestützten Programm „Area 1.2“ (T. Czauderna,

Material und Methode

IPK, Deutschland). Dieses Programm diente der Auswertung des nach 7 dpi als Bild dokumentierten makroskopischen Infektionszustandes auf den Blattsegmenten einer Schale. Das Programm ermöglicht dem Benutzer verschiedene Bereiche einer Abbildung (Bilddateien des Infektionszustandes) anhand farblicher Parameter zu differenzieren. Es wurde sich zu Nutze gemacht, dass Mehltaukolonien eine gelbliche Färbung aufweisen, wohingegen die nicht-infizierten Blattbereiche auch nach 7 dpi eine grüne Färbung zeigen. Die Bestimmung der farblichen Parameter, die den Mehltau befallenen Flächen bzw. den nicht-infizierten Bereichen entsprachen, erfolgte anhand aller Blattsegmente einer Schale (transgene und WT-Individuen) und wurde als Datei dokumentiert. In einem zweiten Schritt wurden diese vormals für alle Blattsegmente ermittelten Parameter nun nur auf die Blattsegmente einer der beiden transgenen Linien bzw. den WT bezogen. Dies erfolgte, indem die Bilddatei der entsprechenden Schale mit einem Bildbearbeitungsprogramm in drei Versionen vorbereitet wurde, auf der nur Blattsegmente der zu untersuchenden (DH-) Linie (TG1, TG2 bzw. WT) abgebildet waren. Nun wurden jeweils die prozentualen Befallsflächen für die drei Gruppen (TG1, TG2 bzw. WT) bestimmt und als Datei gespeichert. Als dritter Schritt der Resistenzbewertung wurden die prozentualen Befallsflächen, die für die transgenen Linie ermittelt wurden, auf den WT bezogen und ebenfalls dokumentiert. Der dem Versuch zu Grunde liegende Versuchsaufbau ist Abb. 5 zu entnehmen und wurde für alle untersuchten (DH-) Linien in drei biologischen Replikaten durchgeführt.

Material und Methode

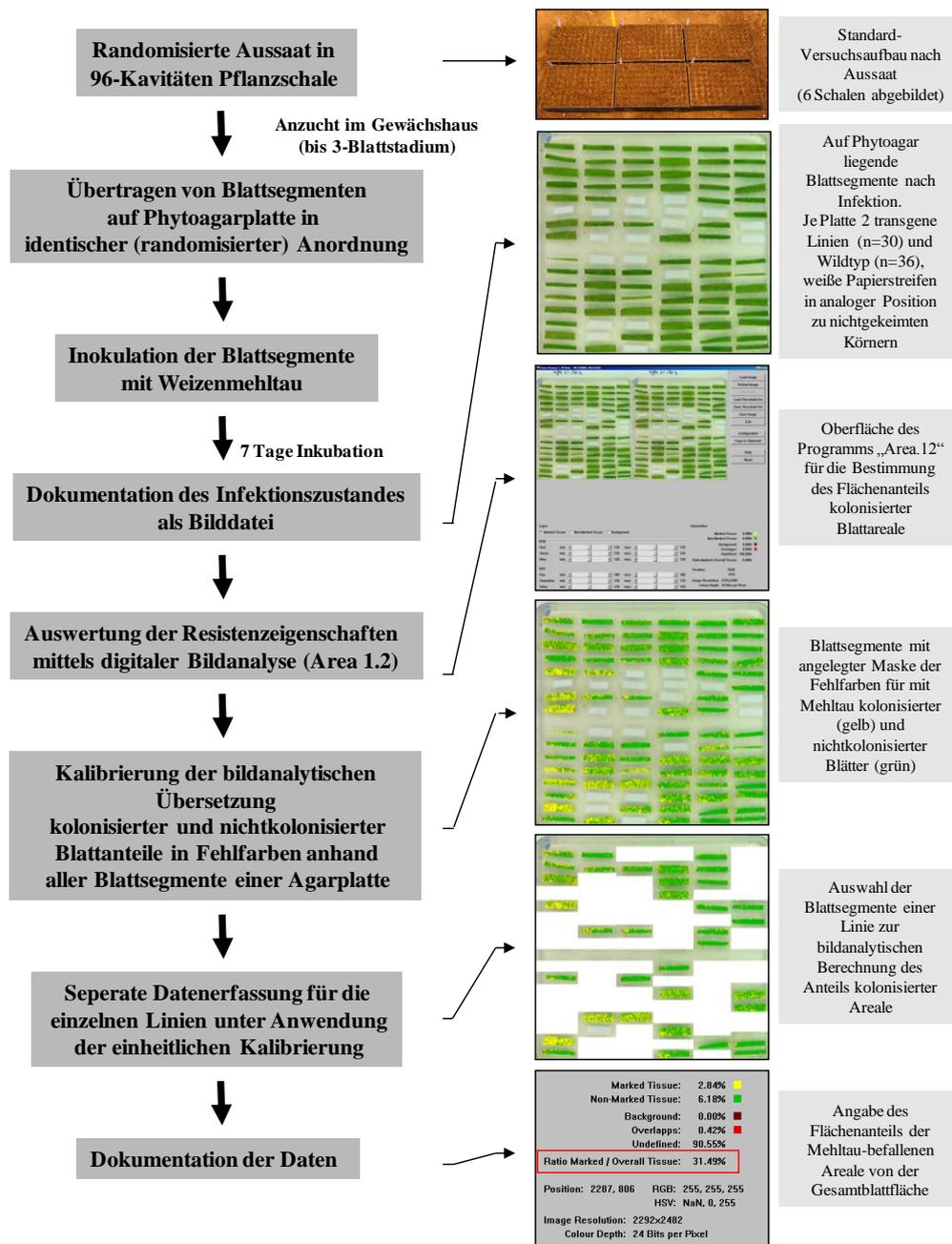


Abb. 5: Schematische Darstellung des Ablaufes der Bewertung der phänotypischen Resistenzmerkmale der transgenen Nachkommenschaften gegenüber Weizenmehltau (*Bgt*). Der dargestellte Versuchsablauf wurde routinemäßig für alle in dieser Arbeit charakterisierten Nachkommenschaften in drei biologischen Replikaten durchgeführt. Pro Durchführung wurde für je zwei transgene Nachkommenschaften sowie deren korrespondierende WT-Kontrollen eine 96 Kavitäten Pflanzschale verwendet, wobei der jeweilige Probenumfang pro Konstrukt Blattproben von 30 Individuen jeder transgenen Nachkommenschaft sowie von 36 WT-Pflanzen umfasste.

3 Ergebnisse

Um eine *mlo*-vermittelte Resistenz in den Weizen zu übertragen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein binärer Transformationsvektor mit einer RNAi-Kassette unter Kontrolle des epidermisspezifischen *GstAI*-Promotors (Altpeter *et al.* 2005) gegen das endogene *Mlo*-Gen des Weizens erstellt. Da es an geeigneten Vektoren für die Getreidetransformation mangelt, wurde der Vektor *GstAI_P::HvMlo-RNAi* im Rahmen eines ganzen Vektorsets erstellt (Himmelbach *et al.* 2007). Bei der Auswahl der Promotoren wurde speziell auf deren Eignung für monokotyle Pflanzen geachtet.

Die stabile Transformation von Weizen unter Verwendung des resultierenden Vektors *GstAI_P::HvMlo-RNAi* erfolgte durch *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfer. In den Nachkommenschaften primärtransgener Pflanzen wurden mittels Segregationsanalysen homozygote Nachkommen für die weiterführenden Analysen identifiziert und charakterisiert.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit basiert auf transgenen Pflanzen, die bereits im Vorfeld der vorliegenden Studie in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie (PRB, Pflanzliche Reproduktionsbiologie, IPK Gatersleben) durch biolistische Transformation einer funktionell identischen Expressionskassette (*GstAI_P::TaMlo-RNAi*) erstellt wurden (A. Varshney). Um genotypisch als auch phenotypisch homogenes Material zu generieren, wurden daraus doppelhaploide (DH) Pflanzen erstellt, deren homozygote Nachkommen weitergehend charakterisiert wurden.

Die Analyse aller in dem Projekt zur Verfügung stehenden (DH-) Linien umfasste die Ermittlung der phänotypischen Bewertung der Anfälligkeit gegenüber Weizenmehltau. Zu diesem Zweck wurde ein Verfahren zur Bewertung der makroskopischen Befallssituation auf Blattsegmenten entwickelt. Einige der Nachkommenschaften, die über das Mittel geringere Anfälligkeitswerte gegenüber

Ergebnisse

dem WT zeigten, wurden ausgewählt und einer molekularbiologischen Charakterisierung durch den Nachweis der transgenen Sequenz auf genomischer Ebene durch eine PCR-Analyse sowie der Anzahl der integrierten T-DNA-Kopien in Gel-Blot Experimenten unterzogen. Weiterhin wurde die Expression des Transgens durch reverse Transkription der mRNA und nachfolgende Amplifikation nachgewiesen. Neben dem qualitativen Nachweis der transgenen Sequenz wurde zudem ein quantitativer Nachweis der Transkriptabundanz der endogenen Zielsequenz von *Mlo* in der Epidermis ausgewählter Nachkommenschaften erbracht.

3.1 Analyse der *GstAl_P::TaMlo*-RNAi Nachkommenschaften

3.1.1 Erstellung der homozygoten *GstAl_P::TaMlo*-RNAi Linien und deren Nachkommenschaften

Als Ausgangsmaterial dienten mittels biolistischer Transformation erstellte transgene Pflanzen, die zu Beginn dieser Studie als segregierende T3-Populationen vorlagen. Drei der fünf ursprünglich generierten transgenen Nachkommenschaften wurden bereits im Vorfeld aufgrund vergleichsweise geringer Mehltausymptome nach der Inokulation ganzer Pflanzen mit *Bgt* zur weitergehenden Analyse ausgewählt. Die innerhalb einer Nachkommenschaft erfolgende Segregation bezüglich der Kopienzahl und Zygotie (azygot, hemizygot bzw. homozygot) der integrierten DNA-Konstrukte führte erwartungsgemäß zu Unterschieden der Transgen-Expression, die in einer entsprechend hohen Variabilität des Phänotyps resultiert. Um Nachkommenschaften mit einem einheitlichen Genotyp zu erhalten, wurden DH-Linien erzeugt, deren Nachkommenschaften nicht nur genetisch homogen sind, sondern aufgrund der identischen Reproduzierbarkeit in einem praktisch unbegrenzten Maße zur Verfügung stehen. Das in diesem Zusammenhang verwendete Ausgangsmaterial wird im Folgenden als transgene Ausgangslinie 1-3 bezeichnet.

Ergebnisse

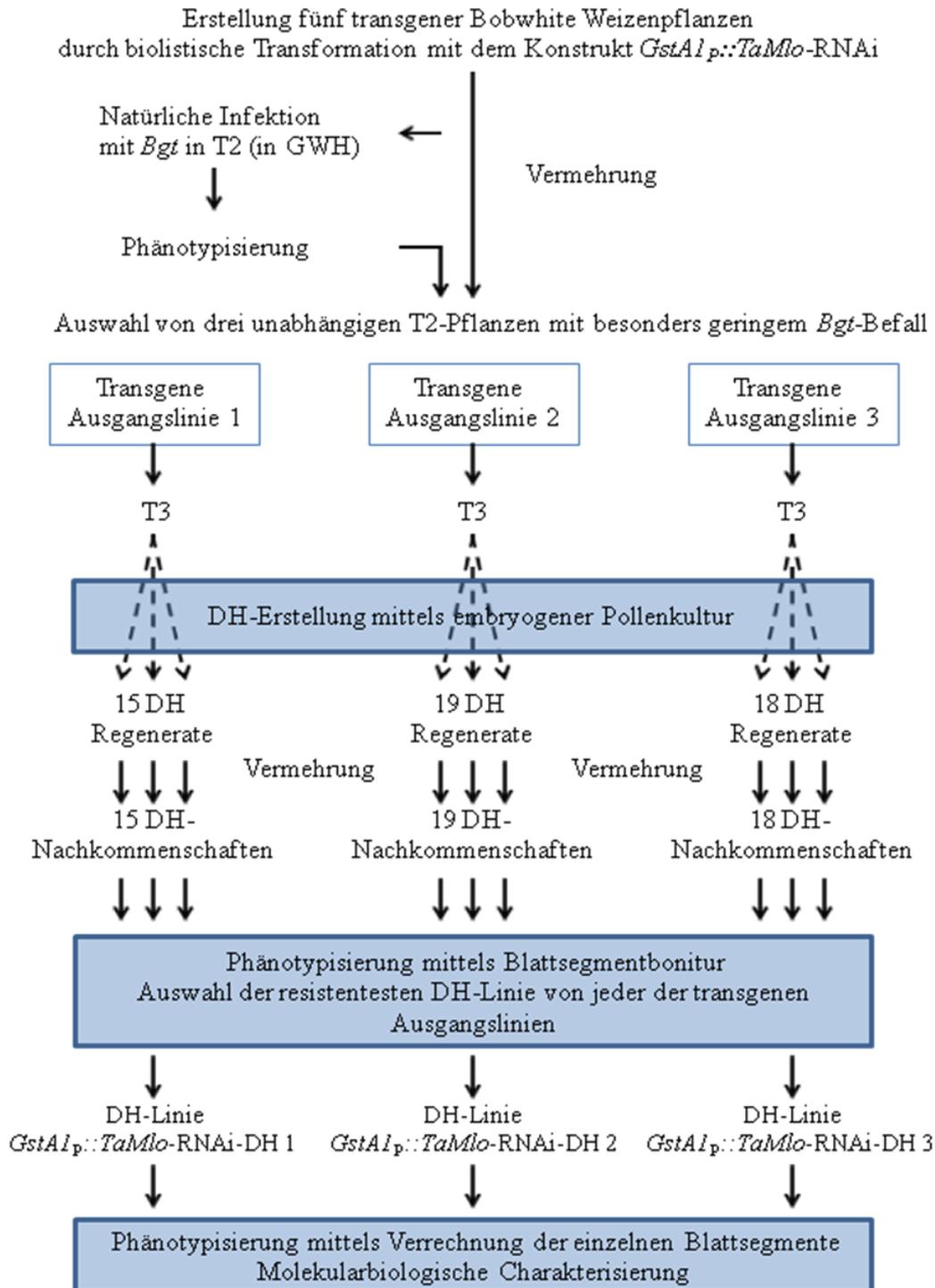


Abb. 6: Schematische Darstellung des Erstellungsprozesses der drei im Detail untersuchten DH-Linien *GstAl_p::TaMlo-RNAi-DH 1, 2 und 3*.

Ergebnisse

Grundlage für die Erzeugung von doppelhaploiden Regeneraten aus den transgenen Ausgangslinien war die jeweils einmalige Isolierung von unreifen Pollen aus neun Ähren verschiedener Individuen der entsprechenden Nachkommenschaft. Das Resultat der darauf folgenden embryogenen Pollenkultur war die Erzeugung von 15 Regeneraten in der transgenen Ausgangslinie 1, 19 Regeneraten in der transgenen Ausgangslinie 2 und 18 Regeneraten in der transgenen Ausgangslinie 3, die alle eine spontane Genomaufdoppelung während der *in vitro* Kultur durchlaufen hatten. Ein Schema des Entstehungsprozesses der DH-Linien ist in Abbildung 6 dargestellt.

Um die Anwesenheit der transgenen Sequenz in den Regeneraten der drei transgenen Ausgangslinien nachzuweisen, wurde eine PCR auf das *HvMla*-Intron aus der *Mlo*-RNAi-Kassette des Transformationsvektors *GstAI_P::TaMlo*-RNAi durchgeführt (Abb.7).

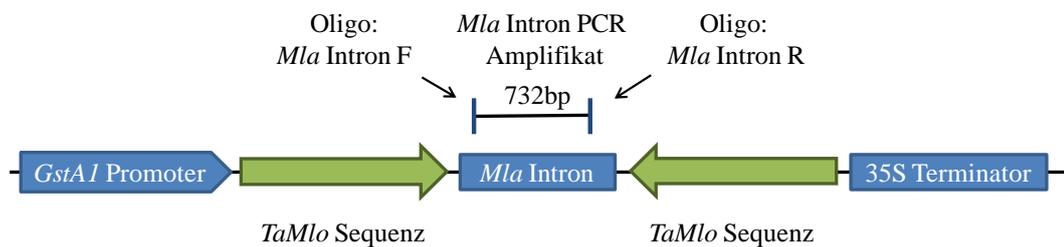


Abb. 7: Schematische Darstellung der *GstAI_P::TaMlo*-RNAi-Kassette des Vektors *GstAI_P::TaMlo*-RNAi mit den verwendeten Oligonukleotiden für den Nachweis der transgenen Sequenz im Genom der Pflanzen durch PCR. Der Nachweis des Transgens im Genom der Pflanzen erfolgte durch die PCR-Amplifikation einer 732 bp langen Sequenz unter Verwendung der Oligonukleotid-Kombination *MlaIntron-F* und *MlaIntron-R*. Die Expression der *TaMlo*-RNAi-Kassette wird durch den epidermisspezifischen *GstAI*-Promotor aus Weizen gesteuert. Die in dem Vektor verwendeten *Mlo*-Sequenzen stammen aus Weizen und unterscheiden sich ausschließlich hinsichtlich ihrer Orientierung innerhalb des Vektors. Die beiden invertiert angeordneten *TaMlo* Sequenzen sind durch ein *HvMla* Intron aus Gerste (*Hordeum vulgare*, *Hv*) getrennt. Den Abschluss der RNAi Kassetten bildet ein *CaMV* 35S-Terminator.

Die Verwendung der *Mla*-Intron-Sequenz als Nachweis für das Vorhandensein der Transgenesequenz in den Pflanzen erfolgte, weil sie im Gegensatz zum Promotor und den invertierten *TaMlo*-RNAi Sequenzen aus Gerste stammt und damit eine

Ergebnisse

bessere Unterscheidbarkeit zu endogenen Sequenzen gegeben ist. Die dabei verwendeten Oligonukleotide *Mla*Intron-F und *Mla*Intron-R (s. 2.2.2) amplifizierten einen Sequenzabschnitt von 732 bp, welcher mittels PCR in den doppelhaploiden Regeneraten der embryonalen Pollenkultur nachgewiesen wurde (Abb. 8).

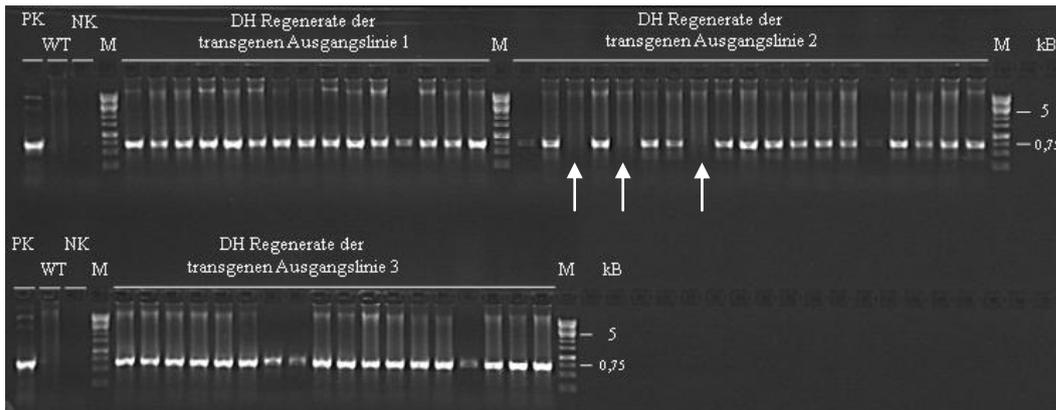


Abb. 8: Nachweis der transgenen *Mla*-Intron-Sequenz in doppelhaploiden Regeneraten aus der embryonalen Pollenkultur durch Amplifikation in einer PCR. Die untersuchten Proben stammen von verschiedenen doppelhaploiden Individuen, die aus den transgenen Ausgangslinien 1-3 generiert wurden. Das nachzuweisende *Mla*-Amplifikat besitzt eine Größe von 732 bp. Die Proben, die mit einem Pfeil markiert wurden, repräsentieren die Pflanzen, die durch generative Rekombination die transgene Sequenz verloren haben (Azygote). Die Kontrollen der PCR-Amplifikation umfassen als Positivkontrolle den Transformationsvektor (PK), sowie Negativkontrollen mit der genomischen Wildtyp-DNA (WT) als auch H₂O (NK). Bei dem mitgeführten Größenstandard (M) sind die Banden der Größe von 0,75 und 5 Kilobasenpaaren (kB) zur Orientierung markiert.

Die Analyse ergab in allen Regeneraten für die transgenen Ausgangslinien 1 und 3 einen einheitlich positiven Nachweis des Introns der RNAi-Kassette in den untersuchten 15 bzw. 18 Individuen. Dahingegen konnte die *Mla*-Sequenz in den drei Regeneraten Nr. 3, 5 und 8, die aus der transgenen Ausgangslinie 2 regeneriert wurden, nicht nachgewiesen werden (Abb. 8, Pfeil). Das Auftreten dieser azygoten Regenerate ist darauf zurückzuführen, dass die Regeneration nach der Genomaufdoppelung ohne das in der ursprünglichen Transformation verwendete Selektionsgen PHOSPHINOTRICIN ACETYL-TRANSFERASE (*Pat*) durchgeführt wurde. Dies begründet sich dadurch, dass die biolistische

Ergebnisse

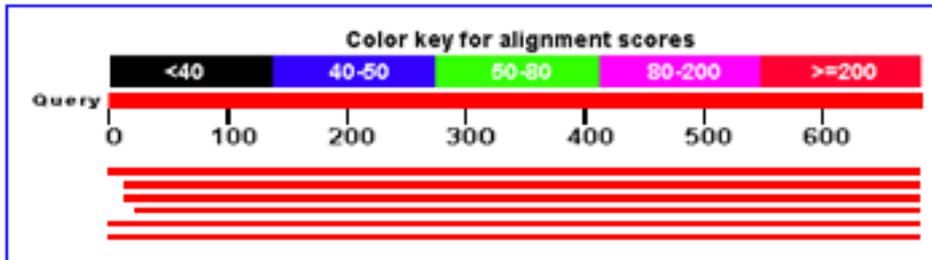
Transformation als Kotransformation durchgeführt wurde und somit der Selektionsmarker und das Transgen an unterschiedlichen Loci integrieren und daher unabhängig voneinander segregieren können. Das Auftreten der azygoten Regenerate ist ein durchaus erwünschter Effekt für die weiterführenden Analysen, denn es bietet die Möglichkeit einer internen Negativkontrolle, die eine absolute Vergleichbarkeit hinsichtlich des verwendeten genetischen Hintergrundes bildet und somit eine Vergleichbarkeit bezüglich der Transgenität als auch der äußeren Einflüsse erlaubt.

3.1.2 Sequenzierung von *HvMla*

Um die mittels PCR amplifizierte *Mla*-Sequenz nicht ausschließlich über die Fragmentlänge zu identifizieren, wurde das Amplifikat zur zusätzlichen Kontrolle sequenziert. Dafür wurde die Sequenz aus einem willkürlich ausgewählten DH-Individuum der transgenen Ausgangslinie 1 exemplarisch verwendet. Die Sequenzierung überspannte eine Länge von 683 bp und deckte damit über 93 % des 732 bp langen Amplifikates ab. Der Abgleich der erhaltenen Sequenz erfolgte mit der Datenbank des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) und ergab für alle der sechs erhaltenen Vergleichssequenzen eine Homologie zu der Gersten *Mla*-Sequenz mit einer Wahrscheinlichkeit zufälliger Übereinstimmung von $E=0$ (Abb. 9). Obwohl bei hexaploidem Weizen in Gel-Blot-Experimenten mit einer *HvMla*-Sonde, die gegen die stark konservierte *LRR*-Region (*leucin rich repeat*) gerichtet war (Seeholzer *et al.* 2010) bis zu acht Hybridisierungsereignisse nachzuweisen sind (Jordan *et al.* 2011), konnten bei der in dem Experiment verwendeten Sequenz keine Amplifikationen nachgewiesen werden. Es wurde sich dabei zu Nutze gemacht, dass *R*-Gene (wie *Mla*) neben den hoch konservierten Strukturmotiven für die NB- (*nucleotide binding*) und *LRR*-(*leucine rich repeat*) Domäne eine sehr heterogene Genfamilie darstellen und in der vorliegenden Analyse ein Sequenzabschnitt ausgewählt wurde, der keine Homologien zu endogenen Weizensequenzen aufweist.

Ergebnisse

Dies liegt an der Verwendung eines nicht so hoch konservierten *HvMla*-Sequenzbereichs für die eingesetzte Sonde.



Accession Description		Max Score	Total score	Query coverage	E-value	Max ident
AY009938.2	Hordeum vulgare subsp. vulgare MLA1-2 (Mla1-2) gene, partial cds and MLA1 (Mla1) gene, complete cds	1134	1134	99%	0	96%
AY194347.1	Hordeum vulgare subsp. Vulgare MLaA12 (Mla12) gene, complete cds	1005	1005	97%	0	93%
AF623878.1	Hordeum vulgare CC-NBS-LRR resistance protein MLA13 gene, complete cds, alternatively spliced	993	993	97%	0	93%
AJ302293.3	Hordeum vulgare Mla6 gene, exons 1-5	987	987	96%	0	93%
AY288442.1	Hordeum vulgare LINE element Lauren, patrial sequence: MLA6-2 (Mla6-2) gene, completely cds, alternatively spliced	942	942	99%	0	91%
AY288443.1	Hordeum vulgare MLA13-2 (Mla13-2) gene and LINE element Lauren, partial sequence	937	937	99%	0	91%

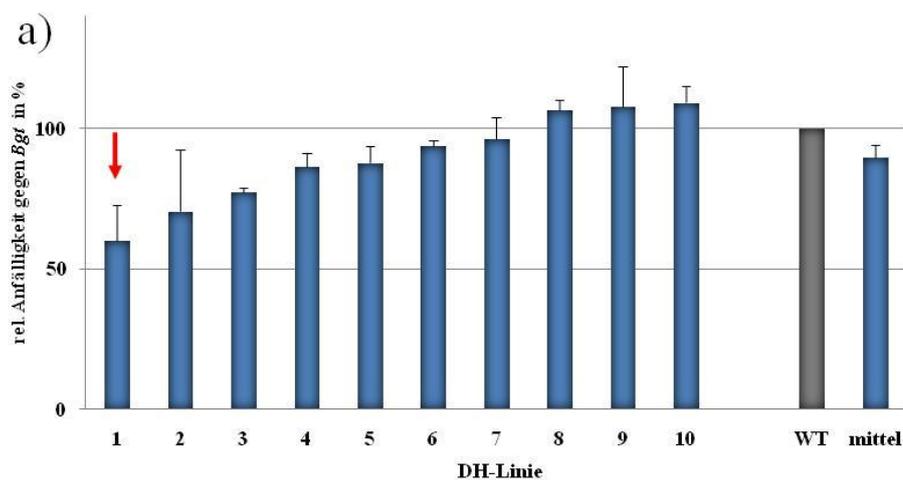
Abb. 9: Ergebnis des Abgleichs der aus einer *TaMlo*-RNAi-DH Pflanze amplifizierten *HvMla*-Sequenz mit der Online-Datenbank des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). Aus der genomischen DNA einer repräsentativen transgenen *TaMlo*-RNAi-DH Pflanze, die aus der embryogenen Pollenkultur regeneriert wurde, wurde das durch PCR amplifizierte *Mla*-Intron nach einer elektrophoretischen Trennung isoliert, sequenziert und die erhaltene Sequenz mit der Online-Datenbank des NCBI verglichen. Der Abgleich ergab in allen erhaltenen Akzessionen eine nahezu vollständige Übereinstimmung (Max. Ident. >91%) mit einer Wahrscheinlichkeit zufälliger Übereinstimmung der Sequenz von E=0.

Damit konnte die aus Gerste stammende *Mla*-Sequenz eindeutig identifiziert werden und der transgene Charakter der untersuchten Weizenpflanzen nachgewiesen werden.

3.1.3 Bewertung der Anfälligkeit der *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien gegenüber *Bgt*

Eine quantitative Analyse der Anfälligkeit der *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien gegenüber *Bgt* ist für den Nachweis der Etablierung und die weiterführende Evaluierung der eingebrachten transgenen Eigenschaften essentiell. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde dafür ein Boniturverfahren etabliert. Die Bewertung der Anfälligkeit erfolgte durch die Ermittlung des 7 d nach künstlicher Inokulation von Mehltaukolonien bewachsenen Flächenanteils von Blattsegmenten (s. 2.2.12). Als Material dienten die aus Einzelkornvermehrung erhaltenen DH-Nachkommenschaften der Regenerate aus der embryogenen Pollenkultur, wobei zehn DH-Linien der transgenen Ausgangslinie 1, acht DH-Linien aus der transgenen Ausgangslinie 2 und 13 DH-Linien aus der transgenen Ausgangslinie 3 hinsichtlich der Anfälligkeit gegen *Bgt* analysiert wurden.

Der Umfang der Analysen umfasste je drei biologische Replikate mit je 30 Individuen der analysierten DH-Linie und 36 Individuen des Wildtyps. Das Maß der Anfälligkeit der jeweiligen DH-Linien der drei transgenen Ausgangslinien ist aus den folgenden Abbildungen zu entnehmen (Abb.10 a-c).



Ergebnisse

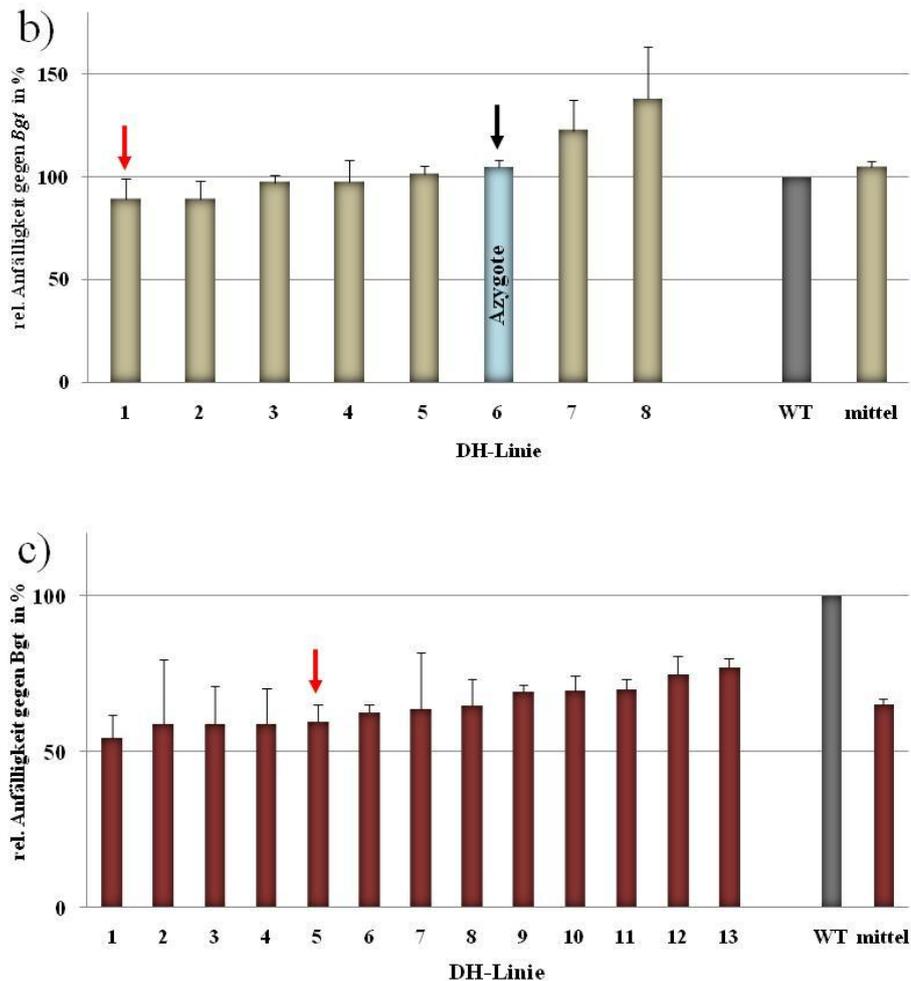


Abb. 10 a-c: Bewertung der Anfälligkeit von DH-Linien der transgenen Ausgangslinien gegenüber Mehltau (*Bgt*). Als Merkmal der Anfälligkeit diente der nach künstlicher Infektion mit Mehltau bewachsene prozentuale Flächenanteil der Blattsegmente (s. 2.2.12). Die für die transgenen DH-Linien ermittelten Werte der befallenen Fläche wurden nachträglich in Prozent des auf 100% gesetzten durchschnittlichen Befalls des Wildtyps umgerechnet. Die dargestellten Mittelwerte wurden aus jeweils drei biologischen Replikaten mit bis zu 30 Pflanzen der transgenen Linien bzw. bis zu 36 WT-Pflanzen erhoben. In dem Diagramm ist anhand der Fehlerbalken die Standardabweichung der drei Replikate untereinander dargestellt. Zudem ist ein Gesamtmittelwert über alle von der transgenen Ausgangslinie abstammenden DH-Linien rechts neben dem WT-Wert dargestellt („Mittel“). Die mit dem roten (transgene Linien) bzw. schwarzen (azygote Linie) Pfeil markierte Linie wurde für weiterführende Analysen ausgewählt. a) Bewertung der Anfälligkeit von zehn DH-Linien der transgenen Ausgangslinie 1 gegen *Bgt*. b) Bewertung der Anfälligkeit von acht DH-Linien der transgenen Ausgangslinie 2 sowie der enthaltenen azygoten Linie. c) Bewertung der Anfälligkeit von 13 DH-Linie der transgenen Ausgangslinie 3.

Ergebnisse

Dabei zeigte sich bei den auf die erste transgene Ausgangslinie zurückgehenden DH-Linien eine Streuung in der Anfälligkeit, die eine Spanne von 60% bis 110% des Wildtypniveaus aufwies (Daten s. Anhang). Die in Abb. 10 a mit dem roten Pfeil markierte Linie wurde für weitere Analysen ausgewählt, weil sie gegenüber dem WT die im Mittel besonders niedrigen Anfälligkeitswerte aufwies. Sie wird im Weiteren als Linie „*GstAI_P::TaMlo*-RNAi-DH 1“ bezeichnet.

Die DH-Nachkommenschaften der transgenen Ausgangslinie 2 zeigten über das Mittel höhere Anfälligkeitswerte gegenüber Weizenmehltau als dies in den Nachkommen der transgenen Ausgangslinie 1 der Fall war (Daten, s. Anhang). Dabei wiesen die Linien, die über den geringsten Mittelwert in den Messungen verfügten, lediglich im Mittel um 11% geringere Anfälligkeitswerte (89%) als der Wildtyp auf (Abb. 10 b). Auch in diesem Fall wurde die DH-Linie für weitere Analysen ausgewählt (roter Pfeil), die im Mittel die geringsten Anfälligkeitswerte gegenüber dem Wildtyp zeigte. In den folgenden Analysen wird diese Linie als „*GstAI_P::TaMlo*-RNAi-DH 2“ bezeichnet.

Zudem erwiesen sich drei der aus diesen Ausgangslinien generierten DH-Linien anhand der PCR Analysen (s. 3.1.1) als azygot. Aufgrund der vorhandenen Saatgutmenge wurde die Nachkommenschaft des azygoten Regenerates Nr. 3 ausgewählt und als interne Kontroll-Linie mitgeführt. In den Analysen zeigte die DH-Linie über das Mittel Anfälligkeitswerte gegen *Bgt* auf Wildtypniveau (schwarzer Pfeil) (Daten, s. Anhang). Auch diese Linie wurde für weitere Analysen ausgewählt und im Folgenden als „Azygote“ bezeichnet (Abb. 10 b).

In den DH-Linien der transgenen Ausgangslinie 3 sind die geringsten Mittelwerte für die Anfälligkeitswerte gegen *Bgt* gemessen worden (Abb. 10 c). Die Spanne in den Anfälligkeitswerten der DH-Linien liegt bei 54% bis 76% des Wildtypniveaus (Daten, s. Anhang). Auch aus den DH-Linien dieser transgenen Ausgangslinie wurde eine DH-Linie für weiterführende Analysen ausgewählt (roter Pfeil). Diese Linie wies zwar nicht den geringsten Mittelwert in der Analyse auf, zeigte

Ergebnisse

allerdings eine vergleichsweise geringe Standardabweichung in den drei durchgeführten Replikaten und verfügte über ausreichend Saatgut, um die nachfolgenden Analysen durchführen zu können. Diese Linie wird in nachfolgenden Experimenten als Linie „*GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 3“ bezeichnet.

Nachfolgend sind die Ober- bzw. Untergrenzen der Mittelwerte der gemittelten Anfälligkeitswerte aller DH-Linien der drei transgenen Ausgangslinien tabellarisch dargestellt (Tab. 10).

Tab.10: Darstellung der minimalen, maximalen und gemittelten prozentualen Anfälligkeitswerte gegenüber *Bgt* der *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien im Vergleich zu Wildtyppflanzen.

DH Nachkommenschaft der transgenen Ausgangslinie	Spanne der Anfälligkeitswerte: (in % gg. WT)		
	niedrig	hoch	MW
1	60,1	109,2	89,5
2	89,0	137,7	104,9
3	54,5	76,9	65,0
WT	/	/	100

Bei der Betrachtung der Ausprägung der Anfälligkeit der einzelnen DH-Linien zeigte sich, dass die Mehrzahl der DH-Linien aus den Regeneraten der embryogenen Pollenkultur der Linie 1, sowie alle untersuchten Nachkommenschaften der Linie 3 geringere Mittelwerte in den Anfälligkeitswerten gegenüber *Bgt* als der WT aufweisen. Auch für die Linie 2 lässt sich diese Aussage treffen. Von den dort analysierten acht Individuen lagen fünf unterhalb des Mittelwertes vom WT. Der in Tabelle 10 dargestellte Mittelwert der Linie 2 übersteigt nominell zwar den des WTs, basiert aber auf einzelnen Ausreißern (s. Abb. 10b). Wenn die Blätter aller Individuen eines Versuchs, wie in der vorliegenden Analyse als eine Stichprobe verrechnet werden, lassen sich diese Unterschiede jedoch anhand einer ANOVA mit nachfolgendem Vergleichstest nicht als statistisch signifikant belegen. Allgemein ist bei der Interpretation der

Daten zu beachten, dass in Fällen besonders hoher Anfälligkeit in der Regel auch sehr hohe Varianzen auftraten.

3.1.4 Einzelblattevaluierung der Anfälligkeitsausprägung ausgewählter *GstA1_P:TaMlo*-RNAi-DH Linien gegen *Bgt*

Bei dem hier verwendeten Material handelt es sich um die Nachkommenschaften von DH-Linien, die mittels embryogener Pollenkultur aus unterschiedlichen unreifen Pollen der transgenen Ausgangslinien regeneriert wurden. Somit ist einerseits jede einzelne der erzeugten DH-Linien ein Produkt unabhängiger meiotischer Rekombination, also hinsichtlich der Anzahl als auch der Verteilung der integrierten Transgen-Loci potentiell spezifisch. Dies erklärt die beobachtete Varianz der Merkmalsausprägung selbst zwischen jenen DH-Linien, die auf die gleiche transgene Ausgangslinie zurückgehen, und es erlaubt, die einzelnen DH-Nachkommenschaften als unterschiedliche Linien betrachten zu können. Andererseits ist davon auszugehen, dass die Individuen einer DH-Linie bezüglich der Transgenität und des genetischen Hintergrundes untereinander genetisch vollkommen identisch sind.

Um die vorab ermittelten Anfälligkeitseigenschaften der ausgewählten Linien näher zu charakterisieren, wurde eine eingehendere Evaluierung der Anfälligkeitswerte der vorab ausgewählten DH-Linien durchgeführt. Diese Evaluierung erfolgte durch vertiefende Analysen des als Bilddatei dokumentierten Infektionszustandes nach 7 dpi mit der Software „Area 1.2“ (T. Czauderna, IPK, Deutschland). Abweichend von der vorher durchgeführten Bewertung der Anfälligkeit wurden diesmal nicht alle Blattsegmente einer Linie zusammen bewertet, sondern die Befallssituation für jedes der bis zu 30 Blattsegmente je transgener DH-Linie und Experiment (biol. Replikat) bzw. der bis zu 36 Blattsegmente pro WT-Replikat ermittelt und dokumentiert. Als Maß der Anfälligkeit diente wiederum die prozentuale Blattoberfläche, welche mit Mehltaukolonien bewachsen war. Durch die somit gewonnenen Daten der Einzelblattauswertung war aufgrund der hohen Anzahl an Wiederholungen (drei

Ergebnisse

mal 30 Befallswerte pro Linie und Experiment) eine Aussage über die statistische Signifikanz möglich (Abb. 11 a-d).

Die Analyse der Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 1 ergab eine statistische Signifikanz für alle drei durchgeführten biologischen Replikate in Relation zum Wildtyp mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ (Abb. 11 a, Daten s. Anhang)

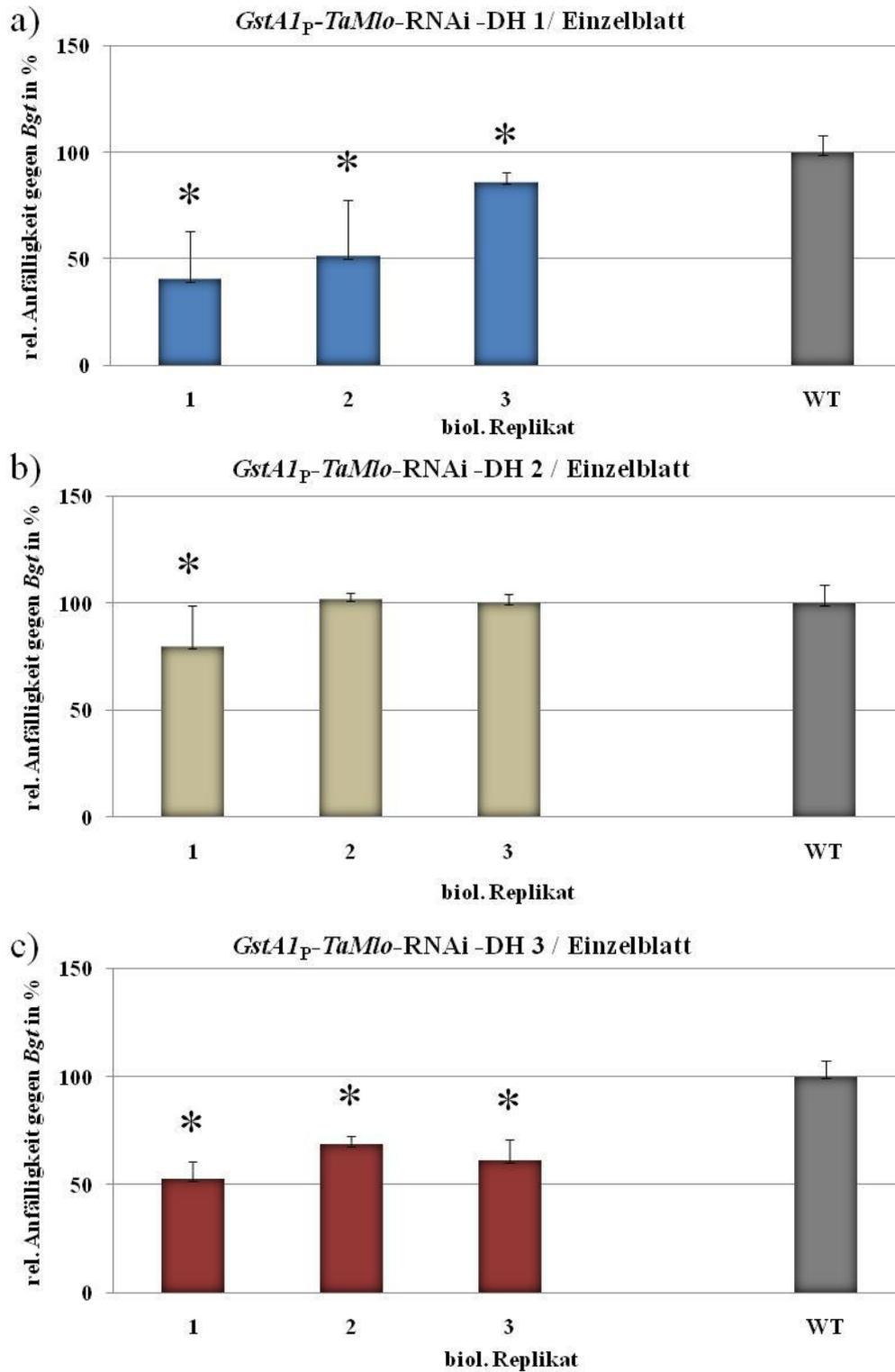
Die Auswertung für die Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 2 ergab für die Ermittlung der statistischen Signifikanz keine mathematische Absicherung. Obwohl das erste der durchgeführten Replikate eine statistische Signifikanz aufweist, konnte dies für die beiden weiteren Replikate gegenüber dem Wildtyp nicht bestätigt werden (Abb. 11 b, Daten s. Anhang).

Für Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 3, die schon in der Gesamtblattanalyse über das Mittel sehr geringe Anfälligkeitswerte aufwies, konnten hingegen erwartungsgemäß in allen der biologischen Replikate eine statistische Signifikanz gegenüber dem Wildtyp mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ bestätigt werden (Abb. 11 c, Daten s. Anhang).

Die Einzelblattanalyse der azygoten Kontroll-Linie zeigte eine Anfälligkeit gegenüber *Bgt*, welche vom Niveau des Wildtyps nicht unterscheidbar war (Abb. 11 d, Daten s. Anhang).

Somit konnten für zwei der drei ausgewählten transgenen Linien die in den vorab durchgeführten Experimenten gezeigten Tendenzen als statistisch signifikant belegt werden. Zudem konnte anhand der azygoten Kontrolle nachgewiesen werden, dass die biotechnologischen Modifikationen keine stressinduzierten Resistenzen in den Pflanzen verursacht haben.

Ergebnisse



Ergebnisse

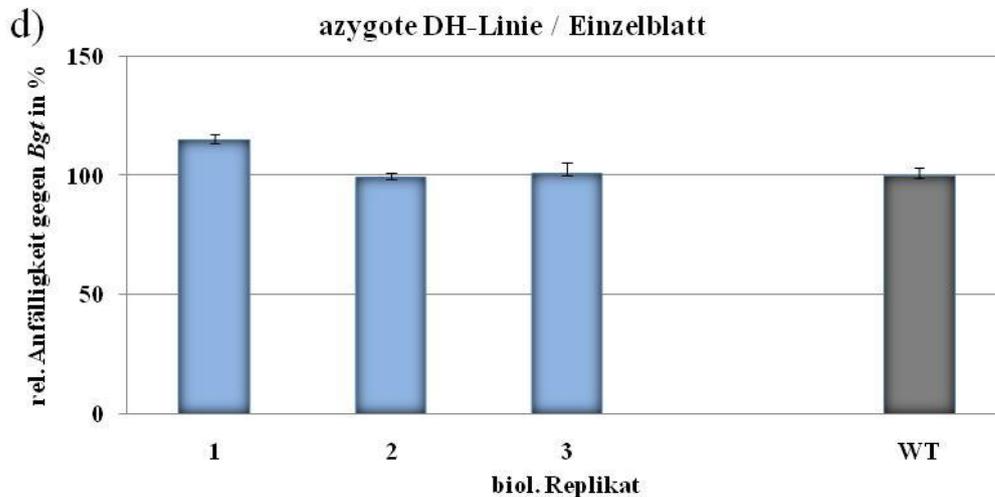


Abb. 11 a-d: Vergleich der *GstA1_p::TaMlo*-RNAi-DH Linien und des WT bezüglich der Anfälligkeitsausprägung gegenüber Mehltau (*Bgt*). Anhand einzelner Blattsegmente der transgenen Pflanzen (n=30) und des im jeweils gleichen Experiment parallel getesteten WT-Materials (n=36) wurde der Flächenanteil erfasst, der 7d nach Inokulation mit Mehltau bewachsen war. Mit diesen Daten wurde die relative Anfälligkeit der transgenen Linien gegenüber dem WT ermittelt und die statistische Signifikanz anhand einer ein-faktoriellen ANOVA mit nachfolgendem Test überprüft. Bei den dargestellten Säulen handelt es sich jeweils um eine der drei durchgeführten biologischen Replikate. Eine statistische Signifikanz des Unterschieds zum WT ist durch ein Sternchen markiert (* = $p < 0.05$) (Daten s. Anhang). a) Auswertung der relativen Anfälligkeit der Linie *GstA1_p::TaMlo*-RNAi-DH 1 (dunkelblaue Säulen) gegen den WT (graue Säule) unter Verwendung des Holm-Sidak Test für die Bestimmung der Signifikanz. b) Auswertung der relativen Anfälligkeit der Linie *GstA1_p::TaMlo*-RNAi-DH 2 (ockerfarbene Säulen) gegen den WT (graue Säule) unter Verwendung des Dunn-Test für die Bestimmung der Signifikanz. c) Auswertung der relativen Anfälligkeit der Linie *GstA1_p::TaMlo*-RNAi-DH 3 (rote Säulen) gegen den WT (graue Säule) unter Verwendung des Dunn-Test für die Bestimmung der Signifikanz. d) Auswertung der relativen Anfälligkeit der drei Replikate der azygoten Linie (hellblaue Säulen) gegen den WT (graue Säule). Die Unterschiede zwischen einzelnen Replikaten und WT waren statistisch nicht signifikant, also innerhalb der Größenordnung zufälliger Streuung.

3.1.5 Molekularbiologische Charakterisierung ausgewählter *pGstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien

Um sowohl die drei ausgewählten *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien als auch die azygote Kontroll-Linie molekularbiologisch weiterführend zu charakterisieren, wurden Experimente durchgeführt, die den Nachweis der Transgensequenz mittels PCR in genomischer DNA als auch in cDNA aus Epidermisgewebe, Gel-Blot-Hybridisierungsexperimenten sowie die Analyse der Transkriptabundanz von *Mlo* in der Epidermis mittels quantitativer real-time PCR umfassten.

3.1.5.1 PCR-basierte Segregationsanalyse anhand der *Mla*-Intronsequenz

Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass die Primärregenerate aus der embryogenen Pollenkultur über die *Mla*-Intronsequenz verfügen (s. 3.1.1.), sollte dies auch noch einmal für eine zufällige Auswahl an Individuen der entsprechenden DH-Linien nachgewiesen werden. Für die Analyse wurden je 20 Individuen auf die Anwesenheit der *Mla*-Intronsequenz in einer PCR mit identischen Oligonukleotiden wie in 3.1.1 untersucht (s. Abb. 12).

Dabei ließ sich nachweisen, dass bei allen DH-Nachkommenschaften, deren Elternpflanze hinsichtlich des Merkmals positiv getestet wurde, auch alle der untersuchten Individuen über die *Mla*-Intronsequenz verfügten. Dass sich in keiner der transgenen Linien eine Segregation der Nachkommenschaften zeigen lässt, belegt die Homozygotie der DH-Linien. Außerdem ist auch keine Amplifikation der *Mla*-Sequenz in der Nachkommenschaft der azygoten DH-Linie nachzuweisen

Ergebnisse

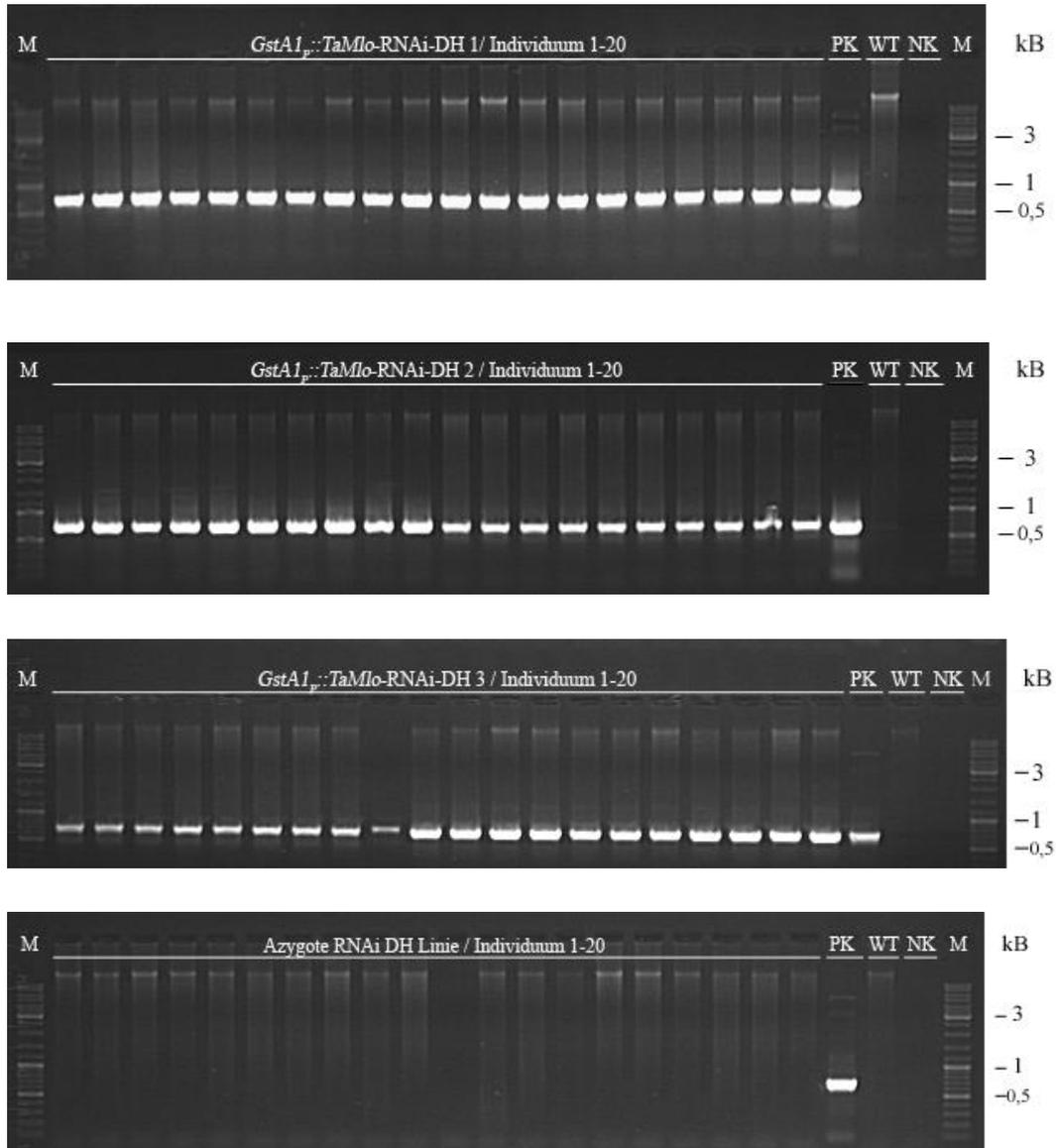


Abb. 12: Nachweis der *Mla*-Intronsequenz nach der DH-Generation in den Linien *GstA1_p::TaMlo-RNAi-DH 1-3* sowie der Azygoten mittels Amplifikation in einer PCR. Um in den ausgewählten DH-Linien einen molekularbiologischen Nachweis für die RNAi-Kassette zu erhalten, wurde in je 20 zufällig ausgewählten Individuen eine PCR-Reaktion auf die *Mla*-Sequenz durchgeführt. Als Kontrollen wurde der Transformationsvektor *GstA1_p::TaMlo-RNAi* (PK, Positivkontrolle), genomische DNA einer untransformierten Bobwhite-Pflanze (WT) sowie eine H₂O Kontrolle (NK, Negativkontrolle) mitgeführt. Bei dem mitgeführten Größenstandard (M, Marker) sind die Banden der Größe von 0,5, 1 und 3 Kilobasenpaaren (kB) zur Orientierung markiert.

3.1.5.2 Nachweis der *TaMlo*-RNAi repeats in genomischer DNA der ausgewählten *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH-Linien

Eine weitere Analyse umfasste den Nachweis der ersten und zweiten invertiert orientierten RNAi-Zielsequenzen (*RNAi-repeats*) der *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-Sequenz in der genomischen DNA der ausgewählten DH-Linien. Zudem sollte gezeigt werden, dass der Nachweis der beiden *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-repeats mit dem Nachweis der *Mla*-Intronsequenz korreliert. Zu diesem Zweck wurde in zufällig ausgewählten Individuen die *Mla*-Sequenz als auch die beiden *Mlo*-RNAi-repeats mittels PCR amplifiziert. Da es sich bei den beiden RNAi-repeats um Fragmente mit identischer Sequenz handelt, die sich nur hinsichtlich ihrer Orientierung und den flankierenden Sequenzen unterscheiden, wurden unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften spezifisch für beide *TaMlo*-repeats Oligonukleotide entworfen. Die resultierenden Oligonukleotide RNAi*TaMlo*1K-F1 und RNAi*TaMlo*1K-R1 (s. 2.2.2) amplifizieren eine 529 bp lange Sequenz, die eine Region aus dem Promotor in das erste *repeat* überspannt. Das zweite *repeat* wurde durch die Oligonukleotide RNAi*TaMlo*2K-F1 und RNAi*TaMlo*2K-R1 nachgewiesen (s. 2.2.2), indem eine Sequenz von 579 bp aus dem *Mla*-Intron in das zweite *repeat* der *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-Kassette verlaufend amplifiziert wurde. Die *Mla*-Intronsequenz entspricht der in 3.1.1 amplifizierten Sequenz (Abb. 13).

Ergebnisse

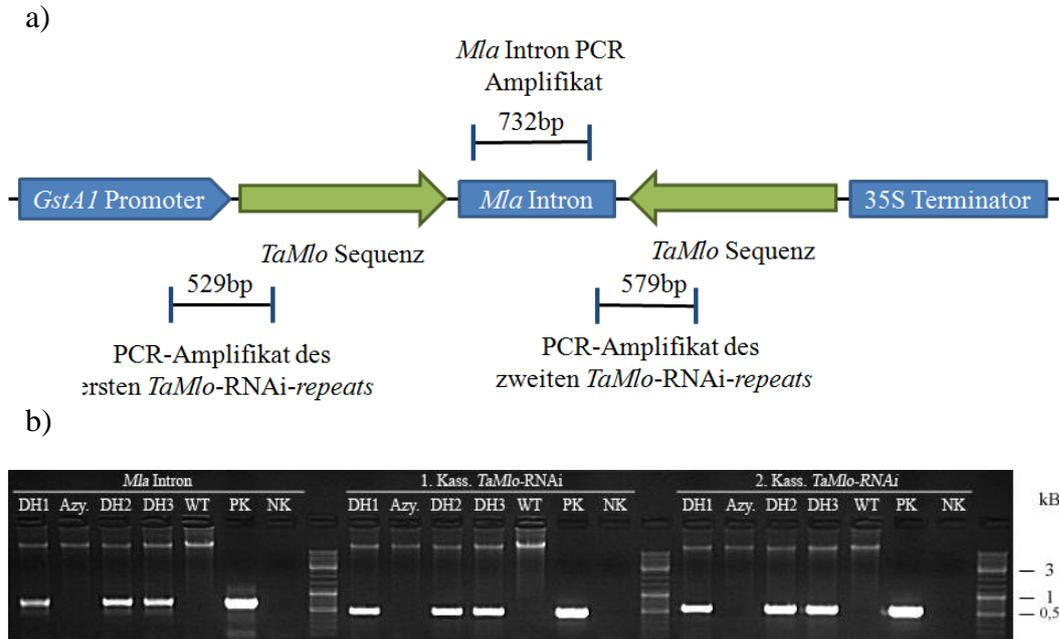


Abb.13: a) Schematische Lage der verwendeten Kombinationen von Oligonukleotiden und den Größen der zu erwartenden Amplifikate für den experimentellen Nachweis des *Mla*-Introns sowie der beiden RNAi repeats in den ausgewählten Linien *GstA1_p::TaMlo*-RNAi-DH 1-3 und der Azygoten in einer PCR. b) Amplifikation des *Mla*-Introns, sowie des ersten und zweiten *TaMlo*-RNAi-repeats in den ausgewählten *GstA1_p::TaMlo*-RNAi-DH Linien (DH 1-3) sowie der azygoten Kontroll-Linie in einer PCR. Die mitgeführten Kontrollen umfassen den Transformationsvektor *GstA1_p::TaMlo*-RNAi (PK), die genomische DNA einer untransformierten Bobwhite-Pflanze (WT) sowie eine H₂O Kontrolle (NK). Bei dem mitgeführten Größenstandard sind die Banden der Größe von 0,5, 1 und 3 Kilobasenpaaren (kB) zur Orientierung markiert.

Das Ergebnis der PCR Analyse zeigt einen Nachweis beider *TaMlo*-RNAi-repeats in den drei ausgewählten DH-Linien, in denen auch das *Mla*-Intron amplifiziert werden konnte. Dieser Nachweis bietet eine Aussage über die eigentliche Anwesenheit der einzelnen repeats des Transgens, ermöglicht allerdings keine Aussage über eine vollständige Integration funktioneller Kassetten. Wie bereits in dem vorab geführten Nachweis des *Mla*-Introns in den Regeneraten der embryogenen Pollenkultur (s. 3.1.1) konnte der Nachweis der transgenen Elemente erwartungsgemäß nicht in den azygoten Nachkommen geführt werden.

3.1.5.3 Gel-Blot-Hybridisierung

Die Charakterisierung der *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien umfasste weiterhin die Bestimmung der Kopienzahl als auch das Integrationsmuster der Transgene im Genom der Pflanzen. Als Hybridisierungssonde in den Gel-Blot-Experimenten wurde die mit den Primern *Mla*Intron-F und *Mla*Intron-R aus dem Transformationsvektor amplifizierte 732 bp lange *Mla*-Intronsequenz als Vorlage (*template*) für die Erstellung einer Digoxigenin (DIG)-markierten Sonde verwendet (s. Abb. 13 a). Die Hybridisierung erfolgte mit *Hind*III hydrolisierter genomischer DNA der ausgewählten *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien sowie der azygoten Kontrolle (Abb. 14-16).

Die Hybridisierung erfolgte für je zehn zufällig ausgewählte Individuen der Linien *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 1 sowie der azygoten Linie aus den DH-Nachkommen der Ausgangslinie 2. Das Hybridisierungsexperiment wurde bewusst parallel mit den beiden Probengruppen durchgeführt, um neben der Positivkontrolle in Form des Vektors einen Eindruck über die Hybridisierungsstärke der Sonde gegenüber einer transgenen genomischen DNA im Vergleich zu der azygoten Linie zu erhalten. Dabei konnte ein eindeutiges Signal bei der Hybridisierung der Sonde mit der DNA der transgenen Linien nachgewiesen werden, für die azygote Linie und den Wildtyp war dies nicht möglich.

Ergebnisse

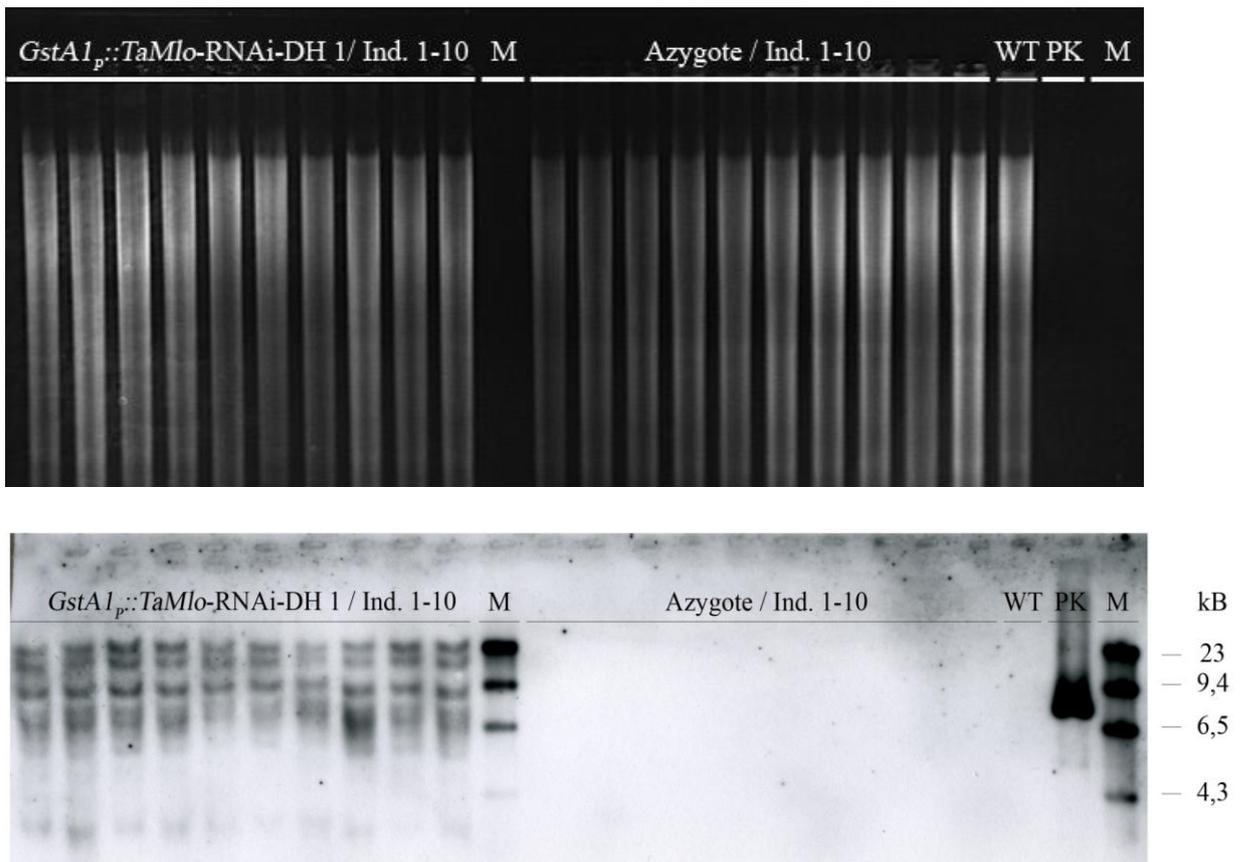


Abb. 14: Gel-Blot-Hybridisierungsexperiment der Linien *GstA1_p::TaMlo-RNAi-DH 1* sowie der Azygoten mit einer Sonde gegen das *Mla*-Intron. Abbildung der genomischen Weizen-DNA nach einer Hydrolyse mit *Hind*III nach gelelektrophoretischer Trennung als Ladekontrolle (oben) sowie dem nach der Gel-Blot-Hybridisierung erhaltenen Hybridisierungsmuster auf der Membran (unten). Als Kontrollen wurden in der Reaktion eine Positivkontrolle in Form des Transformationsvektors (PK, 7,6 kB) und der Wildtyp (WT) mitgeführt. Bei dem mitgeführten Größenstandard sind die Banden in Kilobasenpaaren (kB) zur Orientierung angegeben.

Das Ergebnis des Gel-Blot-Experimentes zeigt ein einheitliches Hybridisierungsmuster in allen Proben der Linie *GstA1_p::TaMlo-RNAi-DH 1*. Die exakte Anzahl der ermittelten Kopien ist aufgrund der geringen Auflösung des Blots nicht eindeutig zu bestimmen, allerdings zeigt sich für die untersuchte Linie ein sehr komplexes Hybridisierungsmuster mit mindestens sieben Hybridisierungsereignissen. Die azygote Linie wies erwartungsgemäß keine Hybridisierung mit der Sonde auf (Abb. 14).

Ergebnisse

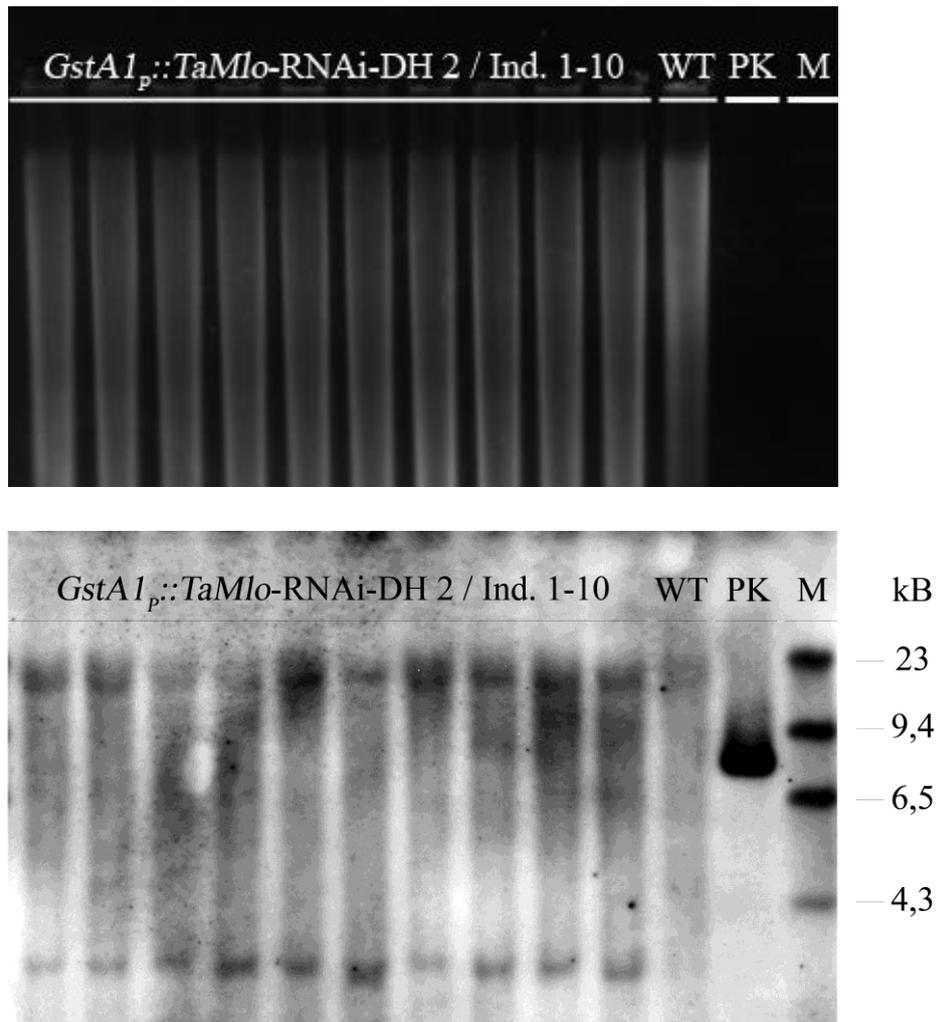


Abb. 15: Gel-Blot-Hybridisierungsexperiment der Linie *GstA1_p::TaMlo-RNAi-DH 2* mit einer Sonde gegen das *Mla*-Intron. Abbildung der genomischen Weizen-DNA nach einer Hydrolyse mit *Hind*III nach gelelektrophoretischer Trennung als Ladekontrolle (oben) sowie dem nach der Gel-Blot-Hybridisierung erhaltenen Hybridisierungsmuster auf der Membran (unten). Als Kontrollen wurden in der Reaktion eine Positivkontrolle in Form des Transformationsvektors (PK, 7,6 kB) und der Wildtyp (WT) mitgeführt. Bei dem mitgeführten Größenstandard sind die Banden in Kilobasenpaaren (kB) zur Orientierung angegeben.

Ein identisches Gel-Blot-Experiment mit einer DIG-*Mla*-Sonde wurde ebenfalls für zehn zufällig ausgewählte Individuen der Linie *GstA1_p::TaMlo-RNAi-DH 2* durchgeführt. In dieser Linie war eine Hybridisierung in der genomischen DNA unterhalb von 4 kB, sowie sehr schwache Signale mit Fragmenten größer als 7,6 kB (Positivkontrolle) einheitlich nachzuweisen (Abb. 15).

Ergebnisse

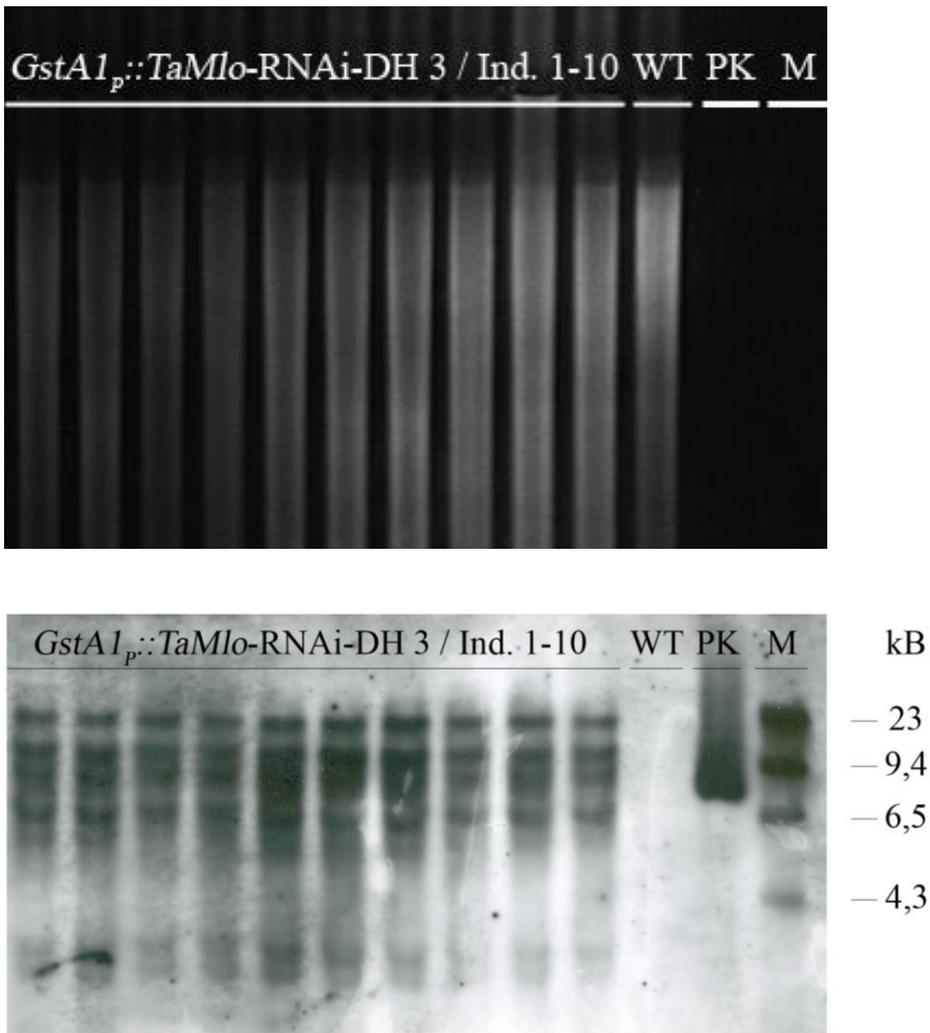


Abb. 16: Gel-Blot-Hybridisierungsexperiment der Linien *GstA1_p::TaMlo-RNAi-DH 3* mit einer Sonde gegen das *Mla*-Intron. Abbildung der genomischen Weizen-DNA nach einer Hydrolyse mit *HindIII* nach gelelektrophoretischer Trennung als Ladekontrolle (oben) sowie dem nach der Gel-Blot-Hybridisierung erhaltenen Hybridisierungsmuster auf der Membran (unten). Als Kontrollen wurden in der Reaktion eine Positivkontrolle in Form des Transformationsvektors (PK, 7,6 kB) und der Wildtyp (WT) mitgeführt. Bei dem mitgeführten Größenstandard sind die Banden in Kilobasenpaaren (kB) zur Orientierung angegeben.

Auch für Linie *GstA1_p::TaMlo-RNAi-DH 3* wurde die Anzahl der integrierten Kopien in dem Genom von zehn zufällig ausgewählten Individuen bestimmt. Dabei zeigt sich in allen untersuchten Proben ein einheitliches Hybridisierungsmuster innerhalb der Linie. Wie bereits in der Linie *GstA1_p::TaMlo-RNAi-DH 1* ist auch in dieser Linie ein komplexes

Ergebnisse

Integrationsmuster in den Pflanzen nachzuweisen, welches über mindestens acht Hybridisierungsereignisse mit der *Mla*-Sonde verfügt (Abb. 16).

Für die Linien *GstAlp::TaMlo*-RNAi-DH 1 und 3 lassen sich die eindeutigen Kopienzahlen hingegen nur schwer benennen, da das sehr große Weizengenom sowie die hohe Anzahl der integrierten Kopien eine dafür ausreichende Auflösung der Blots technisch sehr anspruchsvoll macht. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Linien eine Vielzahl von Transgenkopien aufweisen, die in einem komplexen Integrationsmuster vererbt werden, und dass die untersuchten DH-Linien jeweils ausnahmslos genetisch homogen sind.

Neben dem Nachweis der transgenen Sequenz in den drei ausgewählten DH-Linien konnte zudem keine Hybridisierung in Individuen der azygoten DH-Linie nachgewiesen werden.

3.1.5.4 Semi-quantitative Expressionsanalyse der endogenen *Mlo*-Abundanz in epidermaler cDNA

Neben dem Nachweis der *GstAlp::TaMlo*-RNAi-Kassette auf genomischer Ebene ist zudem die Expression der transgenen Sequenz von zentralem Interesse. Zu diesem Zweck wurden semi-quantitative Analysen auf die Expression der RNAi-Kassette und der mRNA des endogenen Weizen *Mlo*-Transkripts in der Epidermis als auch dem Restblatt durchgeführt. Außer dem Nachweis der eigentlichen Expression des Transgens sollten diese Analysen zeigen, in wie weit eine gewebespezifische Expression *in vivo* gegeben ist. Dazu wurde von 50 Pflanzen je ausgewählter DH-Linie die abaxiale Epidermis von dem restlichen Blatt getrennt und je ein Pool beider Gewebeschichten (Epidermis / Restblatt) separat gesammelt. Aus beiden Probenpools wurde die RNA isoliert. Bevor die isolierte RNA für weitere Versuche Verwendung fand, wurde sie auf ihre Integrität hin in einem Agarosegel untersucht (Abb. 17).

Ergebnisse

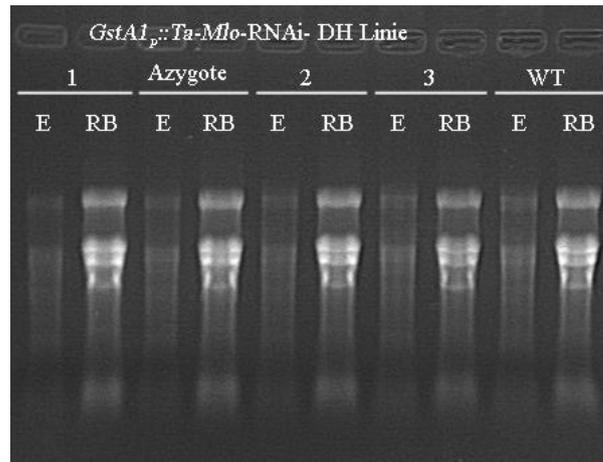


Abb. 17: Analyse der Integrität der verwendeten RNA der abaxialen Epidermis (E) sowie der Restblattprobe (adaxiale Epidermis + Mesophyll; RB) vor dem Umschreiben in cDNA durch Auftrennen in einem Agarosegel

Nach Überprüfung der Integrität der RNA konnte anhand von PolyA-Oligonukleotiden aus der mRNA-Population cDNA erstellt und in identischer Ausgangskonzentration in der nachfolgenden PCR eingesetzt werden. Dabei wurde mit drei verschiedenen Primerpaaren die Anwesenheit des *Mla*-Introns als Nachweis der Expression der *GstA1_P::TaMlo*-RNAi Kassetten (Oligonukleotide: *Mla*Intron-F und *Mla*Intron-R), der endogenen *Mlo*-Sequenz als Zielsequenz der RNAi-Kassetten (Oligonukleotide: *Mlo*-end-RT-F und *Mlo*-end-RT-R) und des endogenen *GAPDH* (Oligonukleotide: TaGAPDH-RT-F und TaGAPDH-RT-R) als interne Ladekontrolle amplifiziert (Abb. 18). Durch den Nachweis des *Mla*-Introns wurde gezeigt, dass sowohl in der Epidermis als auch in der Restblattprobe der transgenen DH-Linien die RNAi-Kassetten exprimiert werden. Ebenso ist zu bemerken, dass der Nachweis der *Mla*-Intronsequenz sowohl in dem Wildtyp als auch in der azygoten Kontroll-Linie erwartungsgemäß nicht geführt werden konnte.

Ergebnisse

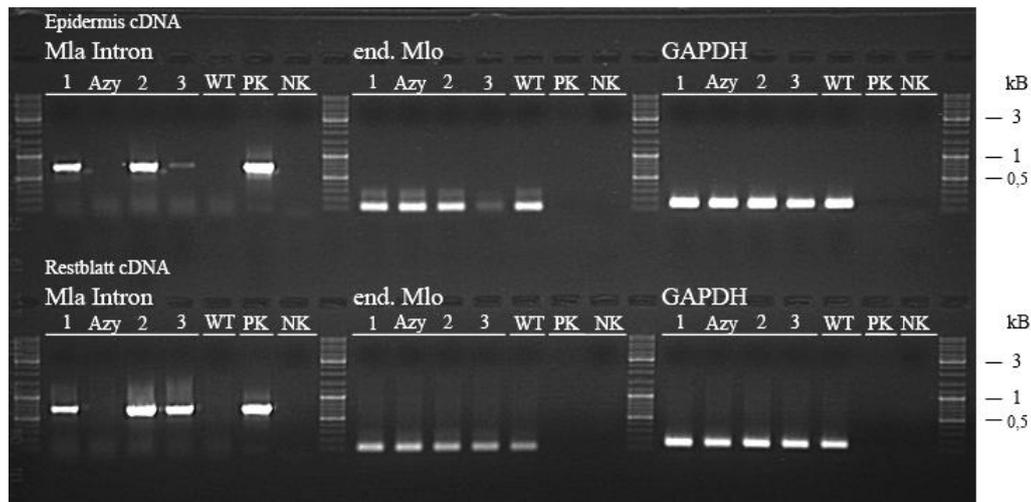


Abb. 18: Semi-quantitativer Nachweis der Expression der *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-Sequenz anhand des *Mla*-Introns (*Mla*), des endogenen *Mlo*-Transkript-Level (end. *Mlo*) sowie des endogenen *GAPDH* Levels (*GAPDH*) in cDNA der adaxialen Epidermis (obere Reihe) und den Restblatt-Proben (untere Reihe) der ausgewählten *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien sowie der azygoten Linie mittels PCR. Bei den untersuchten Proben handelt es sich um die ausgewählten *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 1-3 (1-3) sowie die azygote Linie (Azy.). Die Kontrollen umfassen den Transformationsvektor *GstAl_P::TaMlo*-RNAi (PK), die genomische DNA von nicht transformierten Bobwhite-Pflanzen (WT) sowie eine H₂O Kontrolle (NK). Bei dem mitgeführten Größenstandard sind ausgewählte Banden in Kilobasenpaaren (kB) zur Orientierung angegeben.

Der Nachweis der Transkriptabundanz des endogenen *Mlo* in der Epidermis als auch in den Restblattproben zeigte eine für alle Proben einheitliche Expression des Gens. Einzige Ausnahme bildete die epidermale Probe der Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 3, die eine deutliche Reduktion des *Mla*- als auch des *Mlo*-Expressionsniveaus aufwies. Dass es sich bei diesen Unterschieden nicht nur um Differenzen in der geladenen Menge des *templates* handelt, lässt sich durch die als Ladekontrolle mitgeführte Amplifikation der Transkriptabundanz des Haushaltsgens *GAPDH* zeigen. Anhand dieser Kontrolle lässt sich nachweisen, dass in dem Versuch annähernd identische Konzentrationen in den unterschiedlichen Proben Verwendung fanden und somit ein quantitativer Effekt aus unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen auszuschließen ist.

3.1.5.5 Abundanz von *Mlo*-RNA in Epidermis und Restblatt

Da die semi-quantitativen Analysen keine hinreichenden Hinweise lieferten, dass die Expression des endogenen *Mlo* in den transgenen Pflanzen einheitlich signifikant gegenüber dem WT vermindert ist, sollte eine Reduktion in der Expressionsstärke in den DH-Linien quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden die in der semi-quantitativen Analyse verwendeten Probenpools (Epidermis / Restblatt) in einer quantitativen *real-time* RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) analysiert. Die Analyse erfolgte als relative Messung des Expressionsniveaus des endogenen *Mlo* der Probenpools untereinander mit den vormalig in der semi-quantitativen Analyse verwendeten Oligonukleotiden. Als Normalisierungsstandard der verwendeten Ausgangsmengen wurde wiederum die Expression der endogenen *GAPDH* verwendet. Beim Referenzwert bezog sich die relative *Mlo*-Expression innerhalb der transgenen DH-Linien auf die Expression der azygoten DH-Linie, da sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, dass die Verwendung von homozygotem Referenzmaterial eine deutlich geringere Varianz in der Expression von *Mlo* aufwies als dies in den WT-Proben der Fall war. Die Überprüfung einer statistischen Signifikanz zwischen den Proben der DH-Linien und der azygoten Kontrolle erfolgte mittels ANOVA und anschließendem paarweisem Vergleich anhand der fünf technischen Replikate unter Verwendung des Computer-Programms „Sigma Stat 3“ (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland).

Ergebnisse

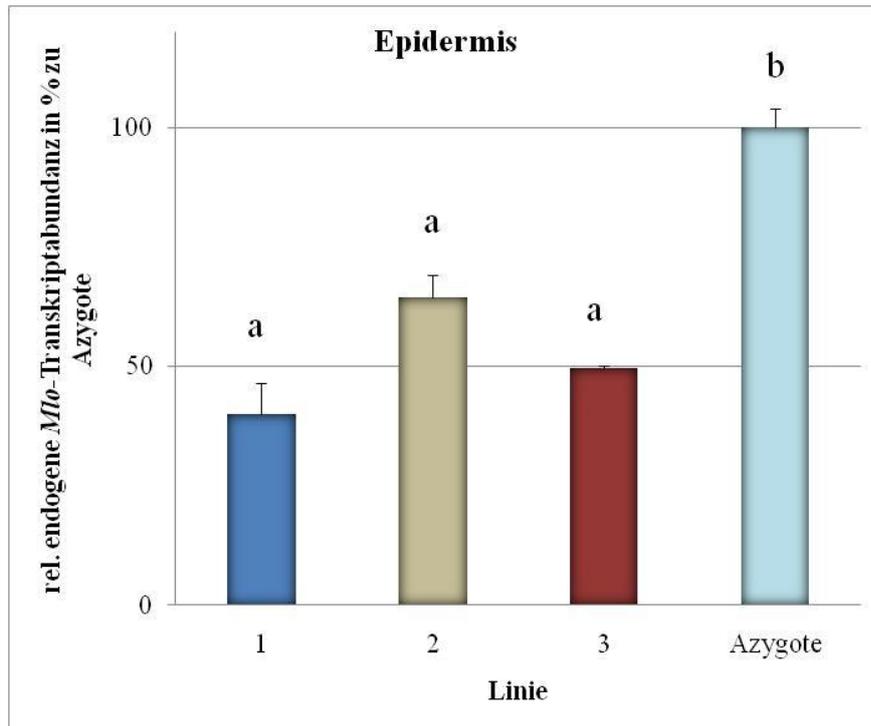


Abb. 19: Quantitative Analyse der endogenen *Mlo*-Transkriptabundanz in cDNA der ausgewählten *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 1-3 (1-3) in Relation zur Expressionsstärke der Azygoten (100%) in Epidermis Pools in einer *real-time* RT-PCR. In der Analyse wurde das Epidermisgewebe der untersuchten Linien in einem Pool vereinigt und in cDNA umgeschrieben. In den cDNA-Pools wurde das Expressionsniveau des endogenen *Mlo*-Transkriptlevels gemessen und anhand des Haushaltsgens *GAPDH* normalisiert. Alle der untersuchten transgenen Linien weisen dabei eine statistisch signifikante Differenz auf, die sich auf eine Reduktion von bis zu 45% des Referenzwertes belief. Der Messung lagen jeweilige Probenpools mit n=50 Individuen sowie fünf technischen Replikaten zugrunde. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Proben ist durch die Verwendung unterschiedlicher Buchstaben über den Säulen dargestellt ($p < 0,05$).

Die Analyse zeigte eine signifikante Reduktion der *Mlo* Transkriptabundanz in allen untersuchten DH-Linien in Relation zu der azygoten Kontroll-Linie. Die Reduktion der Abundanz in der Epidermis in den Probenpools belief sich in der Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 1 auf $44 \pm 13\%$, in Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 2 auf $64 \pm 4\%$ und in Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 3 auf $48 \pm 3\%$ des Wertes der Azygoten mit $100 \pm 4\%$. In allen Proben wurde eine statistisch signifikante Reduktion der Expression des endogenen *Mlo* bestätigt ($p < 0,05$).

Ergebnisse

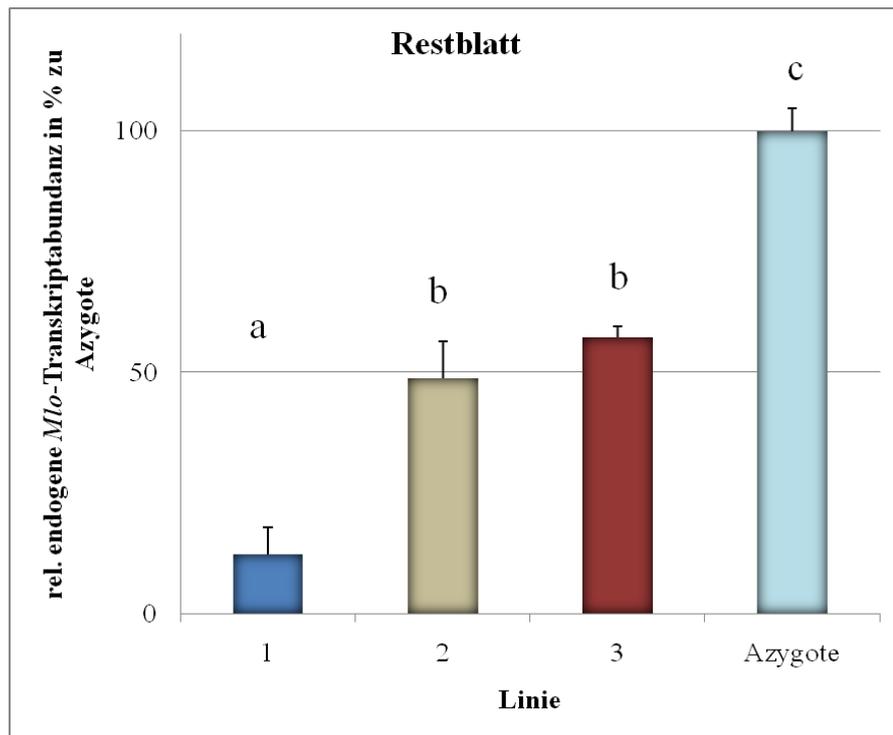


Abb. 20: Quantitative Analyse der endogenen *Mlo*-Transkriptabundanzen in cDNA der ausgewählten *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 1-3 (1-3) in Relation zur Expressionsstärke der Azygoten (100%) in Restblatt Pools in einer *real-time* PCR. In der Analyse wurde das Restblattgewebe der untersuchten Linien in einem Pool vereinigt und in cDNA umgeschrieben. In den cDNA Pools wurde das Expressionsniveau des endogenen *Mlo*-Transkriptlevels gemessen und anhand des Haushaltgens *GAPDH* normalisiert. Alle untersuchten transgenen Linien weisen dabei eine statistisch signifikante Differenz gegenüber der azygoten Linie auf, die sich auf eine Reduktion von bis zu 86% des Referenzwertes belief. Der Messung lagen jeweilige Probenpools mit n=50 Individuen sowie fünf technischen Replikaten zugrunde. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Proben ist durch die Verwendung unterschiedlicher Buchstaben über den Säulen dargestellt (p<0,05).

Neben den Proben des epidermalen Gewebes wurden ebenfalls die Probenpools des Restblattes untersucht, die sich sowohl aus der adaxialen Epidermis und dem gesamten Mesophylls zusammensetzten. Die Analyse der endogenen *Mlo*-Transkriptabundanz zeigt ein ähnliches Bild wie in der reinen Epidermisprobe. Die nachgewiesenen relativen *Mlo*-Abundanzen beliefen sich in den Restblattproben in der Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 1 auf 14±13%, in der Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 2 auf 48±7% sowie in der Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 3 auf 56±5% des Wertes der Azygoten mit 100±5%. Auch in diesen

Proben konnte eine statistische Signifikanz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (Abb. 20) bestätigt werden.

3.1.6 Analyse zur Spezifität der RNAi Sequenzen im Konstrukt *GstA1_P::TaMlo-RNAi*

Bei der Auswahl einer Sequenz für die Verwendung in einem RNAi-Konstrukt ist neben der Sequenzhomologie gegenüber dem herab zu regulierendem Gen auch zu prüfen, ob die Sequenz keine Homologien zu weiteren Genen hat, die zu einer ungewollten Abregulation derselben führen könnte. Gene, die über diese ungewollte Sequenzhomologie in einem RNAi Ansatz verfügen, werden als „*off targets*“ bezeichnet. Daher wurde die *TaMlo*-RNAi-Sequenz mit dem Internet-basierten Programm „siRNA Finder“ (Ambion, <http://www.ambion.com>) nach Sequenzen durchsucht, die aufgrund ihrer Struktur und Zusammensetzung besonders potente siRNA-Fragmente ergeben. Dabei wurden die in dem Programm vorgegebenen Parameter zur Bestimmung einer siRNA-Sequenz nach Elbashir et al. (Elbashir *et al.* 2001) verwendet. Es ließen sich in der 304 bp langen *TaMlo*-RNAi-Sequenz vier potentiell hoch effiziente siRNA-Sequenzen identifizieren (s. Anhang). Die Überprüfung von möglichen *off targets* erfolgte durch den Abgleich der siRNA-Sequenzen mit der *online* Weizen-Datenbank des NCBI. Ein repräsentatives Ergebnis für eine solche Analyse ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 11), wobei nur annotierte Sequenzen dargestellt sind.

Ergebnisse

Tabelle 11: Repräsentatives Ergebnis des Abgleichs eines aus der *TaMlo*-RNAi identifizierten siRNA-Sequenz mit der *online* Weizendatenbank des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) zur Analyse der Vermeidung möglicher *off-targets*. Das verwendete siRNA wurde mit dem Internet-basierten Programm „siRNA-Finder“ anhand der vorhergesagten Sequenz und Struktureigenschaften nach einem Algorithmus nach Elbashir (Elbashir *et al.* 2001) identifiziert. Bei der Auswertung wurden jeweils die annotierten Sequenzen der ersten zehn Ergebnisse berücksichtigt.

Ident. Nr	Akzession	Max score	E-value	Max ident.
AF384144.1	Triticum aestivum MLo protein mRNA, complete cds	42.1	7,00E-05	100%
AF361933.1	Triticum aestivum seven transmembrane-spanning protein (Mlo1) mRNA, partial cds	42.1	7,00E-05	100%
GQ397362.1	Triticum aestivum cultivar Hongyoumai Mlo protein mRNA, complete cds	34.2	0.017	95%
GQ397361.1	Triticum aestivum cultivar Yumai13 Mlo protein mRNA, complete cds	34.2	0.017	95%
AY584534.1	Triticum aestivum Mlo protein (Mlo) mRNA, partial cds	34.2	0.017	95%
AF361932.1	Triticum aestivum seven transmembrane-spanning protein (Mlo2) mRNA, complete cds	34.2	0.017	95%
AF384145.1	Triticum aestivum MLo1 protein mRNA, complete cds	34.2	0.017	95%

Die Analyse zeigt, dass es sich bei allen der sieben identifizierten Ziel-Sequenzen ausschließlich um verschiedene *Mlo* Sequenzen handelt. Es ist zu beachten, dass nur die Sequenzabschnitte der *TaMlo*-RNAi Sequenz berücksichtigt wurden, die hinsichtlich der vorhergesagten Struktureigenschaften hoch effektive siRNA-Fragmente ergeben und es wurden nur annotierte Sequenzen aus der Weizendatenbank des NCBI aufgeführt. Weiterhin bleibt zu bedenken, dass eine vollständige Sequenzierung des Weizengenoms noch aussteht und somit von einer hohen Spezifität der verwendeten *TaMlo*-RNAi Sequenz ausgegangen werden kann, die jedoch keine abschließende Aussage auf Vollständigkeit der möglichen *off-targets* zulässt.

Ergebnisse

Eine weitere Analyse umfasste die Bestimmung der Spezifität der verwendeten *TaMlo*-RNAi Sequenz gegenüber den weiteren *TaMlo*-Homologen. Dabei wurde ein direkter Sequenzabgleich zwischen der *TaMlo*-RNAi Sequenz, die ihren Ursprung in *TaMlo*-1 hat, mit den sechs weiteren Homologen durchgeführt. Hier konnte in keiner der Homologe *TaMlo*-2 bis *TaMlo*-7 eine 21 bp überspannende Sequenzhomologie mit der RNAi-Sequenz nachgewiesen werden.

3.2 Analyse der *pGstAI_P::HvMlo*-RNAi Pflanzen

Neben den biolistisch transformierten Weizenlinien wurden weitere stabil transformierte Bobwhite-Linien mittels Agrobakterien-vermitteltem Gentransfer erstellt. Zu diesem Zweck wurde ein funktionell identischer, binärer Vektor kloniert, der in einem *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer eingesetzt wurde. Die damit erstellten transgenen Linien waren in erster Linie dafür gedacht, im Fall eines nicht nachweisbaren Phänotyps bei der Analyse der biolistisch hergestellten Linien, rechtzeitig auf alternative Weise generiertes Material zur Verfügung zu haben.

3.2.1 Erstellung des Vektors *pGstAI_P::HvMlo*-RNAi

Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation wurde ein Binärvektor generiert, der ebenso wie der für die biolistische Transformation verwendete Vektor eine *Mlo*-RNAi-Kassette unter Kontrolle des epidermisspezifischen *GstAI*-Promotors aus Weizen trägt. Die Klonierung dieses Konstruktes erfolgte im Rahmen der Entwicklung eines Sets generischer Vektoren, die insbesondere auf die Verwendbarkeit für monokotyle Pflanzen zugeschnitten wurden (Himmelbach *et al.* 2007). Diese bezüglich Promotor und Selektionsmarker modular aufgebauten Vektoren gestatten eine GATEWAY-basierende (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) Integration beliebiger Effektorsequenzen. Dieses Prinzip führte in der vorliegenden Arbeit zur Erstellung des Vektors *GstAI_P::HvMlo*-RNAi (Abb. 21).

Ergebnisse

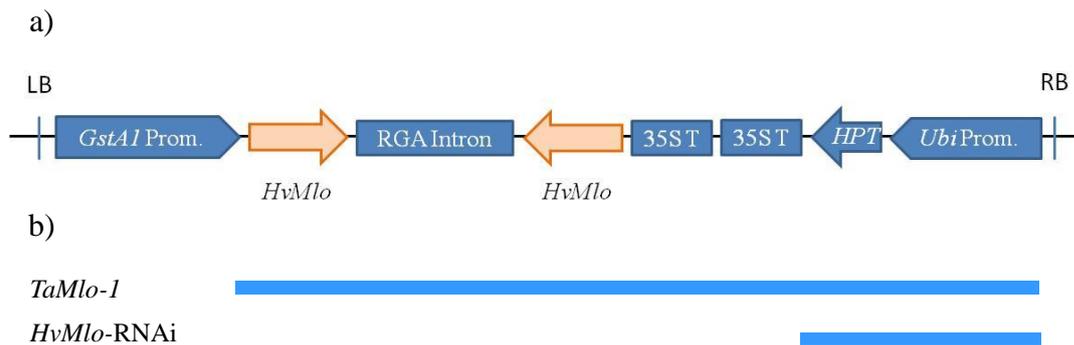


Abb. 21: a) Schematische Darstellung der T-DNA des Transformationsvektors *pGstAI_p::HvMlo-RNAi*. Das Konstrukt ist funktionell identisch mit dem Vektor, der für den biolistischen Gentransfer Verwendung fand. Die *GstAI_p::HvMlo-RNAi* Kassetten stehen unter Kontrolle des epidermisspezifischen *GstAI*-Promotors aus Weizen. Die invertierten *repeats* werden durch ein *RGA*-Intron getrennt. Sowohl in der RNAi-Kassette als auch der Expressionskassette des Selektionsgens (*HPT*) findet ein 35S-Terminator (35ST) aus dem Blumenkohl Mosaik Virus (*CaMV*) Verwendung. Die Expression von *HPT* steht unter der Kontrolle des *Ubiquitin*-Promotors aus Mais. Die T-DNA wird durch die LB- („Left Border“) und RB- („Right Border“) Sequenz aus *A. tumefaciens* begrenzt. b) Schematische Lage des 545 bp langen *HvMlo-RNAi* Sequenzabschnitts in der cDNA Sequenz von *TaMlo-1* (GenBank: AF361933).

Als Resistenzmarker trägt der Vektor das *HYGROMYCIN-PHOSPHOTRANSFERASE* Gen (*HPT*) unter der Kontrolle des Mais *UBIQUITIN* Promotors (*Ubi_p*) (Abb. 21), welches als Teil der transferierten T-DNA in den Pflanzen cosegregiert. Die *HPT*-Sequenz wurde in nachfolgenden Analysen stellvertretend als Nachweis der Anwesenheit der gesamten T-DNA in dem Genom der Pflanzen verwendet.

3.2.2 Analyse zur Spezifität der RNAi Sequenzen im Konstrukt *GstAI_p::HvMlo-RNAi*

Um für das Konstrukt *GstAI_p::HvMlo-RNAi* die Spezifität der verwendeten *Mlo*-RNAi Sequenz hinsichtlich der endogenen *TaMlo*-Sequenz zu überprüfen, wurde ein Sequenzabgleich mit dem Homologiealgorithmus BLAST (Altschul *et al.* 1997) mit der Weizen-Datenbank des NCBI durchgeführt. Diese Analyse ergab zehn signifikante Sequenzen, die im Folgenden dargestellt sind (Tab. 12).

Ergebnisse

Tabelle 12: Ergebnis des Abgleichs der *HvMlo*-RNAi aus dem Konstrukt *GstA1p::HvMlo*-RNAi mit der Weizen-Datenbank des *National Center of Biotechnology* (NCBI). Der Abgleich ergab in allen erhaltenen Akzessionen eine nahezu vollständige Übereinstimmung (Max. Ident. >90%) mit der Sequenz des endogenen *Mlo* aus Weizen bei einer Wahrscheinlichkeit zufälliger Übereinstimmung der Sequenzen von $E=8e^{-74}$.

		Max Score	Total score	Query coverage	E-value	Max ident
AK333144.1	Triticum aestivum cDNA, clone WR005_M02, cultivar: Chinese Spring	917	917	70%	0E+00	91%
AF361932.1	Triticum aestivum seven transmembrane-spanning protein (Mlo2) mRNA, partial cds	915	915	69%	0E+00	91%
AF361933.1	Triticum aestivum seven transmembrane-spanning protein (Mlo1) mRNA, partial cds	891	891	67%	0E+00	92%
AF384145.1	Triticum aestivum Mlo1 protein mRNA, complete cds	937	937	65%	0E+00	91%
AY084049.1	Triticum aestivum Mlo-like protein mlo1112 mRNA, partial cds	774	774	57%	0E+00	92%
GQ397361.1	Triticum aestivum cultivar Yumai 13 Mlo protein mRNA, complete cds	763	763	60%	0E+00	91%
BT009054.1	Triticum aestivum clone wdr.pk0006.a3: fis, full insert mRNA sequence	760	760	59%	0E+00	91%
AF384144.1	Triticum aestivum Mlo protein mRNA, complete cds	760	760	60%	0E+00	91%
GQ397362.1	Triticum aestivum cultivar Hongyoumai Mlo protein mRNA, complete cds	758	758	60%	0E+00	90%
AY584534.1	Triticum aestivum Mlo protein (Mlo) mRNA, partial cds	278	278	19%	8E-74	93%

Bei allen Sequenzen handelt es sich um Allele von *Mlo* aus Weizen. Wie bereits bei der Sequenzanalyse für das Konstrukt *GstA1p::TaMlo*-RNAi erwähnt, ist auch hier wiederum die Problematik der noch ausstehenden Information über das vollständige Genom von Weizen zu nennen, und somit ist die Vollständigkeit der Liste nicht gewährleistet.

Entsprechend der *TaMlo*-RNAi Sequenz wurde auch für die *HvMlo*-RNAi Sequenz die Spezifität gegenüber den sieben bekannten *TaMlo*-Homologen aus Weizen überprüft. Dabei verfügt die verwendete *HvMlo*-Sequenz über die höchste Homologie zu der endogenen *TaMlo-1* Sequenz. Bei den weiteren sechs *TaMlo*-Homologen handelt es sich um „*in silico*“ identifizierte Sequenzen, die die charakteristische siebenfache Transmembranhelix aufweisen (Konishi *et al.* 2010). Ähnlich wie bei der verwendeten *TaMlo*-RNAi Sequenz (100%) ist auch für die verwendete *HvMlo*-RNAi Sequenz (93%) eine sehr hohe Sequenzhomologie mit

Ergebnisse

TaMlo-1 vorhanden. Bei einem Abgleich zwischen der *HvMlo*-RNAi Sequenz und den restlichen Homologen hinsichtlich einer 21 bp langen Sequenzhomologie, die für die Induktion einer RNAi-basierten Abwehr notwendig ist, konnte nur für das Homolog *TaMlo-6* eine 22 bp lange Übereinstimmung nachgewiesen werden. Für die restlichen fünf *TaMlo*-Homologe ist eine Suppression aufgrund der fehlenden Sequenzhomologie mit der verwendeten *HvMlo*-RNAi Sequenz nicht zu erwarten.

Wie für die *TaMlo*-RNAi Sequenz wurde auch die Analyse zur Vermeidung einer unerwünschten Abregulation von Genen mit einer hohen Sequenzhomologie (*off-targets*) für die *HvMlo*-RNAi-Sequenz durchgeführt. Dabei wurde mit dem Internet-basierten Programm „siRNA-Finder“ (Ambion) die *HvMlo*-RNAi Sequenz nach Bereichen durchsucht, die aufgrund ihrer Struktur und Zusammensetzung als besonders potente siRNA-Fragmente zu werten sind.

Für die *HvMlo*-RNAi-Sequenz konnten elf potentielle siRNA-Sequenzen identifiziert werden, die mit dem im Programm vorgegebenen Parametern zur Bestimmung einer siRNA-Sequenz nach Elbashir et al. (Elbashir *et al.* 2001) ermittelt wurden (s. Anhang).

Die Überprüfung von möglichen *off targets* erfolgte durch den Abgleich der identifizierten siRNA-Sequenzen mit der *online* Weizen-Datenbank des NCBI. Ein repräsentatives Ergebnis für eine solche Analyse ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 13), wobei nur annotierte Sequenzen dargestellt sind.

Ergebnisse

Tabelle 13: Repräsentatives Ergebnis des Abgleichs eines aus der *HvMlo*-RNAi identifizierten siRNA-Sequenz mit der *Online*-Weizendatenbank des NCBI zur Analyse der Vermeidung möglicher *off-targets*. Die verwendete siRNA wurde mit dem Internet-basierten Programm „siRNA-Finder“ (Ambion) anhand der Sequenz und Struktureigenschaften nach einem Algorithmus nach Elbashir (Elbashir *et al.* 2001) identifiziert. Bei der Auswertung wurden nur die annotierten Sequenzen der ersten zehn Ergebnisse berücksichtigt.

Ident. Nr	Akzession	Max score	E-value	Max ident.
GQ397362.1	Triticum aestivum cultivar Hongyoumai Mlo protein mRNA, complete cds	66.4	7,00E-05	100%
GQ397361.1	Triticum aestivum cultivar Yumai Mlo protein mRNA, complete cds	66.4	7,00E-05	100%
AY584534.1	Triticum aestivum Mlo protein (Mlo) mRNA, partial cds	66.4	7,00E-05	100%
AY084049.1	Triticum aestivum Mlo-like protein mlo1112 mRNA, partial cds	42.1	7,00E-05	100%
AF384144.1	Triticum aestivum MLo protein mRNA, complete cds	66.4	7,00E-05	100%
AF361933.1	Triticum aestivum seven transmembrane- spanning protein (Mlo1) mRNA, partial cds	66.4	7,00E-05	100%
AF361932.1	Triticum aestivum seven transmembrane- spanning protein (Mlo2) mRNA, complete cds	66.4	7,00E-05	100%
AF384145.1	Triticum aestivum MLo1 protein mRNA, complete cds	66.4	7,00E-05	100%

Die Analyse zeigt, dass es sich bei allen der acht identifizierten Ziel-Sequenzen ausschließlich um verschiedene *Mlo* Sequenzen handelt. Bei der Analyse ist zu beachten, dass nur die Sequenzabschnitte der *HvMlo*-RNAi Sequenz berücksichtigt wurden, die hinsichtlich der vorhergesagten Struktureigenschaften hoch effektive siRNA-Fragmente ergeben und es wurden nur annotierte Sequenzen aus der Weizendatenbank des NCBI aufgeführt. Auch hier sei noch einmal erwähnt, dass eine vollständige Sequenzierung des Weizengenoms noch aussteht und somit kann von einer hohen Spezifität der verwendeten *HvMlo*-RNAi Sequenz ausgegangen werden, die jedoch keine abschließende Aussage auf Vollständigkeit der möglichen *off-targets* zulässt.

3.2.3 Gentransfer des *pGstAl_P::HvMlo*-RNAi Konstruktes mittels *A. tumefaciens* in Weizen

Der Gentransfer des Konstruktes *pGstAl_P::HvMlo*-RNAi erfolgte mit dem Agrobakterienstamm *AGL-1* in Zellen von unreifen Embryonen von Bobwhite. Die Regeneration der Pflanzen erfolgte über die Kultivierung von Kallusgewebe *in vitro* (s. 2.2.9) (Abb. 22).

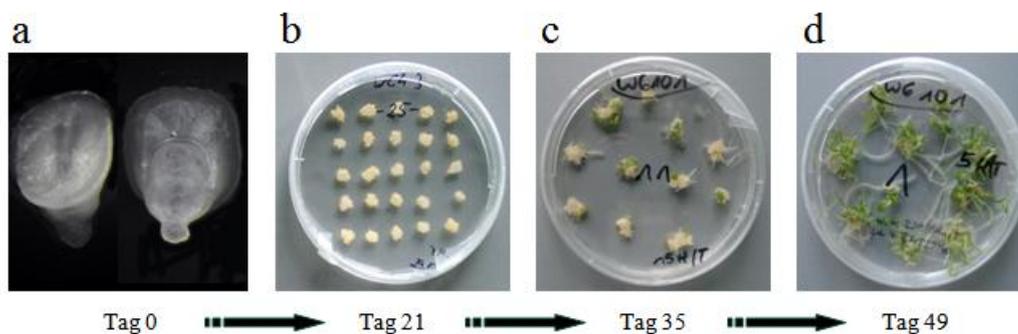


Abb. 22 a-d: Beispielhafte Darstellung der durchlaufenen Entwicklungsstadien von Pflanzen in der Gewebekultur nach dem Gentransfer in unreife Embryonen (Fotos: G. Hensel und J. Kumlehn). a) Abbildung von unreifen Weizenembryonen (IEs), die als Zielgewebe für den Gentransfer verwendet wurden. b) Induzierte Kalli einer *in vitro* Kultur nach vier Tagen unter Selektionsdruck durch Hygromycin (Tag 21 nach Kokultur). c) Kalli, die nach einer 10-tägigen Belichtungsphase grüne Gewebebereiche zeigten, wurden weiter in Kultur mit Selektionsdruck geführt und für zwei mal zwei Wochen kultiviert. d) Regenerate mit vegetativen Blattstrukturen nach 28-tägigem Selektionsdruck in Kultur (insgesamt Tag 49 nach Kokultur mit Agrobakterien)

Es wurden aus 1.350 unreifen Embryonen drei primärtransgene Pflanzen regeneriert, die im Folgenden als E5-E7 (Embrयो) bezeichnet wurden. Die erzielte Transformationseffizienz beläuft sich auf drei Promille (3 ‰) und weist damit eine um den Faktor zehn geringere Transformationseffizienz auf, als bei vergleichbaren Weizentransformationen mit identischem Genotyp und Agrobakterienstamm, bei denen ein Überexpressionskonstrukt verwendet wurde (Hensel *et al.* 2009). Die Regenerate wurden durch eine PCR Analyse in der T0

Generation auf die Anwesenheit der *HPT*-Sequenz mit den Oligonukleotiden HYG-F und HYG-R (s. 2.2.2) untersucht (Daten nicht dargestellt).

3.2.4 Identifikation von putativ homozygoten T2-Familien mittels Segregationsanalyse des *HPT*-Gens

Um in den nachfolgenden Analysen homozygotes Material verwenden zu können, wurden die Pflanzen der T2 Generation in einer Segregationsanalyse hinsichtlich des Nachweises des cosegregierenden Selektionsmarkergens *HPT* unterzogen. Dies erfolgte, da aus hemizygotem Material der T0-Generation durch natürliche Rekombination in der Nachkommenschaft homozygote Individuen zu erwarten waren. Wird dieses Saatgut in einer Einzelkornvermehrung in die T2-Generation überführt, ist in kleistogamen Weizen davon auszugehen, dass sich in allen Nachkommen von homozygotem T1-Ausgangsmaterial das transgene Merkmal nachweisen lässt. Eine schematische Darstellung des Erstellungs- und Analyseprozesses ist unter Abb. 23 dargestellt.

Ergebnisse

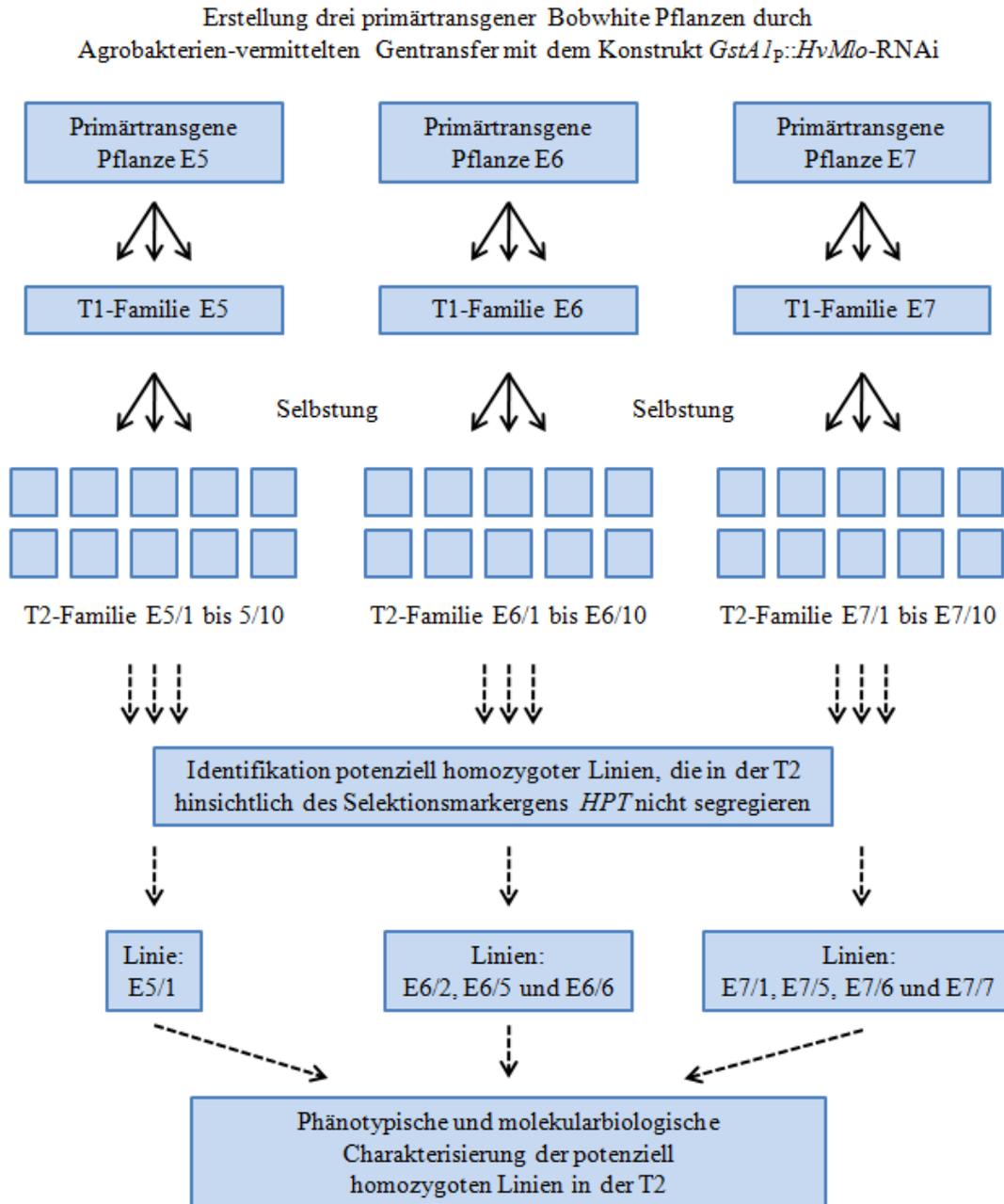


Abb. 23: Schematische Darstellung des Erstellungsprozesses und der Auswahl der im Detail untersuchten potenziell homozygoten Linien *GstA1_p::HvMlo-RNAi*

Der Nachweis der Resistenz gegenüber dem Selektionsagens Hygromycin in Blattsegmenten von Pflanzen aus den T2-Familien erfolgte, indem die Blattsegmente in einem hygromycinhaltigem Medium inkubiert wurden. Ein Beispiel für ein daraus resultierendes Ergebnis ist Abb. 24 zu entnehmen.

Ergebnisse

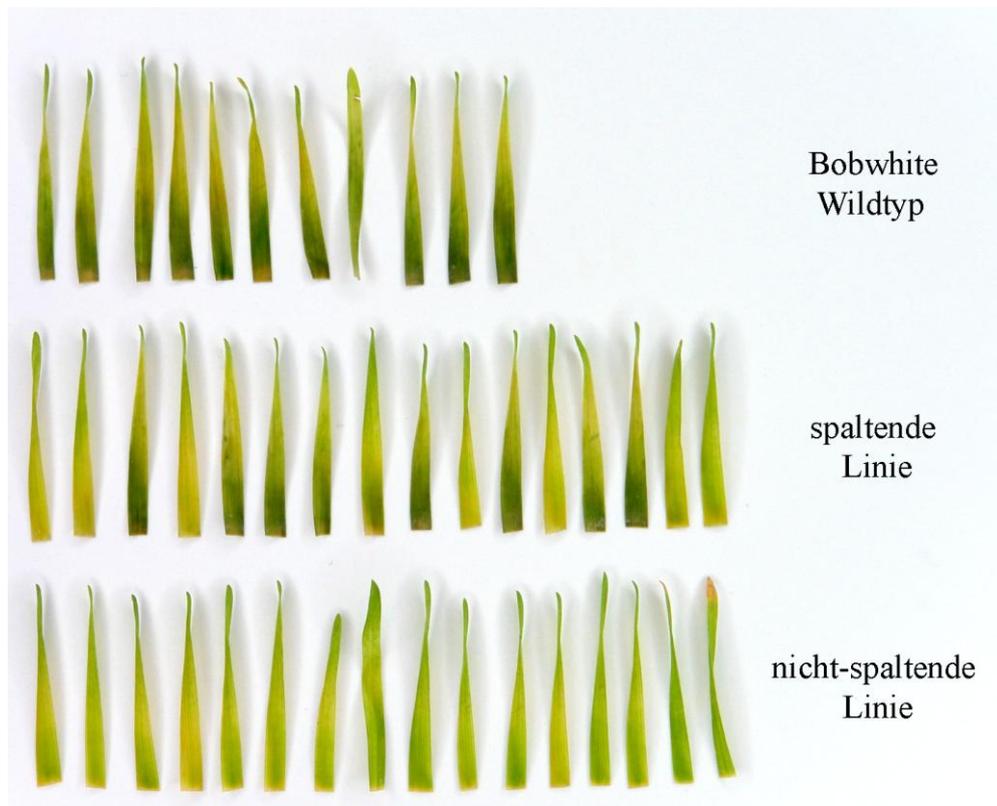


Abb. 24: Abbildung eines repräsentativen Ergebnisses der Analyse der Resistenz gegen das Selektionsagens Hygromycin in T2-Familien der *GstAl_P::HvMlo*-RNAi Linien und dem WT. Die Analyse wurde an 16 Individuen einer jeden Familie und bis zu zwölf Blattsegmenten von WT-Pflanzen durchgeführt. Das phänotypische Merkmal der Hygromycin-Resistenz ist an der Verfärbung der Blattbasis der nicht transgenen Blattsegmente zu erkennen.

Diese Voruntersuchung erfolgte an je 16 individuellen Blattsegmenten von je zehn zufällig ausgewählten T2-Familien der drei Ausgangspflanzen *GstAl_P::HvMlo*-RNAi E 5-7 als auch an den mitgeführten WT-Pflanzen. Als phänotypisches Merkmal diente die spezifische Verfärbung der Blattbasis in Individuen, die nicht über die *HPT*-Sequenz verfügen.

Das Ergebnis der Segregationsanalyse ist in Tab. 14 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 14: Übersicht über Anzahl der identifizierten putativ homozygoten (nicht-spaltenden) Linien anhand der Reinerbigkeit des *HPT* Markergens in den T2-Familien der agrobakteriell-transformierten *GstAI_P::HvMlo*-RNAi Linien. Die Analyse umfasste je zehn zufällig ausgewählte Geschwister aus der T2-Generation. In jeder T2-Familie wurden 16 Individuen untersucht

	untersuchte T2 Familien	nicht-spaltende Familien	spaltende Familien	azygote Familien
Ausgangslinie 1 (E5)	10	1	7	2
Ausgangslinie 2 (E6)	10	3	5	2
Ausgangslinie 3 (E7)	10	4	4	2

Es wurden unter den untersuchten zehn T2-Familien der drei Ausgangslinien E5-E7 putativ homozygote (nicht-spaltende) Populationen identifiziert. Die Anzahl der putativ homozygoten Linien beläuft sich bei der Ausgangslinie 1 (E5) auf eine Linie, bei der Ausgangslinie 2 (E6) auf drei Linien sowie bei der Ausgangslinie 3 (E7) auf vier putativ homozygote Linien. Zudem lässt sich durch das Segregationsverhältnis von 1:2:1 (nicht-spaltenden zu spaltenden zu azygoten T2-Familien) darauf schließen, dass es sich bei deren T1-Mutterpflanze um ein Individuum mit nur einem Integrationslocus handelt.

Der gewählte Probenumfang lässt dabei aufgrund der geringen Individuenzahl je T2-Familie (n=16) keine abschließende Aussage zu, in wie weit es sich tatsächlich um homozygote Linien handelt. Der Test diente allerdings in diesem Falle einer einfachen und schnellen Evaluierung in den T2-Familien. Dabei konnten putativ homozygote in sechs der sieben T2-Familien identifiziert werden (Tab.15).

Ergebnisse

Tabelle 15: Übersicht der T2 Familien, die als putativ homozygot aus der Analyse der Segregationsexperimente hinsichtlich der Resistenz gegenüber Hygromycin identifiziert wurden. Bei den dargestellten T2-Populationen wurden unter den je 16 Individuen, die hinsichtlich der Anwesenheit des cosegregierenden *HPT*-Gens untersucht wurden, keine aussegregierenden Individuen detektiert. Die aufgeführten Nachkommenschaften wurden aufgrund der nicht-spaltenden Eigenschaft in nachfolgenden Phänotypisierungsanalysen weiter charakterisiert.

Untersuchte Linien	Putative homozyote Linie
Ausgangslinie 1 (E5 /1-10)	E5/1
Ausgangslinie 2 (E6/ 1-10)	E6/2
	E6/5
	E6/6
Ausgangslinie 3 (E7 /1-10)	E7/1
	E7/5
	E7/6
	E7/7

Diese putativ homozygoten T2-Familien wurden als Kandidaten für weiterführende Analysen ausgewählt. Diese umfassten die Bestimmung der Anzahl der integrierten Genkopien sowie ihrer phänotypischen Resistenz gegenüber *Bgt*. In Abhängigkeit des verfügbaren Saatgutes musste auf eine weiterführende Untersuchung der Linie *GstAl_P::HvMlo*-RNAi E6/6 verzichtet werden.

Für die phänotypische Evaluierung wurde, wie zuvor bereits an den *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien verfahren (s. 2.2.12), in diesem Rahmen eine große Anzahl an Individuen einzelner Linien untersucht. Dabei wurden alle Individuen von zwei der drei biologischen Replikate, die für die Phänotypisierung angezogen wurden, ebenfalls auf Präsenz des *HPT*-Gens untersucht. Das Resultat ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen (Tab. 16).

Ergebnisse

Tabelle 16: Ergebnis der Segregationsanalysen anhand des Merkmals der Hygromycin-Resistenz in Blattsegmenten der putativ homozygoten T2-Familien in den für die Phänotypisierung angezogenen Pflanzen (n=60).

T2-Familie	HPT pos.	HPT neg.	n
E5/1	59	0	59
E6/2	59	0	59
E6/5	59	0	59
E7/1	59	0	59
E7/5	60	0	60
E7/6	60	0	60
E7/7	56	3	59
WT ges.	4	267	271

Aus dem Ergebnis lassen sich dabei zusätzlich Schlüsse über die Zuverlässigkeit des Testes ziehen. Bei den 271 untersuchten WT-Pflanzen kam es zu vier falsch-positiven Ereignissen, was 1,47 Prozent entspricht. Daraus ergibt sich eine Fehlerquote von einem falsch-positiven Ereignis pro 67 Individuen. Bei der vorliegenden Untersuchung ist bei dem Umfang von 60 Individuen bei der ermittelten Fehlerquote von 1,47 Prozent mit 0,9 falsch-positiven Ereignissen zu rechnen.

In der T2-Population von *GSTAI_P::HvMlo*-RNAi E7/7 konnten drei Individuen identifiziert werden, die keine Resistenz gegenüber Hygromycin aufweisen. In den übrigen sechs der sieben T2-Familien konnte keine Segregation ermittelt werden.

3.2.5 Nachweis der *HvMlo*-RNAi-repeats in genomischer DNA der *GSTAI_P::HvMlo*-RNAi T2-Linien

Um die Integration der Expressionskassette *GstAI_P::HvMlo*-RNAi auf genomischer Ebene nachzuweisen, wurden die einzelnen RNAi-repeats in einer PCR nachgewiesen (Abb. 25).

Ergebnisse

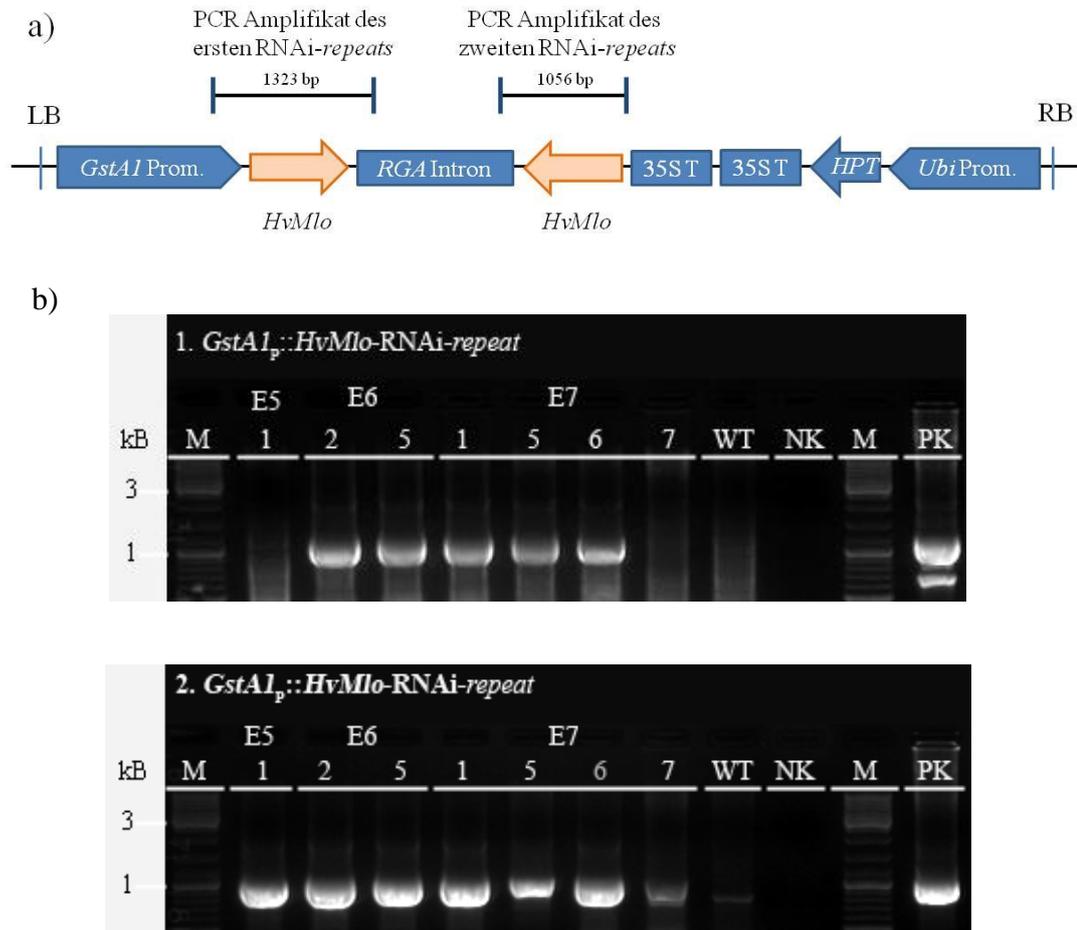


Abb. 25: a) Schematische Darstellung der Lage der verwendeten Oligonukleotide und der nach einer PCR resultierenden Größen der zu erwartenden Amplifikate und b) der experimentelle Nachweis der beiden RNAi-repeats in Individuen der putativ homozygoten T2-Familien von *GstA1_p::HvMlo-RNAi-E5-7*. Die mitgeführten Kontrollen umfassen den Transformationsvektor *GstA1_p::HvMlo-RNAi* (PK), die genomische DNA einer untransformierten Bobwhite-Pflanze (WT) sowie eine H₂O Kontrolle (NK). Bei dem mitgeführten Größenstandard sind die Banden der Größe von 1 und 3 Kilobasenpaaren (kB) zur Orientierung markiert.

Die Amplifikation des ersten RNAi-repeats erfolgte mit den Oligonukleotiden Bie482 und Bie372 und resultierte in einem Amplifikat mit einer Länge von 1.323 bp. Die verwendeten Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass jeweils ein vollständige RNAi-repeat enthalten war. Der Nachweis des zweiten *HvMlo-RNAi-repeats* erfolgte durch die Amplifikation einer 1.056 bp langen Sequenz mit den Oligonukleotiden Bie371 und Bie400. (Abb. 25) Nach der

Ergebnisse

gelelektrophoretischen Auftrennung waren mit der Ausnahme des Stellvertreters von *GstAl_P::HvMlo*-RNAi E5/1 und E7/7 in allen Linien einheitlich das erste und zweite RNAi-repeat in der genomischen DNA der Pflanzen nachzuweisen. In *GstAl_P::HvMlo*-RNAi E5/1 und E7/7 konnte hingegen nur das zweite RNAi-repeat nachgewiesen werden.

3.2.6 Gel-Blot-Hybridisierung mit einer HPT-Sonde

Für eine umfassende Charakterisierung der putativ homozygoten T2-Linien von *GstAl_P::HvMlo*-RNAi E5-E7 wurde die Anzahl der integrierten Genkopien ermittelt. Dazu wurde stellvertretend je ein Individuum verwendet. Die Gel-Blot-Hybridisierung erfolgte mit einer HPT-Sonde gegen die genomische DNA der Pflanzen nach einer *Hind*III-Hydrolyse. Bei der Sonde handelt es sich um eine DIG-markierte Sonde, die auf einer PCR mit den Oligonukleotiden HYG-F und HYG-R basiert, welche ein 706 bp großes Fragment aus dem Transformationsvektor amplifiziert (s. 2.2.5). Das Ergebnis ist in Abbildung 26 dargestellt.

Die Analyse ergab für den Vertreter von *GstAl_P::HvMlo*-RNAi E5/1 eine Transgenkopie sowie für die beiden Nachkommen von *GstAl_P::HvMlo*-RNAi E6 je zwei Kopien. Für Pflanzen der Linie *GstAl_P::HvMlo*-RNAi E7 ergab sich ein differenzierteres Bild. Zwei der vier untersuchten Nachkommen (*GstAl_P::HvMlo*-RNAi E7/1 und E7/5) verfügten über eine Transgenkopie, *GstAl_P::HvMlo*-RNAi E7/6 über drei Kopien, und in *GstAl_P::HvMlo*-RNAi E7/7 ließ sich keine Kopie des Transgens nachweisen. Dabei zeigen die Integrationsmuster, dass es sich in den generierten Ausgangslinien um genetisch unabhängige Transformationsereignisse handelt.

Ergebnisse

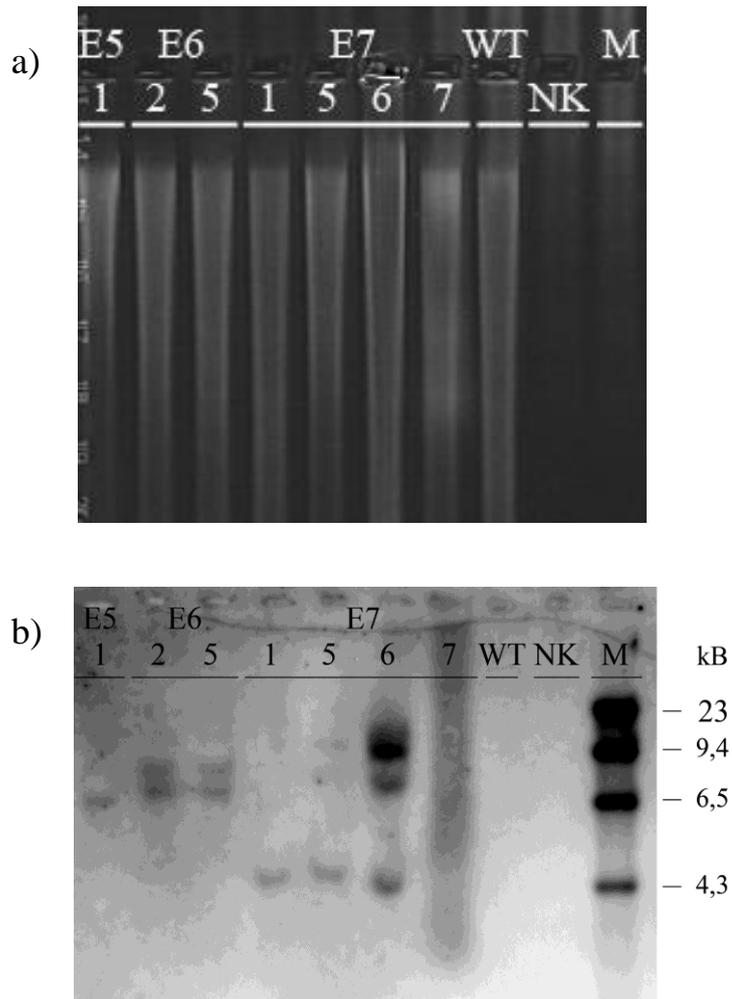


Abb. 26: Gel-Blot-Hybridisierungsexperiment putativ homozygoter *GstA1_P::HvMlo*-RNAi T2-Pflanzen mit einer Sonde gegen das Selektionsgen *HPT*. a) Abbildung der genomischen Weizen-DNA von T2-Pflanzen der Linien *GstA1_P::HvMlo*-RNAi E5-E7, die nach einer Hydrolyse mit *Hind*III und gelelektrophoretischer Trennung auf eine Nylonmembran übertragen wurde. b) Die Hybridisierung dieser Membran erfolgte mit einer *HPT*-Sonde. Als Kontrollen wurden in der Analyse der Wildtyp (WT) und H₂O (NK) mitgeführt. Bei dem mitgeführten Größenstandard sind die Banden in Kilobasenpaaren (kB) zur Orientierung angegeben.

In Kombination mit den durchgeführten Segregationsanalysen und der ermittelten Anzahl der integrierten Transgenkopien lässt sich eine bessere Aussage über den Zygotiegrad der Linien machen. Für die Linien, die über nicht mehr als zwei Transgenkopien verfügen, ist anzunehmen, dass es sich um putativ homozygote Linien handelt.

Ergebnisse

Bei je 60 T2-Individuen der Linien E5/1, E6/2, E6/5, E7/1 und E7/5 war keine Segregation hinsichtlich der Vererbung des *HPT*-Gens nachzuweisen. Wenn jedoch die untersuchten Linien nicht mehr als zwei Transgenkopien tragen, ist bei einer heterozygoten Elternpflanze von einer theoretischen Segregation von einer azygoten auf 15 transgene Pflanzen auszugehen. Bei dem vorliegenden Umfang von je 60 Individuen ist somit theoretisch mit bis zu vier Aussegregierenden (Azygoten) zu rechnen. Diese konnten in keiner der Linien, die zwei Transgenkopien tragen, nachgewiesen werden. Für die Linie E7/6, die über drei Transgenkopien verfügt, ist mit einem Segregationsverhältnis von einer azygoten auf 63 transgene Pflanzen zu rechnen. Somit ist bei dem Probenumfang der Segregationsanalyse von 60 Individuen keine verbindliche Aussage über den Zygotiegrad der Linie zu treffen.

Bei der Linie E7/7 schlug der Nachweis beider RNAi-*repeats* (s. 3.2.5) sowie die eindeutige Bestimmung der Anzahl der Transgenkopien fehl. Zudem wies die Linie als einzige in den Segregationsanalysen eine spaltende T2-Population auf. Sie wurde somit aus den weiterführenden Analysen ausgeschlossen.

Bei der Linie E5/1 handelt es sich um eine homozygote Linie, die allerdings über eine unvollständig integrierte RNAi-Kassette verfügt und deshalb als Kontroll-Linie mit in die nachfolgenden Analysen einbezogen wurde. Dies trifft auch auf die Linie E7/6 zu. Aufgrund des geringen Umfangs an zu untersuchenden Linien wurde sie trotz der Zweifel an der homozygoten Eigenschaft ebenfalls phänotypisiert.

3.2.7 Phänotypisierung der *GstA1_P::HvMlo*-RNAi Linien

Parallel zu den Analysen in der *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien wurde eine Blattsegmentbonitur an den ausgewählten T2-Familien der transgenen Linien *GstA1_P::HvMlo*-RNAi E5-E7 durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls anhand von drei biologischen Replikaten mit je 30 Individuen die nach künstlicher Inokulation

Ergebnisse

prozentual von *Bgt* befallene Fläche der Blattsegmente ermittelt und in Relation zum Wildtyp (100%) dargestellt (Abb. 27).

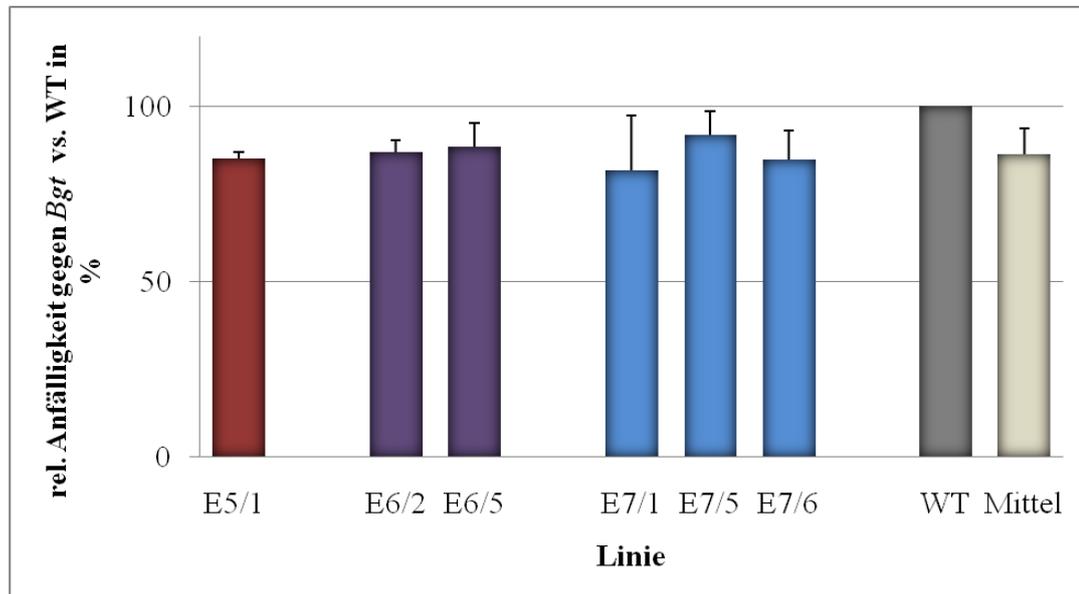


Abb. 27: Auswertung der Anfälligkeitsanalysen gegenüber Mehltau (*Bgt*) in den sechs ausgewählten T2-Familien der transgenen Linien *GstAl_P::HvMlo*-RNAi E5-E7. Als Merkmal der Resistenzausprägung diente die prozentuale Fläche der Blattsegmente, die nach künstlicher Infektion mit Mehltaukolonien bewachsen war (s. Versuchsaufbau 2.2.12). Der ermittelte Wert der befallenen Fläche der transgenen Linien wurde nachträglich als Prozentwert auf die mitgeführten WT-Pflanzen (als 100% definiert) bezogen. Die dargestellten Werte wurden aus drei biologischen Replikaten mit je 30 transgenen Pflanzen und 36 WT-Pflanzen erhoben. Die dargestellten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei biologischen Replikate.

In der Analyse wurden in drei biologischen Replikaten je 30 Individuen einer transgenen Linie mit 36 Wildtyp Pflanzen verglichen. Das Ergebnis zeigt bei allen ausgewählten T2-Pflanzen der *GstAl_P::HvMlo*-RNAi Linien über die Mittelwerte keine statistische Absicherung einer geringeren Anfälligkeit.

Der statistische Nachweis eines veränderten Phänotyps von homozygoten T2-Familien mit funktionellem *GstAl_P::HvMlo*-RNAi Konstrukt (E6/2, E6/5, E7/1 und E7/5) ist direkt aus den experimentellen Daten nicht ableitbar, obwohl auffallend ist, dass sämtliche Mittelwerte bei der Anfälligkeitsbewertung der transgenen Linien unterhalb des WT-Mittels liegen.

4 Diskussion

Die in der Arbeit vorgestellten Ergebnisse zu der Etablierung einer Mehltaresistenz durch die Suppression von endogenem *Mlo* durch RNAi in Weizen zeigen in zwei der drei untersuchten *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH Weizenlinien eine statistisch signifikante Ausprägung einer quantitativen Resistenz gegenüber Mehltau. In den homozygoten T2-Familien der drei *GstA1_P::HvMlo*-RNAi Linien konnte, trotz des Nachweises der transgenen Sequenz in der Familie, nur über den Mittelwert verringerte Anfälligkeitswerte in den transgenen Linien gegenüber dem WT in den Blattsegmentbonituren nachgewiesen werden. Diese waren aber statistisch nicht abzusichern. Im Folgenden sollen Aspekte und Faktoren eingehender vorgestellt und diskutiert werden, die einen möglichen Einfluss auf die vorliegenden Ergebnisse genommen haben.

4.1 Transformationsmethode und Transformationseffizienz

Ein wichtiger Faktor bei der Bewertung von Transformationsexperimenten ist die Bestimmung der Effizienz des Gentransfers. Bei den vorliegenden transgenen *GstA1_P::TaMlo*-RNAi Ausgangslinien war diese Information nicht mehr zu ermitteln. Vergleichender Literatur ist aber zu entnehmen, dass eine Transformationseffizienz des hier angewendeten biolistischen Gentransfers anhand unreifer Embryonen eine Spanne von 0,1 – 2 % aufweist (Altpeter *et al.* 1996). Beim Agrobakterien-vermittelten Gentransfer zur Herstellung der *GstA1_P::HvMlo*-RNAi Linien konnte eine Effizienz von 0,1 % (unabhängig transgene Linien pro 100 inokulierter Embryonen) ermittelt werden. Dieser Wert ist etwa um den Faktor zehn geringer, als bei der Weizentransformationen mit einem Überexpressionskonstrukt unter Verwendung des Agrobakterienstammes LBA4404/pSB1 (Hensel *et al.* 2009).

Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der im Vergleich weniger effiziente Agrobakterienstamm *AGL-1* verwendet. Bei 658 T0-Gerstenpflanzen, in die eines von 15 verschiedenen GATEWAY-RNAi-Konstrukten mit dem Stamm LBA in der AG Pflanzliche Reproduktion transformiert worden war, ergab die nachfolgende Analyse den Verlust der ersten (50, 7%), der zweiten (119, 18%) oder beider (138, 20%) RNAi-*repeats*, während die restliche T-DNA in den Pflanzen nachzuweisen war (G. Hensel, persönl. Mitteilung). Die bestehende Arbeitshypothese geht von der Annahme aus, dass es zu unerwünschten Rekombinationsereignissen durch den Agrobakterienstamm LBA mit dem GATEWAY kompatiblen Vektor kommt. Diese Annahme wird von der Tatsache gestützt, dass der Agrobakterienstamm LBA im Gegensatz zu dem Stamm *AGL-1* ein funktionsfähiges Rekombinasegen *recA* trägt (Lazo *et al.* 1991). Somit werden transgene Pflanzen erzeugt, die über eine T-DNA-Sequenz mit dem entsprechenden Selektionsmarker verfügen aber keine funktionelle RNAi-Kassette tragen. Im Hinblick auf den erheblichen Aufwand, den die Generierung von stabil transformierten Weizenpflanzen erfordert, wurde der Kompromiss eingegangen, eine geringere Transformationseffizienz in Kauf zu nehmen, dafür jedoch mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit Pflanzen mit funktionellen RNAi-Konstrukten zu erzeugen.

Speziell bei der Erzeugung von Pflanzen, die ein RNAi-Konstrukt exprimieren, ist aufgrund der hohen Variabilität des RNAi-Effektes nur in einem Teil der generierten transgenen Linien eine starke Abregulierung des Zielgens zu erwarten. Dies führt bei einer niedrigen Transformationseffizienz dazu, dass nur eine sehr geringe Anzahl an erzeugten Linien mit dem erwünschten Phänotyp identifiziert werden kann. Die Variabilität der Ausprägung in der Expression von Transgenen konnte in 132 unabhängig transgenen Linien von *Arabidopsis* gezeigt werden, die verschiedene Markergene exprimierten. Dabei wurde eine bis zu 100-fache Variation des Expressionsniveaus des Transgens nachgewiesen (Schubert *et al.* 2004). Auch bei der Expression von RNAi-Konstrukten ist diese Varianz zu beobachten, wie sich in der Modellpflanze *A. thaliana* zeigte (Wang *et al.* 2005).

Diskussion

Dort wurden 485 T0 Pflanzen unter Verwendung eines RNAi-Konstruktes gegen die PYHTOENE DESATURASE (PDS) unter Kontrolle eines 35S-*CaMV* Promotors generiert und untersucht. Die PDS codiert für ein wichtiges Enzym aus der Carotinoid-Biosynthese und dessen Inaktivierung resultiert in einem leicht zu bonitierenden chlorotischen Phänotyp (Cunningham and Gantt 1998). In *A. thaliana* wird die PDS von einem Gen codiert, welches über keine Homologe verfügt, die eine mögliche redundante Funktion haben können. Damit eignet sich die PDS sehr gut für die Klärung prinzipieller Aspekte bei der Erstellung von RNAi-Linien. Die Analyse der transgenen Pflanzen zeigte eine sehr starke Streuung bezüglich der Ausprägung des Phänotyps, die sich vom WT-Niveau bis zu vollständig ausgebleichten, lebensunfähigen Pflanzen spannt. In weiteren Analysen konnte keine Korrelation des Phänotyps mit der Anzahl der integrierten Genkopien nachgewiesen werden. Allerdings korrelierte die Ausprägung des Phänotyps mit einem verminderten Expressionsniveau der endogenen PDS. Zudem ließ sich ein Nachlassen des Effektes mit zunehmender Generationenzahl beobachten.

Diese Ergebnisse konnten teilweise auch in Weizen bestätigt werden (Travella *et al.* 2006). Hier wurde ebenfalls die PDS durch ein RNAi-Konstrukt an der Expression gehindert und die Autoren der Studie stellten eine ähnliche Streuung in der Ausprägung des Phänotyps in den 64 erzeugten Pflanzen der T0 Generation fest. Die T1-Individuen dieser Linien zeigten ebenso eine negative Korrelation zwischen der Expression des Konstrukts und der Ausprägung des Phänotyps. Zudem konnte in der Studie die Vererbung des erzeugten Phänotyps bis in die T2-Generation nachgewiesen werden. Eine stärkere Ausprägung des Phänotyps wurde darüber hinaus bei homozygoten Transgenen gezeigt, die im Vergleich zu hemizygoten Pflanzen eine erhöhte Nachweisbarkeit von siRNAs aufwiesen, wodurch auf einen Gendosiseffekt geschlossen werden kann (Travella *et al.* 2006).

Diskussion

Weiterhin ließ sich bei *A. thaliana* belegen, dass sich, neben der durch die Anzahl der Transgenkopien und deren Zygotie bedingte Transgendosis, insbesondere epigenetische Effekte auf die Transgenexpression auswirken. Positionseffekte spielen dabei eine eher untergeordnete Rolle (Schubert *et al.* 2004). Da diese sehr komplexen und im Einzelfall nicht zu kontrollierenden Faktoren eine wesentliche Ursache bei der Ausprägung des transgenen Merkmals haben, vermindert die geringe Anzahl der vorliegenden Primärtransgenen deutlich die Chance, Linien zu identifizieren, die über eine signifikante Ausprägung des Merkmals verfügen.

Auch wenn die technologisch anspruchsvolle Erstellung von stabil transgenen Pflanzen die Anzahl der zu analysierenden Linien limitiert, ergeben sich speziell bei dem in dieser Studie verfolgten Ansatz zur Etablierung und Analyse einer Resistenz von Weizen gegenüber Mehltau eine Reihe von Möglichkeiten, die bei transienten Analysen nicht durchführbar gewesen wären. Die wesentlichen Vorzüge von stabil transgenen Linien bestehen in der zeitlichen Entkopplung von Gentransfer und Phänotypisierung, der Möglichkeit der Erstellung von praktisch unbegrenzten vermehrbaren, homozygot transgenen DH-Linien als auch der praxisrelevanten Gendosis.

Obwohl Ansätze für die transiente Überexpression (TOX; „transient over-expression“) und die transiente Gensuppression (TIGS, „transient induced gene silencing“), bei denen durch biolistischen Gentransfer einzelne Zellen zeitweilig transformiert werden, speziell bei der Hochdurchsatz-Analyse von Genfunktionen und Promotoraktivitäten Anwendung finden, haben sie auch methodische Limitationen. Gerade der Umstand der Einzelzelltransformation ist bei der Analyse der einheitlichen Resistenzausprägung eines gesamten Blattsegmentes problematisch. Einerseits würde ein Großteil der untersuchten epidermalen Gewebezellen nicht über die transgene Sequenz verfügen und andererseits müsste jede einzelne Zelle als eigenes Transformationsereignis angesehen werden. Hinzu kommt ein erheblicher abiotischer Stress bei und unmittelbar nach der

Diskussion

biolistischen Transformation und auch die temporär sehr stark erhöhte Genexpression kann zu falschen Schlüssen bezüglich der Ausprägung der Anfälligkeit führen. Daneben ist die Gewinnung von ausreichendem (homogenem) Epidermisgewebe für nachfolgende molekularbiologische Analysen schwierig (Hensel *et al.* 2011). Alle diese limitierenden Faktoren des transienten biolistischen Ansatzes konnten in den vorliegenden Analysen durch die Verwendung von stabil transformierten Pflanzen vermieden werden.

Bei den dargestellten Vorteilen ist jedoch zu beachten, dass speziell der Gentransfer durch Agrobakterien stark von dem verwendeten Genotyp der Wirtspflanze abhängig ist. Hier fiel die Wahl aus mehreren Gründen auf die Weizenlinie Bobwhite. Bei diesem Genotyp handelt es sich um eine Art Modell für den Gentransfer in Weizen, der sich in erster Linie durch seine guten Regenerationseigenschaften in der *in vitro* Kultur auszeichnet. Darüber hinaus ist Bobwhite vergleichsweise anfällig gegen Pathogene wie Mehltau, was die Evaluierung der Resistenz erleichtert.

4.2 Methode der Resistenzbewertung

Ein zentraler Aspekt bei der Analyse der *GstA1_P::Mlo*-RNAi Linien galt der quantitativen Evaluierung der Ausprägung der Resistenz. Die Bonitur der untersuchten Nachkommenschaften erfolgte durch die Analyse der makroskopisch erfassbaren Mehltau-Kolonien auf Blattsegmenten nach siebentägiger Inkubation (s. 2.2.12).

Das Verfahren der Blattsegmentbonitur wurde bereits für die Evaluierung von Mehltau-Weizen-Interaktionen verwendet (Bieri *et al.* 2003), dennoch sind einige Aspekte kritisch zu hinterfragen. So sind Einflüsse auf die erhaltenen Resistenzeigenschaften in verschiedenen Testsystemen zum Teil von dem verwendeten Genotyp der Pflanzen, dem Alter der bonitierten Blätter und der Stärke des eingesetzten Inokulums beschrieben worden.

Diskussion

Der Einfluss des verwendeten Genotyps konnte bei der Überexpression von CHITINASE in Bobwhite gezeigt und dabei eine um 10% erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem WT ermittelt werden (Bliffeld *et al.* 1999). Im Vergleich hierzu wurde bei Pflanzen des Kultivars Florida, anhand eines prinzipiell gleichen Testsystems eine auf 60% reduzierte Anfälligkeit nachgewiesen (Oldach *et al.* 2001). Dies zeigt einen erheblichen Genotyp-spezifischen Einfluss auf die nachgewiesene Ausprägung der Anfälligkeit. Die Abhängigkeit vom verwendeten Genotyp zeigt sich zudem darin, dass das Abschneiden von Blattsegmenten in einer Reihe von Kultivaren spontan zu Chlorosen und Nekrosen führt, die eine aussagekräftige Bonitur nicht zulassen. In wie weit allerdings in dem getesteten System der abiotische Stress der Präparation der Blattsegmente als auch deren Inkubation einen Einfluss auf die ermittelte Ausprägung der Anfälligkeit haben, wurde experimentell nicht näher untersucht.

Auch das Alter der verwendeten Blätter beeinflusst die Ausprägung der Resistenz. In Linien, in denen BARNASE ektopisch exprimiert wurde, ließ sich in Fahnenblättern eine Anfälligkeit von 65% gegenüber der Anfälligkeit von Primärblättern ermitteln (Bieri *et al.* 2003). Eine ähnliche Abhängigkeit soll in der *mlo*-vermittelten Penetrationsresistenz in Gerste jedoch nicht bestehen (Büschges *et al.* 1997), obwohl die Ausprägung der pleiotropen Papillenbildung in Abhängigkeit des Alters zunimmt (Wolter *et al.* 1993). Aufgrund des zeitlichen Aufwandes und der benötigten Gewächshausfläche war die Anzucht einer hinreichenden Anzahl von Individuen für eine Analyse von Fahnenblättern im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Die verwendete Dosis des Inokulums stellte einen weiteren einflussreichen Aspekt bei den experimentellen Arbeiten dar. In Weizenpflanzen, die das AFP-Protein aus *Aspergillus giganteus* sowie CHITINASE II überexprimieren, wurde gegenüber dem biotrophen Pathogen Weizenbraunrost (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) eine Abhängigkeit der Resistenz zu der Konzentration des Inokulums nachgewiesen.

Diskussion

Resistenzen, die bei moderaten Inokulumkonzentrationen von 80-100 Sporen pro mm^2 nachweisbar waren, konnten bei einem höher dosiertem Inokulum von 300 Sporen pro mm^2 nicht bestätigt werden (Oldach *et al.* 2001). Inwieweit diese Beobachtungen die Infektionsbiologie der Weizenmehltau-Weizen Interaktion beeinflussen, wurde nicht weiter untersucht. Allerdings wurde sich in der vorliegenden Studie bei der Auswahl der Konzentration des Inokulums an dem Wert orientiert, der seit vielen Jahren in TIGS Analysen in der AG Transkriptomanalyse für Mehltau-Infektionsversuche in Gerste und Weizen verwendet wird.

Im Kontext der Beurteilung der vorliegenden Bewertungen der Anfälligkeit ist des Weiteren festzuhalten, dass ein artifizieller Test, wie z.B. die Blattsegmentbonitur, nur bedingt die komplexen Bedingungen und deren Dynamik beim Weizenanbau im Feld widerspiegeln kann.

Neben den vorgestellten Parametern, die das System beeinflussen, ist auch eine Reihe von Vorzügen mit einem artifiziellen Boniturverfahren verbunden. Zu den Vorteilen zählt die Möglichkeit eines hohen Durchsatzes sowohl unabhängiger Linien als auch Individuen. Die bildgestützte Dokumentation erlaubt nachträglich eine objektive und überprüfbare Auswertung des Infektionszustandes der untersuchten Linien. Gerade die Masse ist für die manuelle Beurteilung der Infektionszustände durch einen Experimentator eine Quelle für starke Varianz. Zudem gestattet der beträchtliche Probenumfang einen statistisch signifikanten Nachweis auch weniger stark ausgeprägter Phänotypen. Darüber hinaus ist die hohe methodische Kontrolle über den Entwicklungsstand der Pflanzen und über die biotischen und abiotischen Einflüsse auf das Material vorteilhaft für die Vergleichbarkeit seriell durchgeführter Versuche untereinander.

4.3 Molekularbiologische Analysen der *GstAl_P::Mlo*-RNAi vermittelten Resistenz in Weizen

Neben der Bestimmung der quantitativen Ausprägung der Anfälligkeit der untersuchten *GstAl_P::Mlo*-RNAi (DH-) Linien wurde eine weiterführende molekularbiologische Charakterisierung durchgeführt. Ein grundlegender Aspekt dafür ist der Nachweis der stabilen Integration des Transgens in dem Genom der Pflanze. Im Folgenden soll auf die technische Umsetzung, und auf die daraus zu ziehenden Schlüsse näher eingegangen werden.

4.3.1 *GstAl_P::TaMlo*-RNAi DH-Linien

Der erste Nachweis der transgenen Sequenz erfolgte anhand der Amplifikation des *Mla*-Introns in den *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Regeneraten nach der embryogenen Pollenkultur (s. 3.1.1). Bei der Analyse der Nachkommenschaft der Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 2 konnten dabei drei azygote DH-Regenerate identifiziert werden. Das erlaubt den Rückschluss, dass sich die nachgewiesenen Transgenkopien in der Elternpflanze wahrscheinlich in einer geringen Anzahl an chromosomalen Insertionsloci befunden haben. Dies wurde aber in der vorliegenden Arbeit nicht experimentell überprüft.

In einem weiteren Schritt wurden die DH-Nachkommenschaften der einzelnen Regenerate in der Phänotypisierungsanalyse identifiziert, die über das Mittel der drei biologisch durchgeführten Analysen die geringsten Anfälligkeitswerte gegen Mehltau in Relation zum Wildtyp zeigten.

Um noch einmal zu überprüfen, ob die ausgewählten DH-Linien keine Segregation des transgenen Merkmals aufweisen, wurden 20 zufällig ausgewählte Individuen einer jeden DH-Linie kontrolliert, mit dem Ergebnis, dass die *Mla*-Intronsequenz erwartungsgemäß einheitlich in allen Individuen der Linien *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 1-3 vorhanden war (s. 3.1.5.1). Der ausbleibende Nachweis des *Mla*-Introns für die azygote Linie ist ein eindeutiger Hinweis, dass es sich um eine Linie handelt, welche die transgene Sequenz verloren hat.

Diskussion

Zudem wurde das Vorhandensein der beiden invers orientierten Zielgenfragmente (RNAi-*repeats*) in den ausgewählten Linien *GstAl_P:TaMlo*-RNAi-DH 1-3 auf genomischer Ebene erbracht (s. 3.1.5.2). Die Amplifikation der einzelnen RNAi-*repeats* als Nachweis des RNAi-Konstrukts erfolgte für die beiden Elemente separat in einer PCR. Dabei wäre eine vollständige Amplifikation der gesamten RNAi-Expressionskassette dem ermittelten Ergebnis vorzuziehen gewesen, ließ sich jedoch technisch nicht umsetzen. Möglicherweise erklärt sich dies aus dem komplementären Charakter des RNAi-*repeats*. Der Nachweis der beiden RNAi-*repeats* belegt, dass die einzelnen Sequenzen in dem Genom der Pflanzen vorhanden sind, er erlaubt aber keine Aussage über die Integration einer individuellen vollständigen RNAi-Kassette. Wie bereits bei dem Nachweis des *Mla*-Introns ist die hohe Anzahl der integrierten Transgenkopien in den Linien *GstAl_P:TaMlo*-RNAi-DH 1 und 3 auch in diesem Kontext ein Problem, da sich nicht klären lässt, ob die Amplifikationen der einzelnen RNAi-*repeats* aus verschiedenen Kopien des RNAi-Konstrukts erfolgten. Für die Linie *GstAl_P:TaMlo*-RNAi-DH 2 ist der Nachweis beider RNAi-*repeats* ebenfalls erfolgreich gewesen.

Die Hybridisierungsexperimente erfolgten bei den *GstAl_P:TaMlo*-RNAi-DH Linien mit einer Hybridisierungssonde gegen das *Mla*-Intron. Gerade hinsichtlich der bei Weizen technisch anspruchsvollen Durchführung eines Gel-Blot Experimentes erfolgte die Auswahl der Sonde mit einer Sequenz, die eine Kreuzhybridisierung mit endogenen Sequenzen ausschließt. Darauf ist besonders zu achten, denn durch die amphitriploide Genomorganisation des Weizens können im Falle einer Kreuzhybridisierung gleich drei (oder eine Vielfaches von drei) Sequenzen involviert sein.

Trotz der Vermeidung von Kreuzhybridisierungen zeigten die Gel-Blot Analysen der Linien *GstAl_P:TaMlo*-RNA-DH 1 und 3 ein sehr komplexes Integrationsmuster. Die Anzahl der Hybridisierungsereignisse ist durch die

Diskussion

limitierte Auflösung der Blots nicht eindeutig zu beziffern. Außerdem wurden einige Hybridisierungsereignisse detektiert, die geringere Fragmentgrößen als die der Positivkontrolle aufwiesen. Bei diesen Hybridisierungsereignissen ist davon auszugehen, dass es sich um keine vollständigen Transgenkopien handelt. Die Häufigkeit von Rekombinationen der transgenen Sequenz ist ein bekannter Nebeneffekt des biolistischen Gentransfers. Neben den beiden Linien *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH 1 und 3, die über eine hohe Anzahl an Transgenkopien verfügen, ist in dem Hybridisierungsexperiment der Linie *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH 2 ein starkes Hybridisierungsereignis mit einem Fragment nachgewiesen worden, welches eine deutlich geringere Größe als der Transformationsvektor aufwies. Auch sind schwache Hybridisierungsereignisse in der Linie nachzuweisen, die über eine größere Fragmentlänge als die Positivkontrolle verfügen. Eine Erklärung für das starke Hybridisierungssignal der kleineren Sequenz ist anhand des Experiments nicht eindeutig begründbar. Es könnte sich jedoch um einen repetitiven Abschnitt handeln, der auf einem Rekombinationsprozess beruht und mehrere zur Sonde komplementäre Sequenzabschnitte umfasst.

Die besonders starken Hybridisierungssignale an den kurzen Sequenzen wären auch eine mögliche Erklärung für die vergleichsweise schwache Ausprägung der Signalstärke der längeren Fragmente. Da die Hybridisierungsreaktion mit einer limitierten Anzahl an markierten Sonden durchgeführt wurde, ist es denkbar, dass die komplementären genomischen Sequenzen gegenseitig um die Sonden konkurrieren. Kommt es nun zu einer Exposition einer relativ hohen Anzahl an komplementären Sequenzen zu der verwendeten Sonde in dem kürzeren Fragment, führt dies zu einer geringeren Verfügbarkeit von Sonden an weiteren komplementären Sequenzbereichen. Dies kann sich direkt in einer möglicherweise unterrepräsentierten Signalstärke der längeren Fragmente niederschlagen.

Diskussion

Jedoch ist der Nachweis aller Elemente der RNAi-Expressionskassette wie dem *Mla*-Intron und den beiden *Mlo*-RNAi-*repeats* bereits anhand von PCR-Amplifikationen nachgewiesen worden, was auf die Anwesenheit einer vollständigen RNAi-Kassette schließen lässt. Um diese Annahme zu stützen, wurden semi-quantitative Expressionsanalysen des Transgens in den *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien durchgeführt, die den Nachweis der vollständigen Integration des Transgens in der Linie *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH 2 (und den weiteren ausgewählten *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien) bestätigen sollten.

Die semi-quantitativen Expressionsanalysen erfolgten durch die separate Amplifikation der beiden *Mlo*-RNAi-*repeats* der *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-Kassette in einer PCR aus cDNA, die anhand von *PolyA*-Oligonukleotiden aus Epidermisgewebe von 50 Individuen der verwendeten Linie erstellt wurden (s. 3.1.5.4). Die vormals auftretende Problematik auf genomischer Ebene, eine Zuordnung der amplifizierten Sequenzen zu vollständigen RNAi-Konstrukten vornehmen zu können, ist bei der Verwendung von cDNA als Vorlage (*template*) nicht völlig auszuschließen, allerdings eher gering einzuschätzen. Es werden in Zellen nur Transgenkopien transkribiert, die über einen funktionellen Promotor und Terminator verfügen und nachfolgend posttranskriptionellen Modifikationen wie der Polyadenylierung unterworfen werden. Somit entfallen alle Transgenkopien, die durch Rekombinationsprozesse in ihrer Struktur grundlegend verändert wurden. Darüber hinaus wurde in dem Experiment indirekt der Nachweis des Konstrukts über die Amplifikation des *Mla*-Introns erbracht. Somit besteht eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit der Expression von funktionellen *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-Konstrukten in den ausgewählten Linien *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH 1-3.

Parallel zu dem Nachweis der Expression der *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-Kassette sollte ebenfalls die Suppression des endogenen *Mlo*-Transkriptes analysiert

Diskussion

werden. Dies erfolgte durch die Amplifikation durch eine PCR ausgehend von einer cDNA. Die dabei gewonnenen Daten belegen eine Reduktion der endogenen *Mlo*-Transkriptabundanz der Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 3. Für die Linien *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 1 und 2 ist dies jedoch nicht nachzuweisen. Auffällig war zudem, dass auch die Transkriptabundanz des RNAi-Konstrukts, welches indirekt über das *Mla*-Intron nachgewiesen wurde, geringer als bei den *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH-Linien 1 und 2 war. Anhand der mitgeführten Ladekontrolle in Form des ubiquitär exprimierten Haushaltsgens *GAPDH*, ist eine unterschiedliche Ausgangskonzentration als Ursache für dieses Phänomen auszuschließen. Eine mögliche Erklärung wäre eine sehr effiziente Suppression des Konstrukts, die selbst das RNAi-Transkript nach der Transkription abbaut. Dabei bleibt anzumerken, dass die in der Analyse nachgewiesene Reduktion des endogenen *Mlo* in der Linie *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 3 bei den Phänotypisierungsanalysen mit der geringsten Anfälligkeit korreliert. Da sich diese Ergebnisse aufgrund methodischer Limitationen nicht in RNA-Gel-Blot-Experimenten bestätigen ließen, bleibt diese Korrelation in den vorliegenden Linien unbestätigt.

Bei der durchgeführten Untersuchung sollte zudem die gewebespezifische Expression des Konstrukts überprüft werden. Die Nachweise der Expression des *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-Konstruktes wurden nicht nur in cDNA aus epidermalem Gewebe durchgeführt, sondern auch mit cDNA aus Geweben des restlichen Blattes. Diese als Restblattprobe bezeichneten Proben umfassten neben dem Mesophyll des Blattes auch die adaxiale Epidermis und ließen somit einen Nachweis der exprimierten Sequenz erwarten. In den durchgeführten Analysen konnte aber kein Unterschied in den beiden Probengruppen festgestellt werden. Als Ursachen sind dabei artifizielle Faktoren wie das Umschreiben der mRNA in cDNA und die nachfolgende Amplifikation in einer PCR zu nennen. Gerade der Umstand, dass die Amplifikation der Ausgangssequenz über 40 Zyklen erfolgte, könnte die Quantität des Produktes in der Plateauphase in der PCR gebracht haben

Diskussion

und somit anfängliche Unterschiede in den Transkriptabundanz verdecken. Neben diesem technischen Aspekt ist noch die allgemein höhere Expression von *Mlo* in der Epidermis gegenüber dem Mesophyll zu beachten. Da der hohe Gewebeanteil an Mesophyll in der Restblattprobe einen Verdünnungseffekt erzeugt, erklärt sich die niedrigere *Mlo*-Transkriptabundanz gegenüber der reinen Epidermisprobe.

Dieselben Proben wurden zusätzlich in einem quantitativen *real-time* RT-PCR Experiment analysiert. Dabei ergab sich sowohl für die Epidermis- als auch für die Restblattproben eine signifikante Reduktion der Transkriptabundanz des endogenen *Mlo*, die sich in einem um die Hälfte reduzierten Expressionsniveau der ausgewählten Linien äußert.

Die Messung erfolgte dabei als relative Quantifizierung im Vergleich zur azygoten Linie, da in Vorversuchen eine erhebliche Varianz in den gemessenen Transkriptabundanz des endogenen *Mlo* beim Wildtyp nachgewiesen wurde. Die anhand der Messung ermittelte Reduktion der Transkriptabundanz in den transgenen Linien *GstAl_p::TaMlo*-RNAi DH 1-3 erwies sich als grundsätzlich partiell.

Die Ursache für diese unvollständige Abregulation ist nicht eindeutig zu benennen. Eine nahe liegende Erklärung besteht in der bereits vorgestellten Korrelation zwischen der Anzahl der Transgenkopien und des Grades der Gensuppression. Für die vorliegende Arbeit ist eine solche Korrelation anhand der geringen Anzahl an Primärtransgenen nicht belegbar. Allerdings zeigen die Linien *GstAl_p::TaMlo*-RNAi-DH 1 und 3 eine stärkere Ausprägung des Phänotyps bei einer höheren Anzahl an nachgewiesenen Transgenkopien bei den Hybridisierungsexperimenten (s.3.1.5.3). Alternativ wäre auch eine Ausbreitung der Gensuppression durch den vom RNAi Mechanismus bekannten Kurzstreckentransport vorstellbar oder die nicht vollständige Gewebespezifität des

Diskussion

Promotors, die zu einer gewissen Expression im Mesophyll Gewebe geführt haben könnte.

Des Weiteren ist bei der Verwendung eines RNAi-Konstruktes grundsätzlich die Auswahl einer geeigneten RNAi-Sequenz zu beachten. Das Ziel dieser Arbeit war die Suppression der endogenen *Mlo*-Expression in der Epidermis der Wirtspflanze. Bei der Bewertung der Auswahl der verwendeten *TaMlo*-RNAi Sequenz muss aber der Kenntnisstand während des Zeitpunktes der Erstellung des Konstrukts berücksichtigt werden.

Für Weizen waren bis dahin nur *TaMlo-1* und dessen Homöologe identifiziert (Elliott *et al.* 2002). Die in den letzten Jahren fortschreitende Sequenzierung des Weizengenoms und die Analyse von *Mlo* in Modellpflanzen wie *A. thaliana* (*AtMlo*) und Reis (*OsMlo*) haben gezeigt, dass selbst diploide Spezies über eine Vielzahl an *Mlo*-Homologen verfügen. Die Anzahl von *Mlo*-Homologen für *A. thaliana* beläuft sich zum derzeitigen Kenntnisstand auf 15 (Chen *et al.* 2006) und für Reis auf zwölf Mitglieder (Liu and Zhu 2008) der *Mlo*-Familie. Bei Weizen sind bei *in silico* Analysen sechs weitere Homologe identifiziert worden, welche die charakteristische siebenfache Transmembrandomäne aufweisen (Konishi *et al.* 2010). Die Autoren der Studie ergänzen, dass vermutlich einige Mitglieder der *Mlo*-Familie aus Weizen noch nicht identifiziert sind, insbesondere wenn man sich die hohe Anzahl von *Mlo*-Familienmitgliedern aus diploiden Pflanzen wie *A. thaliana* im Vergleich betrachtet, die über ein weitaus kleineres Genom verfügen.

Bei dem Abgleich der sechs neu identifizierten Mitglieder der *Mlo*-Familie aus Weizen mit dem bereits von Elliot *et al.* (Elliott *et al.* 2002) isolierten *TaMlo-1* zeigt sich eine sehr geringe Übereinstimmung auf AS-Niveau, die nur eine Sequenzidentität von maximal 40,5% aufweist (Konishi *et al.* 2010). Zudem gibt es starke Unterschiede bei der Expressionsstärke in Spross- und Wurzelgewebe und auch eine unterschiedliche Regulierung als Reaktion auf Trocken- oder Salzstress (Konishi *et al.* 2010). Diese Ergebnisse sind ähnlich denen, die in

Diskussion

ausführlicherem Maße für *A. thaliana* vorliegen. Für jedes der 15 *AtMlo*-Homologe konnte in Promotorstudien ein unterschiedliches Expressionsmuster in histochemischen Expressionsanalysen anhand des Reportergens β -GLUCORONIDASE nachgewiesen werden. Außerdem wurden sehr unterschiedliche Reaktionen bei der Expressionsrate für eine Vielzahl von Stressfaktoren wie bakterielle und pilzliche Pathogene, abiotische Stressfaktoren wie Hitze, Kälte, osmotischer Stress, Salz und Verwundungen (Chen *et al.* 2006) gemessen.

Daneben wurden die identifizierten *AtMlo*-Mitglieder in vier verschiedene phylogenetische Gruppen eingeordnet, die als *clades* bezeichnet werden. Die Autoren dieser Studie gehen dabei von einer funktionellen Verwandtschaft der Homologe in einem *clade* aus, die sich durch eine hohe Sequenzidentität mit identischer Gewebespezifität und durch analoge Reaktionen auf die verschiedenen biotischen und abiotischen Stimuli auszeichnen. Die *clades* hingegen zeigen teilweise funktionelle Redundanz, jedoch auch Co-Funktion oder sogar einen antagonistischen Charakter zueinander.

Gerade hinsichtlich der Bandbreite der *Mlo*-Familie aus Weizen und dem Vorhaben, eine Suppression der *Mlo*-Expression in der Epidermis zu erreichen, ist die verwendete RNAi-Sequenz und die Spezifität gegenüber den endogenen Zielsequenzen zu betrachten. Hierbei ist besonders das Auftreten von mindestens 21 bp langen kontinuierlichen Sequenzhomologien zwischen der RNAi- und der Zielsequenz zu berücksichtigen, welche für die Bildung der siRNAs essentiell ist. Da die Sequenzen des *GstA1_P::TaMlo*-RNAi Konstruktes aus einer 304 bp langen Sequenz aus der codierenden Sequenz von *TaMlo-1* entnommen wurde, ist eine vollständige Sequenzhomologie zu diesem Homolog gegeben. Die erst kürzlich erfolgte Publikation der weiteren sechs Mitgliedern der *Mlo*-Familie aus Weizen konnte seiner Zeit für die Erstellung des Konstruktes nicht berücksichtigt werden und eine Abregulation dieser Homologe ist mit der verwendeten RNAi-Kassette

Diskussion

nicht gewährleistet. Eine Begründung liegt in der hohen Sequenzdiversität, die in den sechs Weizen-Homologe in keiner der Sequenzen eine durchgehende Übereinstimmung über 21bp aufweist.

Somit ist die Abregulation der Genexpression in den untersuchten *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien erwartungsgemäß nur für *TaMlo-1* Homöologe gewährleistet, und auch eine transitive Suppression von weiteren Homologen ist eher unwahrscheinlich, wie Versuche aus Reis zeigen (Miki *et al.* 2005).

Bei der Evaluierung der Ausprägung der Mehltausresistenz stellt sich generell die Frage, in wie weit die kürzlich identifizierten *Mlo*-Homologe einen Einfluss auf die Mehltausresistenz haben. Wenn man die phylogenetische Verwandtschaft der *Mlo*-Homologe näher betrachtet, die bei Gerste (*HvMlo*) (Büschges *et al.* 1997) oder *A. thaliana* (*AtMlo 2/6/12*) (Consonni *et al.* 2006) durch Mutation eine Penetrationsresistenz gegen den korrespondierenden Mehltau erzeugen, fällt auf, dass die drei *AtMlo*-Homologe und *HvMlo* alle in demselben *clade* wie *TaMlo-1* liegen (Konishi *et al.* 2010). Möglicherweise reicht auch bei Weizen die Suppression der *TaMlo-1* Homöologe aus, um eine Resistenz zu erzeugen, die in dem vorliegenden Fall nur aufgrund eines zu niedrigen Gendosiseffektes keine stärkere Ausprägung zeigt. Alternativ ist auch denkbar, dass eine Suppression von mehreren Homologen zu einer Resistenzbildung nötig ist, wie dies in *A. thaliana* der Fall ist. Allerdings ist dabei zu bedenken, dass die unterschiedlichen Mitglieder der *Mlo* Familie sich auch hinsichtlich der Funktion unterscheiden und weitere bisher unbekannte Effekte auftreten können. Es konnte etwa gezeigt werden, dass für die korrekte Führung des Pollenschlauches zu den Syngagen in den weiblichen Gametophyten von *A. thaliana* sowohl das *Mlo*-Mitglied NORTIA (NTA) als auch FERONIA (FER), eine Rezeptor-ähnliche Kinase, notwendig sind (Kessler *et al.* 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass homozygote *fer* Mutanten, die unfertile Eizellen hervorbringen, eine Mehltausresistenz aufweisen (Kessler *et al.* 2010). Dies zeigt die sehr diverse Funktion der Mitglieder der *Mlo*-

Diskussion

Familie und eine Verbindung zwischen Mehltau- und Pollenschlauch-Penetration in Pflanzen, was für ein gezieltes Ausschalten einzelner *Mlo*-Mitglieder spricht, um keine weiteren pleiotropen Nebeneffekte zu erzeugen. In wie weit diese Problematik auch auf die Situation in Weizen übertragbar ist, ist dabei nur schwer abzuschätzen. Allerdings sollte ein experimenteller Ansatz zur Suppression einzelner *Mlo*-Mitglieder durch die hohe Sequenzdivergenz der *TaMlo*-Homologe in Weizen technisch umsetzbar sein.

Ein zusätzlicher Aspekt für die Etablierung einer Resistenz durch die Abregulation von endogenem *Mlo* ist die Membranlokalisierung und die Stabilität des MLO-Proteins in der Membran. Die Membranlokalisierung könnte dabei problematisch sein, da die mRNA eines Proteins, welches sekretiert werden soll, direkt nach dem Ausschleusen aus dem Kern mit den Ribosomen an das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) andockt und das gebildete Protein in das Lumen des ER abgegeben wird. Hier stellt sich die Frage, ob die aktivierten RISC-Komplexe die Erkennung eines für die Sekretion vorbestimmten Transkriptes ebenso gut leisten, wie dies bei einem cytoplasmatisch lokalisierten Transkript der Fall ist. Es konnte jedoch durch die RNAi-vermittelte Herabregulation der hochmolekularen Glutenin-Untereinheit (*high molecular weight glutenin subunit*) 1Dx5 in Bobwhite gezeigt werden, dass dies grundsätzlich geleistet werden kann (Chen *et al.* 2008). Ob dies gleichermaßen auf das Transkript von *Mlo* zutrifft, wurde in der Arbeit nicht untersucht.

Die Frage, wie lange ein MLO-Molekül funktionell aktiv in der Zellmembran verbleibt, bis es ersetzt wird, kann sich zudem auf die Ausprägung der Resistenz auswirken. Hinsichtlich der nur auf etwa 50% reduzierten Transkriptabundanz von endogenem *Mlo* in den Linien ist es sehr wahrscheinlich, dass immer noch *Mlo*-Transkripte in den Zellen translatiert werden und somit eine ausreichende Anzahl an funktionellen MLO-Molekülen in der Membran verbleibt, die einer vollständigen Etablierung einer Resistenz gegen Mehltau entgegenwirken.

4.3.2 *GstA1_P::HvMlo*-RNAi Linien

Obwohl eine phänotypisch ausgeprägte Mehлтаuresistenz anhand der ausgewählten T2-Familien der *GstA1_P::HvMlo*-RNAi Linien nicht mit statistischer Relevanz nachgewiesen werden konnte, sollen im Folgenden die Auswahl der gewählten Nachkommenschaften und die möglichen molekularbiologischen Ursachen eingehender diskutiert werden, die auf das Ergebnis Einfluss genommen haben können.

Nach der Erstellung der transgenen Weizenpflanzen und der Überführung in die T2-Generation durch Selbstung erfolgte die Identifizierung der putativ homozygoten T2-Familien aus den *GstA1_P::HvMlo*-RNAi Linien durch den Nachweis des Selektionsmarkergens *HYGROMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE* mittels Inkubation von Blattsegmenten in einem Hygromycin-haltigem Medium. Für die ausgewählten T2-Familien, in denen das mit der *GstA1_P::HvMlo*-RNAi Sequenz cosegregierende *HPT*-Markergen einheitlich nachweisbar war, wurde angenommen, dass sie ebenfalls hinsichtlich des *GstA1_P::HvMlo*-RNAi Merkmals homozygot sind. Diese Ergebnisse beruhen jedoch auf einer relativ geringen Anzahl an untersuchten Individuen für eine Segregationsanalyse. Eine weiterführende Untersuchung durch eine Rückkreuzung mit WT-Pflanzen wurde nicht durchgeführt, würde jedoch einen weiteren Hinweis auf den Zygotiegrad und die Anzahl der Integrationsloci im Genom geben.

Die molekularbiologische Charakterisierung erfolgte exemplarisch durch den Nachweis der einzelnen RNAi-*repeats* und mit der Durchführung eines Gel-Blot Experimentes unter Verwendung einer *HPT*-Sonde anhand zufällig ausgewählter Individuen einer jeden T2-Familie. Wie bereits für die *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien diskutiert, stellt sich bei dem Nachweis erneut die Problematik, eine eindeutige Zuordnung von einzelnen PCR-Amplifikationsprodukten zu vollständigen RNAi-Expressionskassetten nachzuvollziehen. Hier ist aufgrund der geringeren Anzahl der integrierten Transgenkopien die Wahrscheinlichkeit

Diskussion

niedriger einzuschätzen, dass es sich bei einem positiven Nachweis beider RNAi-*repeats* um Amplifikationsprodukte aus unterschiedlichen Transgenkopien handelt. Des Weiteren konnte in den Linien *GstA1_P::HvMlo*-RNAi E5/1 und E7/7 nur die zweite der beiden RNAi-*repeats* nachgewiesen werden. Durch die Verwendung des Agrobakterienstammes *AGL-1* ist die unerwünschte Rekombination zwischen dem GATEWAY-Konstrukt und dem Agrobakterium als Ursache für dieses Phänomen unwahrscheinlich jedoch nicht auszuschließen, wobei noch eine alternative Erklärungen in Betracht zu ziehen ist. Dabei handelt es sich um die vergleichsweise geringen Präzision bei der Übertragung und Integration von T-DNA Sequenzen, in der es gerade bei der LB-Region eher zu Abweichungen kommt (Durrenberger *et al.* 1989). Allerdings wurde diese Annahme nicht experimentell belegt.

Weitere Informationen liefern die Gel-Blot Analysen. Grundsätzlich ließ sich aus den unterschiedlichen Integrationsmustern zeigen, dass es sich bei den untersuchten Pflanzen um unabhängig transgene Pflanzen handelt. In allen analysierten Individuen, abgesehen von der T2-Familie *GstA1_P::HvMlo*-RNAi E7/7, war mindestens eine Kopie des Markergens *HPT* nachweisbar. Der ausbleibende Nachweis des Transgens in dem Vertreter der T2-Familie von *GstA1_P::HvMlo*-RNAi E7/7 ist mit den auf dem Blatttest basierenden Segregationsanalysen konsistent, da in dieser Analyse Individuen identifiziert wurden, die sensitive gegenüber Hygromycin waren (s. 3.2.4). Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der Elternpflanze dieser Linie, um eine heterozygote Pflanze gehandelt hat.

Die anhand der Segregationsanalyse ausgewählten T2-Familien der *GstA1_P::HvMlo*-RNAi Linien wurden ebenfalls einer phänotypischen Charakterisierung unterzogen. Die Auswertung ergab dabei in keiner der Nachkommenschaften einen signifikanten Unterschied in der Anfälligkeit gegenüber *Bgt* im Vergleich zum Wildtyp.

Diskussion

Das Ausbleiben eines Effektes in Weizen durch die Verwendung einer RNAi-Effektorsequenz ist nicht zu erwarten, da die verwendete *HvMlo*-RNAi Sequenz eine Sequenzhomologie von 93% auf Nukleotidebene zu den Homöologen des korrespondierenden Genabschnitts von *TaMlo-1* aufweist. Obwohl die Funktionalität des verwendeten Konstruktes in einem transienten Ansatz in Gerste geprüft wurde (Himmelbach *et al.* 2007), zeigt das negative Ergebnis in Weizen, dass die Sequenzhomologie der verwendeten *HvMlo*-Sequenz in Weizen nicht ausreichend zu sein scheint. Somit ist nicht an der eigentlichen Funktionalität des verwendeten Konstrukts zu zweifeln, sondern eher die auftretende Variabilität der Expression und Effektivität des RNAi-Konstruktes als Ursache für nicht ausreichende statistische Aussagekraft der durchgeführten Versuche anzunehmen. Dafür spricht, dass die Mittelwerte bei der Anfälligkeitsbewertung in der Blattsegmentbonitur bei allen untersuchten Linien unter dem Wert der Kontrollpflanzen lagen. Dies gilt jedoch auch für die Pflanzen der Linie E5/1, für die nicht sicher belegt werden konnte, dass sie über beide RNAi-*repeats* verfügen und sich somit die Frage stellt, in wie weit die im Mittel niedrigeren Resistenzwerte auf die Anwesenheit des Transgens zurückzuführen sind.

Eine Erklärung für die geringe Ausprägung des RNAi-Effektes könnte der in den *GstA1_P::TaMlo*-RNAi Linien auftretende Effekt der stärkeren RNAi-Ausprägung bei höherer Transgenkopienzahl sein, der bei den mittels Agrobakterien-vermittelten Gentransfer hergestellten Linien nicht gegeben ist. Ein direkter Vergleich in der Effizienz der beiden Konstrukte in Abhängigkeit der Gendosis ist dabei nicht zulässig, da sie zwar beide mit *TaMlo-1* das gleiche Gen als Ziel haben, allerdings zu unterschiedlichen Regionen innerhalb des Gens komplementär sind.

Zudem wurde die Spezifität des gewählten *HvMlo*-RNAi Abschnitts zu den Homologen *TaMlo-2* bis *TaMlo-7* untersucht. In fünf der sechs Homologe konnte

Diskussion

keine Übereinstimmung einer Länge von 21 bp, die für die Induktion einer siRNA vermittelten Gensuppression notwendig ist, mit der verwendeten *HvMlo*-RNAi Sequenz nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme bildet *TaMlo-6*, bei dem eine 22 bp lange Sequenzhomologie zu der *HvMlo*-RNAi Sequenz auftritt. Allerdings ist auch hier fraglich, in wie weit diese geringfügige Sequenzhomologie den Abbau des entsprechenden Transkriptes ermöglicht. Vergleichende Literatur hierzu zeigt, dass es zu einem Unterdrücken der Genexpression kommen kann (Birmingham *et al.* 2006) (McGinnis *et al.* 2007). Dies tritt aber für endogene Gene seltener auf, als es in Transgenen der Fall ist (Miki *et al.* 2005). Damit ist die verwendete *HvMlo*-RNAi Sequenz nicht nur deutlich länger (545 bp) als die *TaMlo*-RNAi Sequenz (304 bp), sondern sie wies in der Analyse der potentiell effektiven siRNA Fragmente eine höhere Anzahl (elf) an potentiellen Effektorsequenzen gegenüber der *TaMlo*-RNAi Sequenz (vier) auf. Dies führte jedoch zu keiner statistisch nachweisbaren Ausprägung der Anfälligkeit gegenüber dem WT.

Wie bereits angemerkt, ist die Annahme einer positiven Korrelation zwischen der Anzahl der integrierten Transgenkopien und der Suppression des Zielgens bei Weizen bereits beschrieben worden (Travella *et al.* 2006). Diese dort vorgestellte Annahme wird durch die vorliegenden Ergebnisse der Analysen der *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien unterstützt. Dabei weisen die beiden Linien *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 1 und 3, die über eine Vielzahl an Integrationen verfügen, eine statistisch signifikant geringere Anfälligkeit gegenüber dem WT auf. Dies ist in allen anderen *GstAl_P::Mlo*-RNAi-Linien, die über wenige Transgenkopien verfügen, nicht der Fall. Ein experimenteller Nachweis für diese Korrelation konnte in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden, weist jedoch darauf hin, dass RNAi in Weizen ein quantitativer Effekt ist.

Diskussion

5 **Ausblick**

Aus den vorgestellten Ergebnissen und der Diskussion ergeben sich verschiedene Fragestellungen und daraus resultierende Ansatzpunkte für fortführende Studien.

Um die in der Diskussion vorgestellte Annahme der positiven Korrelation zwischen der Anzahl der integrierten Genkopien und der Ausprägung der Gensuppression weiter zu stützen, sind verschiedene experimentelle Nachweise zu erbringen. Vorrangig ist der Nachweis von siRNA-Fragmenten in den transgenen *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH Linien bzw. den ausgewählten homozygoten T2-Familien der *GstAl_P::HvMlo*-RNAi Linien und die Korrelation der siRNA-Abundanz in Abhängigkeit von der Anzahl der integrierten Genkopien zu nennen.

Ein weiterer Schwerpunkt sollte auf den epidermisspezifischen Promotor gelegt werden, der in der vorliegenden Studie mit dem Ziel einer gewebespezifischen Abregulation der *Mlo*-Expression und damit zur Vermeidung der in *mlo-5* Gersten-Mutanten auftretenden pleiotropen Effekte (s. 1.4.2.2) verwendet wurde. Ein experimenteller Nachweis für die Vermeidung pleiotroper Effekte des abregulierten *Mlo*-Gens konnte in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden, wäre allerdings über die künstliche Induktion von ROS-Spezies in Blattsegmenten durch Methylviologen bei hoher Photosyntheseleistung analog nach Tognetti denkbar (Tognetti *et al.* 2006).

Die Analyse der Funktion weiterer *TaMlo*-Homologe stellt ein interessantes Ziel für zukünftige Arbeiten dar. Zum einen ist an die Erstellung von Pflanzen zu denken, in denen alle bekannten *TaMlo*-Homologe in der Expression unterdrückt werden, zum anderen wäre auch die gezielte Abregulation einzelner *TaMlo*-Homologe denkbar. Weiterhin stellt sich die Frage, welche *TaMlo*-Homologe überhaupt und in welchem Umfang auf die Ausprägung einer Mehltaresistenz Einfluss haben. Die Funktionalität der einzelnen *TaMlo*-Homologe könnte dazu anhand der Komplementation der *mlo-5* Gerstenmutante nachgewiesen werden.

Ausblick

Die Situation in *A. thaliana*, in der erst eine Dreifachmutante *Atmlo2/6/12* zu vollständiger Resistenz wie bei *HvMlo*-Mutanten aus Gerste führt (Consonni *et al.* 2006), ist hier zu nennen. Hinweise, ob auch in Weizen die Etablierung einer *mlo*-vermittelten Mehltaresistenz durch die Abregulation einer Kombination unterschiedlicher *TaMlo*-Homologe besser realisiert werden kann, konnte bisher weder durch experimentelle Beweise aus der vorliegenden Arbeit noch aus Veröffentlichungen belegt werden.

Denkbar ist auch, anhand der Erstellung weiterer *GstA1_p::HvMlo*-RNAi Linien mittels Agrobakterien-vermitteltem Gentransfer, Linien mit einer höheren Anzahl an Transgenkopien zu erzeugen. Dazu ließen sich Kreuzungen mit den vorhandenen (und neu erstellten) Linien durchführen, um Nachkommen mit einer höheren Anzahl an Transgenkopien zu erhalten. Sowohl mit den parental Linien als auch mit den gekreuzten Filialgenerationen wäre die Möglichkeit gegeben, DH-Linien zu erstellen, um anhand dieses homozygoten Materials fortführende Arbeiten zur Etablierung einer Mehltaresistenz in Weizen durch Suppression von MLO durchzuführen.

6 Literatur

- Aist, J. R. (1976). "Papillae and Related Wound Plugs of Plant-Cells." Annual Review of Phytopathology **14**: 145-163.
- Altpeter, F., A. Varshney, O. Abderhalden, D. Douchkov, C. Sautter, J. Kumlehn, R. Dudler and P. Schweizer (2005). "Stable expression of a defense-related gene in wheat epidermis under transcriptional control of a novel promoter confers pathogen resistance." Plant Molecular Biology **57**(2): 271-283.
- Altpeter, F., V. Vasil, V. Srivastava, E. Stoger and I. K. Vasil (1996). "Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L) plants." Plant Cell Reports **16**(1-2): 12-17.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-3402.
- Assaad, F. F., J. L. Qiu, H. Youngs, D. Ehrhardt, L. Zimmerli, M. Kalde, G. Wanner, S. C. Peck, H. Edwards, K. Ramonell, C. R. Somerville and H. Thordal-Christensen (2004). "The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae." Molecular Biology of the Cell **15**(11): 5118-5129.
- Barton, K. A., A. N. Binns, A. J. M. Matzke and M. D. Chilton (1983). "Regeneration of Intact Tobacco Plants Containing Full Length Copies of Genetically Engineered T-DNA, and Transmission of T-DNA to R1-Progeny." Cell **32**(4): 1033-1043.
- Baulcombe, D. (2004). "RNA silencing in plants." Nature **431**(7006): 356-363.
- Bhat, R. A., M. Miklis, E. Schmelzer, P. Schulze-Lefert and R. Panstruga (2005). "Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(8): 3135-3140.
- Bieri, S., I. Potrykus and J. Futterer (2003). "Effects of combined expression of antifungal barley seed proteins in transgenic wheat on powdery mildew infection." Molecular Breeding **11**(1): 37-48.
- Birmingham, A., E. M. Anderson, A. Reynolds, D. Ilsley-Tyree, D. Leake, Y. Fedorov, S. Baskerville, E. Maksimova, K. Robinson, J. Karpilow, W. S. Marshall and A. Khvorova (2006). "3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets." Nat Methods **3**(3): 199-204.
- Bliffeld, M., J. Mundy, I. Potrykus and J. Futterer (1999). "Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease." Theoretical and Applied Genetics **98**(6-7): 1079-1086.
- Bock, J. B., H. T. Matern, A. A. Peden and R. H. Scheller (2001). "A genomic perspective on membrane compartment organization." Nature **409**(6822): 839-841.
- Both, M., M. Csukai, M. P. H. Stumpf and P. D. Spanu (2005). "Gene expression profiles of *Blumeria graminis* indicate dynamic changes to primary metabolism during development of an obligate biotrophic pathogen." Plant Cell **17**(7): 2107-2122.
- Büschges, R., K. Hollricher, R. Panstruga, G. Simons, M. Wolter, A. Frijters, R. vanDaelen, T. vanderLee, P. Diergaarde, J. Groenendijk, S. Topsch, P. Vos, F. Salamini and P. Schulze-Lefert (1997). "The barley mlo gene: A novel control element of plant pathogen resistance." Cell **88**(5): 695-705.
- Büschges, R., K. Hollricher, R. Panstruga, G. Simons, M. Wolter, A. Frijters, R. vanDaelen, T. vanderLee, P. Diergaarde, J. Groenendijk, S. Topsch, P. Vos, F. Salamini and P. Schulze-Lefert (1997). "The barley mlo gene: A novel control element of plant pathogen resistance." Cell **88**(5): 695-705.
- Butaye, K. M., I. J. Goderis, P. F. Wouters, J. M. Poes, S. L. Delaure, W. F. Broekaert, A. Depicker, B. P. Cammue and M. F. De Bolle (2004). "Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions." Plant J **39**(3): 440-449.
- Carena, Ed. (2009). Spring Wheat Breeding. Cereals, Springer Science.
- Carver, T. L. W. and W. R. Bushnell (1983). "The Probable Role of Primary Germ Tubes in Water-Uptake before Infection by *Erysiphe-Graminis*." Physiological Plant Pathology **23**(2): 229-240.
- Carver, T. L. W. and S. M. Ingerson (1987). "Responses of *Erysiphe-Graminis* Germlings to Contact with Artificial and Host Surfaces." Physiological and Molecular Plant Pathology **30**(3): 359-372.

Anhang

- Chen, Y., S. J. Yue, H. Li, Y. W. Li, Y. F. Zhu, J. K. Guo, Y. J. Liu and X. Jia (2008). "Generation of transgenic wheat lines with altered expression levels of 1Dx5 high-molecular weight glutenin subunit by RNA interference." Journal of Cereal Science **47**(2): 153-161.
- 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 (2006). "Expression analysis of the AtMLO gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins." Plant Mol Biol **60**(4): 583-597.
- Cheng, M., J. E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C. M. Hironaka, D. R. Duncan, T. W. Conner and Y. Wan (1997). "Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*." Plant Physiol **115**(3): 971-980.
- Collins, N. C., H. Thordal-Christensen, V. Lipka, S. Bau, E. Kombrink, J. L. Qiu, R. Huckelhoven, M. Stein, A. Freialdenhoven, S. C. Somerville and P. Schulze-Lefert (2003). "SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall." Nature **425**(6961): 973-977.
- Consonni, C., M. E. Humphry, H. A. Hartmann, M. Livaja, J. Durner, L. Westphal, J. Vogel, V. Lipka, B. Kemmerling, P. Schulze-Lefert, S. C. Somerville and R. Panstruga (2006). "Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis." Nature Genetics **38**(6): 716-720.
- Cunningham, F. X. and E. Gantt (1998). "Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **49**: 557-583.
- Dangl, J. L. and J. D. G. Jones (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." Nature **411**(6839): 826-833.
- Datta, S. K. (2007). Vol 59 Transgenic Crops. Biotechnology in Agriculture and Forestry E. C. D. Pua, M.R. . Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Devoto, A., H. A. Hartmann, P. Piffanelli, C. Elliott, C. Simmons, G. Taramino, C. S. Goh, F. E. Cohen, B. C. Emerson, P. Schulze-Lefert and R. Panstruga (2003). "Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family." Journal of Molecular Evolution **56**(1): 77-88.
- Devoto, A., P. Piffanelli, I. Nilsson, E. Wallin, R. Panstruga, G. von Heijne and P. Schulze-Lefert (1999). "Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants." Journal of Biological Chemistry **274**(49): 34993-35004.
- Djikeng, A., H. F. Shi, C. Tschudi and E. Ullu (2001). "RNA interference in *Trypanosoma brucei*: Cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs." Rna-a Publication of the Rna Society **7**(11): 1522-1530.
- Douchkov, D., D. Nowara, U. Zierold and P. Schweizer (2005). "A high-throughput gene-silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells." Mol Plant Microbe Interact **18**(8): 755-761.
- Dubcovsky, J., D. L. Fu, C. Uauy and A. Blechl (2007). "RNA interference for wheat functional gene analysis." Transgenic Research **16**(6): 689-701.
- Durrenberger, F., A. Cramer, B. Hohn and Z. Koukolikova-Nicola (1989). "Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9154-9158.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." Embo Journal **20**(23): 6877-6888.
- Elliott, C., J. Muller, M. Miklis, R. A. Bhatt, P. Schulze-Lefert and R. Panstruga (2005). "Conserved extracellular cysteine residues and cytoplasmic loop-loop interplay are required for functionality of the heptahelical MLO protein." Biochemical Journal **385**: 243-254.
- Elliott, C., F. S. Zhou, W. Spielmeier, R. Panstruga and P. Schulze-Lefert (2002). "Functional conservation of wheat and rice Mlo orthologs in defense modulation to the powdery mildew fungus." Molecular Plant-Microbe Interactions **15**(10): 1069-1077.
- Flor, H. H. (1971). "Current status of the gene-for-gene concept." Review of Phytopathology **9**: 275-296.
- Francis, S. A., F. M. Dewey and S. J. Gurr (1996). "The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* f sp *hordei*." Physiological and Molecular Plant Pathology **49**(3): 201-211.

Anhang

- Freialdenhoven, A., C. Peterhansel, J. Kurth, F. Kreuzaler and P. SchulzeLefert (1996). "Identification of genes required for the function of non-race-specific mlo resistance to powdery mildew in barley." Plant Cell **8**(1): 5-14.
- Garfinkel, D. J. and E. W. Nester (1980). "Agrobacterium-Tumefaciens Mutants Affected in Crown Gall Tumorigenesis and Octopine Catabolism." Journal of Bacteriology **144**(2): 732-743.
- Hamilton, A., O. Voinnet, L. Chappell and D. Baulcombe (2002). "Two classes of short interfering RNA in RNA silencing." Embo J **21**(17): 4671-4679.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-952.
- Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi and G. J. Hannon (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." Science **293**(5532): 1146-1150.
- Heath, M. C. (2000). "Nonhost resistance and nonspecific plant defenses." Current Opinion in Plant Biology **3**(4): 315-319.
- Hensel, G., A. Himmelbach, W. Chen, D. K. Douchkov and J. Kumlehn (2011). "Transgene expression systems in the Triticeae cereals." J Plant Physiol **168**(1): 30-44.
- Hensel, G., C. Kastner, S. Oleszczuk, J. Riechen and J. Kumlehn (2009). "Agrobacterium-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize." Int J Plant Genomics **2009**: 835608.
- Herrera-Estrella, L., M. D. Block, E. Messens, J. P. Hernalsteens, M. V. Montagu and J. Schell (1983). "Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells." EMBO J **2**(6): 987-995.
- Himber, C., P. Dunoyer, G. Moissiard, C. Ritzenthaler and O. Voinnet (2003). "Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing." Embo J **22**(17): 4523-4533.
- Himmelbach, A., U. Zierold, G. Hensel, J. Riechen, D. Douchkov, P. Schweizer and J. Kumlehn (2007). "A set of modular binary vectors for transformation of cereals." Plant Physiology **145**(4): 1192-1200.
- Hückelhoven, R. (2005). "Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies." Fems Microbiology Letters **245**(1): 9-17.
- Hückelhoven, R., J. Fodor, C. Preis and K. H. Kogel (1999). "Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation." Plant Physiology **119**(4): 1251-1260.
- Jarosch, B., K. H. Kogel and U. Schaffrath (1999). "The ambivalence of the barley Mlo locus: Mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*." Molecular Plant-Microbe Interactions **12**(6): 508-514.
- Johnston, M. (1997). "Powdery mildew " In: Compendium of barley diseases: APS press: 31-33.
- Jones, J. D. G. and J. L. Dangl (2006). "The plant immune system." Nature **444**(7117): 323-329.
- Jordan, T., S. Seeholzer, S. Schwizer, A. Toller, I. E. Somssich and B. Keller (2011). "The wheat Mla homologue TmMla1 exhibits an evolutionarily conserved function against powdery mildew in both wheat and barley." Plant J **65**(4): 610-621.
- Jorgensen, J. H. (1992). "Discovery, Characterization and Exploitation of Mlo Powdery Mildew Resistance in Barley." Euphytica **63**(1-2): 141-152.
- Jorgensen, J. H. (1994). "Genetics of Powdery Mildew Resistance in Barley." Critical Reviews in Plant Sciences **13**(1): 97-119.
- Kahlon, T. S. (1989). "Nutritional Implications and Uses of Wheat and Oat Kernel Oil." Cereal Foods World **34**(10): 872-875.
- Kessler, S. A., H. Shimosato-Asano, N. F. Keinath, S. E. Wuest, G. Ingram, R. Panstruga and U. Grossniklaus (2010). "Conserved Molecular Components for Pollen Tube Reception and Fungal Invasion." Science **330**(6006): 968-971.
- Kihara, H. (1965). "Origin of Wheat in Light of Comparative Genetics." Japanese Journal of Genetics **40**(1): 45-&.

Anhang

- Kilian, B., H. Ozkan, O. Deusch, S. Effgen, A. Brandolini, J. Kohl, W. Martin and F. Salamini (2007). "Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes." Molecular Biology and Evolution **24**(1): 217-227.
- Kim, M. C., R. Panstruga, C. Elliott, J. Muller, A. Devoto, H. W. Yoon, H. C. Park, M. J. Cho and P. Schulze-Lefert (2002). "Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley." Nature **416**(6879): 447-450.
- Kogel, K. H. and G. Langen (2005). "Induced disease resistance and gene expression in cereals." Cellular Microbiology **7**(11): 1555-1564.
- Konishi, S., T. Sasakuma and T. Sasanuma (2010). "Identification of novel Mlo family members in wheat and their genetic characterization." Genes Genet Syst **85**(3): 167-175.
- Kumlehn, J., L. Serazetdinova, G. Hensel, D. Becker and H. Loez (2006). "Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*." Plant Biotechnology Journal **4**(2): 251-261.
- Lazo, G. R., P. A. Stein and R. A. Ludwig (1991). "A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*." Biotechnology (N Y) **9**(10): 963-967.
- Li, W. L., P. Zhang, J. P. Fellers, B. Friebe and B. S. Gill (2004). "Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome." Plant Journal **40**(4): 500-511.
- Lingel, A., B. Simon, E. Izaurralde and M. Sattler (2003). "Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain." Nature **426**(6965): 465-469.
- Lipardi, C., Q. Wei and B. M. Paterson (2001). "RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs." Cell **107**(3): 297-307.
- Liu, Q. and H. Zhu (2008). "Molecular evolution of the MLO gene family in *Oryza sativa* and their functional divergence." Gene **409**(1-2): 1-10.
- Liu, W. G., M. Y. Zheng, E. A. Polle and C. F. Konzak (2002). "Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis." Crop Science **42**(3): 686-692.
- Lyngkjaer, M. F., A. C. Newton, J. L. Atzema and S. J. Baker (2000). "The Barley mlo-gene: an important powdery mildew resistance source." Agronomie **20**(7): 745-756.
- Maningat, C. C. and P. A. Seib (2010). "Understanding the Physicochemical and Functional Properties of Wheat Starch in Various Foods." Cereal Chemistry **87**(4): 305-314.
- McGinnis, K., N. Murphy, A. R. Carlson, A. Akula, C. Akula, H. Basinger, M. Carlson, P. Hermanson, N. Kovacevic, M. A. McGill, V. Seshadri, J. Yoyokie, K. Cone, H. F. Kaeppler, S. M. Kaeppler and N. M. Springer (2007). "Assessing the efficiency of RNA interference for maize functional genomics." Plant Physiol **143**(4): 1441-1451.
- Mette, M. F., W. Aufsatz, J. van der Winden, M. A. Matzke and A. J. Matzke (2000). "Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA." Embo J **19**(19): 5194-5201.
- Miki, D., R. Itoh and K. Shimamoto (2005). "RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice." Plant Physiol **138**(4): 1903-1913.
- Mochida, K., Y. Yamazaki and Y. Ogihara (2003). "Discrimination of homoeologous gene expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags." Mol Genet Genomics **270**(5): 371-377.
- Oldach, K. H., D. Becker and H. Lorz (2001). "Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat." Molecular Plant-Microbe Interactions **14**(7): 832-838.
- Page, D. R. and L. Grossniklaus (2002). "The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*." Nature Reviews Genetics **3**(2): 124-136.
- Panstruga, R. (2005). "Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi." Biochem Soc Trans **33**(Pt 2): 389-392.
- Panstruga, R., A. Reinstadler, J. Muller, J. H. Czembor and P. Piffanelli (2010). "Novel induced mlo mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionally important domains in the heptahelical barley Mlo protein." Bmc Plant Biology **10**.

Anhang

- Peterhänsel, C., A. Freialdenhoven, J. Kurth, R. Kolsch and P. Schulze-Lefert (1997). "Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death." *Plant Cell* **9**(8): 1397-1409.
- Piffanelli, P., L. Ramsay, R. Waugh, A. Benabdelmouna, A. D'Hont, K. Hollricher, J. H. Jorgensen, P. Schulze-Lefert and R. Panstruga (2004). "A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew." *Nature* **430**(7002): 887-891.
- Piffanelli, P., F. S. Zhou, C. Casais, J. Orme, B. Jarosch, U. Schaffrath, N. C. Collins, R. Panstruga and P. Schulze-Lefert (2002). "The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli." *Plant Physiology* **129**(3): 1076-1085.
- Popineau, Y., B. Huchet, C. Larre and S. Berot (2002). "Foaming and emulsifying properties of fractions of gluten peptides obtained by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration." *Journal of Cereal Science* **35**(3): 327-335.
- Pryce-Jones, E., T. Carver and S. J. Gurr (1999). "The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**(3): 175-182.
- Sambrook, Ed. (2001). *Molecular Cloning, 3. Edition* Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Schauer, S. E., S. E. Jacobsen, D. W. Meinke and A. Ray (2002). "DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development." *Trends in Plant Science* **7**(11): 487-491.
- Schubert, D., B. Lechtenberg, A. Forsbach, M. Gils, S. Bahadur and R. Schmidt (2004). "Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects." *Plant Cell* **16**(10): 2561-2572.
- Schulze-Lefert, P. (2004). "Knocking on heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall." *Current Opinion in Plant Biology* **7**(4): 377-383.
- Schweizer, P. (2007). "Nonhost resistance of plants to powdery mildew - New opportunities to unravel the mystery." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **70**(1-3): 3-7.
- Schweizer, P., J. Pokorny, P. Schulze-Lefert and R. Dudler (2000). "Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals." *Plant Journal* **24**(6): 895-903.
- Seeholzer, S., T. Tsuchimatsu, T. Jordan, S. Bieri, S. Pajonk, W. Yang, A. Jahoor, K. K. Shimizu, B. Keller and P. Schulze-Lefert (2010). "Diversity at the Mla powdery mildew resistance locus from cultivated barley reveals sites of positive selection." *Mol Plant Microbe Interact* **23**(4): 497-509.
- Sijen, T., J. Fleenor, F. Simmer, K. L. Thijssen, S. Parrish, L. Timmons, R. H. Plasterk and A. Fire (2001). "On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing." *Cell* **107**(4): 465-476.
- Singrun, C., S. L. K. Hsam, L. Hartl, F. J. Zeller and V. Mohler (2003). "Powdery mildew resistance gene Pm22 in cultivar Virest is a member of the complex Pm1 locus in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.)." *Theoretical and Applied Genetics* **106**(8): 1420-1424.
- Smith, N. A., S. P. Singh, M. B. Wang, P. A. Stoutjesdijk, A. G. Green and P. M. Waterhouse (2000). "Gene expression - Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs." *Nature* **407**(6802): 319-320.
- Tang, G. and G. Galili (2004). "Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application." *Trends in Biotechnology* **22**(9): 463-469.
- Tang, G., B. J. Reinhart, D. P. Bartel and P. D. Zamore (2003). "A biochemical framework for RNA silencing in plants." *Genes Dev* **17**(1): 49-63.
- Tognetti, V. B., J. F. Palatnik, M. F. Fillat, M. Melzer, M. R. Hajirezaei, E. M. Valle and N. Carrillo (2006). "Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco confers broad-range stress tolerance." *Plant Cell* **18**(8): 2035-2050.
- Travella, S., T. E. Klimm and B. Keller (2006). "RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat." *Plant Physiol* **142**(1): 6-20.
- Vasil, V., A. M. Castillo, M. E. Fromm and I. K. Vasil (1992). "Herbicide Resistant Fertile Transgenic Wheat Plants Obtained by Microprojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus." *Bio-Technology* **10**(6): 667-674.

Anhang

- Verdel, A., S. T. Jia, S. Gerber, T. Sugiyama, S. Gygi, S. I. S. Grewal and D. Moazed (2004). "RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex." Science **303**(5658): 672-676.
- Wang, T., L. M. Iyer, R. Pancholy, X. Shi and T. C. Hall (2005). "Assessment of penetrance and expressivity of RNAi-mediated silencing of the Arabidopsis phytoene desaturase gene." New Phytol **167**(3): 751-760.
- Warburton, L., B. Skovmand and A. Mujeeb-Kazi (2002). "The molecular genetic characterization of the 'Bobwhite' bread wheat family using AFLPs and the effect of the T1BL.1RS translocation." Theor Appl Genet **104**(5): 868-873.
- Wassenegger, M., S. Heimes, L. Riedel and H. L. Sanger (1994). "RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants." Cell **76**(3): 567-576.
- Wicker, T., N. Yahiaoui and B. Keller (2007). "Contrasting rates of evolution in Pm3 loci from three wheat species and rice." Genetics **177**(2): 1207-1216.
- Wolter, M., K. Hollricher, F. Salamini and P. Schulzelefert (1993). "The Mlo Resistance Alleles to Powdery Mildew Infection in Barley Trigger a Developmentally Controlled Defense Mimic Phenotype." Molecular & General Genetics **239**(1-2): 122-128.
- Wright, A. J., B. J. Thomas and T. L. W. Carver (2002). "Early adhesion of Blumeria graminis to plant and artificial surfaces demonstrated by centrifugation." Physiological and Molecular Plant Pathology **61**(4): 217-226.
- Xie, Z. X., L. K. Johansen, A. M. Gustafson, K. D. Kasschau, A. D. Lellis, D. Zilberman, S. E. Jacobsen and J. C. Carrington (2004). "Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants." Plos Biology **2**(5): 642-652.
- Yahiaoui, N., S. Brunner and B. Keller (2006). "Rapid generation of new powdery mildew resistance genes after wheat domestication." Plant Journal **47**(1): 85-98.
- Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp and D. P. Bartel (2000). "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell **101**(1): 25-33.
- Zhang, Z., C. Henderson, E. Perfect, T. L. Carver, B. J. Thomas, P. Skamnioti and S. J. Gurr (2005). "Of genes and genomes, needles and haystacks: Blumeria graminis and functionality." Mol Plant Pathol **6**(5): 561-575.
- Zilberman, D., X. F. Cao and S. E. Jacobsen (2003). "ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation." Science **299**(5607): 716-719.
- Zohary, D. H., Maria (1988). Domestication of plants in the old world: The origin and spread of cultivated plants in west Asia, Europe, and the Nile Valley, Clarendon Press (Oxford, OX and New York)

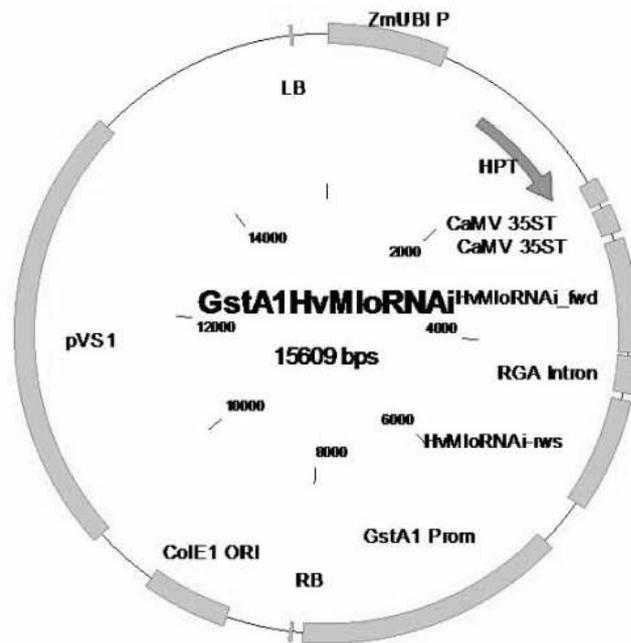
Anhang

Sequenz der HvMlo-RNAi Sequenz, die bei der Rekombination in den Vektor pIPK010 (Himmelbach et al.) Verwendung fand:

```
TAGTCTCCAGTTCTCTGCAGCTATATGACCTTCCCCCTCTACGCGCTCGTCACACAGATGGGATCAAACATG
AAGAGGTCCATCTTCGACGAGCAGACGTCCAAGGCGCTCACCAACTGGCGGAACACGGCCAAGGAGAAGAA
GAAAGTCCGAGACACGGACATGCTGATGGCTCAGATGATCGGCGACGCAACACCGAGCCGAGGCTCGTCGCC
GATGCCGAGCCGGGGTTCATCACCCGTGCACCTGTCTTCAAAAGGGCATGGGGCGGTCCGACGACCCCCAGAG
CGCGCCACCTCGCCAAGGACCCAGCAGGAGGCTAGGGACATGTACCCGGTTGTGGTGGCGCACCCGGTGCA
CAGACTAAATCCTAACGACAGGAGGAGGTCCGCCTCGTCGTCGGCCCTCGAAGCCGACATCCCCAGTGCAGA
TTTTTCCTCAGCCAGGGATGAGACAAGTTTCTGTATTCATGTTAGTCCAATGTATAGCCAACATAGGATGTGAT
GATTCGTACAATAAGAAATACAATTTTTTACTGAGTC
```

Schematische Darstellung des *GstA1p::HvMlo*-RNAi Konstruktes, welches bei dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer Anwendung fand:

Anhang

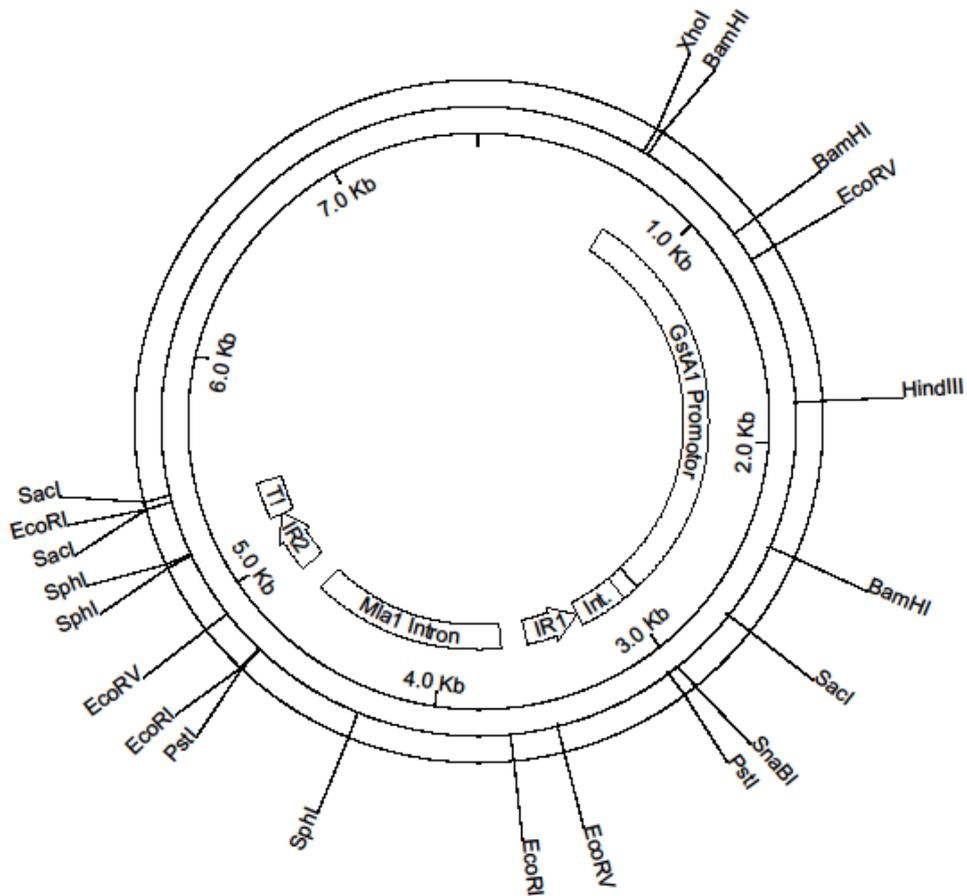


Anhang

Sequenz der *TaMlo*-RNAi Sequenz, die in dem Vektor *GstA1P::TaMlo*-RNAi Verwendung fand:

```
GCAGCCTCCCCTGTGGGCTGTGGCGATCCTCACCCCTCTTCCTTGATATCGACGGGATCGGCACACTCACCTGG  
GTTTCTTTCATCCCTCTCATCATCCTCTTGTGTGTTGGAACCAAGCTAGAGATGATCATCATGGAGATGGCCCTG  
GAGATCCAGGACCGGTCGAGCGTCATCAAGGGGGCACCCGTGGTCGAGCCCAGCAACAAGTTCTTCTGGTTC  
CACCGCCCCGACTGGGTCCTTCTTCATACACCTGACGCTGTTCCAGAACGCGTTTCAGATGGCACATTCGT  
GTGGACAGG
```

Schematische Darstellung des Vektors *GstA1P::TaMlo*-RNAi, welcher bei dem biologischen Gentransfer Anwendung fand.



Anhang

Ergebnis der Analyse der *TaMlo*-RNAi Sequenz mit dem internet-basierten Programm „siRNA Finder“ (Ambion)

Target sequence 1: AACCAAGCTAGAGATGATCAT

Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	113
GC		content:		38.1%
Sense	strand	siRNA:	CCAAGCUAGAGAUGAUGAUGUUU	
Antisense strand siRNA: AUGAUGAUCUCUAGCUUGUU				

Target sequence 2: AAGCTAGAGATGATCATCATG

Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	117
GC		content:		38.1%
Sense	strand	siRNA:	GCUAGAGAUGAUGAUGAUGUU	
Antisense strand siRNA: CAUGAUGAUGAUCUCUAGCUU				

Target sequence 4: AACCAAGTTCTTCTGGTTCCAC

Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	204
GC		content:		42.9%
Sense	strand	siRNA:	CAAGUUCUUCUGGUUCCACUU	
Antisense strand siRNA: GUGGAACCAGAAGAACUUGUU				

Target sequence 6: AACGCGTTTCAGATGGCACAT

Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	270
GC		content:		47.6%
Sense	strand	siRNA:	CGCGUUUCAGAUGGCACAUUU	
Antisense strand siRNA: AUGUGCCAUCUGAAACGCGUU				

Anhang

Ergebnis der Analyse der *HvMlo*-RNAi Sequenz mit dem internet-basierten Programm „siRNA Finder“ (Ambion)

Target sequence 1: AAACATGAAGAGGTCCATCTT				
Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	68
GC		content:		38.1%
Sense	strand	siRNA:	ACAUGAAGAGGUCCAUCUUUU	
Antisense strand siRNA: AAGAUGGACCUCUUAUGUUU				
Target sequence 2: AAGGAGAAGAAGAAAGTCCGA				
Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	135
GC		content:		42.9%
Sense	strand	siRNA:	GGAGAAGAAGAAAGUCCGAUU	
Antisense strand siRNA: UCGGACUUUCUUCUUCUUU				
Target sequence 3: AAGAAGAAAGTCCGAGACACG				
Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	141
GC		content:		47.6%
Sense	strand	siRNA:	GAAGAAAGUCCGAGACACGUU	
Antisense strand siRNA: CGUGUCUCGGACUUUCUUCUU				
Target sequence 4: AAATCCTAACGACAGGAGGAG				
Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	368
GC		content:		47.6%
Sense	strand	siRNA:	AUCCUAACGACAGGAGGAGUU	
Antisense strand siRNA: CUCCUCCUGUCGUUAGGAUUU				
Target sequence 5: AAGTTTCTGTATTCATGTTAG				
Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	459
GC		content:		28.6%
Sense	strand	siRNA:	GUUUCUGUAUUAUGUUAGUU	
Antisense strand siRNA: CUAACAUGAAUACAGAAACUU				
Target sequence 6: AATGTATAGCCAACATAGGAT				
Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	483
GC		content:		33.3%
Sense	strand	siRNA:	UGUAUAGCCAACAUAGGAUUU	
Antisense strand siRNA: AUCCUAUGUUGGCUAUACAUU				
Target sequence 7: AACATAGGATGTGATGATTCG				
Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	494
GC		content:		38.1%
Sense	strand	siRNA:	CAUAGGAUGUGAUGAUUCGUU	

Anhang

Antisense strand siRNA: CGAAUCAUCAUCCUAUGUU

Target sequence 8: AATAAGAAATACAATTTTTTA

Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	518
GC		content:		9.5%
Sense	strand	siRNA:	UAAGAAUACAAUUUUUUAUU	

Antisense strand siRNA: UAAAAAUUGUAUUUCUUAUU

Target sequence 9: AAGAAATACAATTTTTACTG

Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	521
GC		content:		19%
Sense	strand	siRNA:	GAAAUACAAUUUUUACUGUU	

Antisense strand siRNA: CAGUAAAAAUUGUAUUUCUU

Target sequence 10: AAATACAATTTTTACTGAGT

Blast	search	(in	new	window)
Position	in	gene	sequence:	524
GC		content:		19%
Sense	strand	siRNA:	AUACAAUUUUUACUGAGUUU	

Antisense strand siRNA: ACUCAGUAAAAAUUGUAUUU

Anhang

Ergebniss der Analyse der DH Nachkommenschaften der Regenerate aus der embryogenen Pollenkultur (3.1.3) (MW= Mittelwert; σ M= SEM (standard error of the mean)):

Bewertung der rel. Anfälligkeit der DH-Linien der transgenen Ausgangslinie 1 gegen *Bgt*

No	Linie	1.Exp.	2.Exp.	3. Exp.	MW	σ M
1	J445	90,78%	39,43%	50,16%	60,12%	12,77%
2	J451	16,37%	101,25%	93,87%	70,49%	22,17%
3	J454	76,02%	74,43%	81,41%	77,29%	1,72%
4	J455	96,36%	87,53%	74,93%	86,27%	5,08%
5	J452	74,71%	99,87%	88,71%	87,76%	5,94%
6	J456	96,36%	65,54%	109,52%	90,48%	10,64%
7	J447	95,17%	96,85%	89,30%	93,77%	1,87%
8	J449	109,31%	101,34%	78,43%	96,36%	7,56%
9	J450	114,90%	98,34%	106,10%	106,45%	3,91%
10	J448	141,52%	97,42%	84,82%	107,92%	14,03%
11	J446	119,17%	113,05%	95,37%	109,20%	5,82%
12	J453	56,89%	169,47%	103,36%	109,90%	26,67%
mittel	1				91,34%	4,44%

Bewertung der rel. Anfälligkeit der DH-Linien der transgenen Ausgangslinie 2 gegen *Bgt*

No		1.Exp.	2.Exp.	3. Exp.	MW	σ M
1	J470	64,93%	99,64%	102,68%	89,08%	9,89%
2	J476	67,23%	101,66%	98,61%	89,17%	8,99%
3	J472	89,89%	105,39%	95,97%	97,08%	3,68%
4	J469	60,44%	114,64%	101,75%	92,27%	11,56%
5	J471	91,33%	105,14%	107,45%	101,31%	4,11%
6	J473	104,19%	112,59%	98,19%	104,99%	3,41%
7	J467	128,19%	112,86%		120,52%	4,42%
8	J465	101,77%	159,34%	106,09%	122,40%	15,11%
9	J475	200,10%	103,41%	109,86%	137,79%	25,48%
mittel	mittel				106,55%	5,39%

Bewertung der rel. Anfälligkeit der DH-Linien der transgenen Ausgangslinie 3 gegen *Bgt*

No		1.Exp.	2.Exp.	3. Exp.	MW	σ M
1	J486	43,55%	58,11%	62,18%	54,62%	4,62%
2	J497	10,01%	68,80%	97,26%	58,69%	20,98%
3	J495	32,52%	58,14%	85,46%	58,71%	12,48%
4	J494	31,97%	67,88%	77,08%	58,97%	11,24%
5	J487	50,71%	72,72%	55,34%	59,59%	5,47%
6	J499	58,03%	60,88%	68,37%	62,42%	2,52%
7	J498	19,80%	79,80%	91,50%	63,70%	18,13%
8	J496	43,51%	78,35%	71,92%	64,59%	8,74%
9	J488	63,42%	71,63%	72,36%	69,14%	2,34%
10	J489	70,85%	58,64%	79,06%	69,51%	4,84%
11	J492	68,14%	63,15%	78,08%	69,79%	3,58%
12	J490	61,14%	87,22%	75,61%	74,66%	6,16%

Anhang

13	J491	79,28%	69,61%	82,02%	76,97%	3,07%
14	J485	54,31%	83,54%	103,03%	80,29%	11,56%
15						
	mittel				0,650769053	2,07%

Anhang

Messwerte der Einzelblattanalyse der in der Voruntersuchung (s.3.1.3) ausgewählten *GstAlp::TaMlo*-RNAi-DH Linien 1-3:

Erstes Replikat von *GstAlp::TaMlo*-RNAi-DH 1 (J445):

% Befallsfläche J445		% Befallsfläche WT	
Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J445_1		WT_1	65,09
J445_2		WT_2	3,85
J445_3		WT_3	6,64
J445_4	10,84	WT_4	8,22
J445_5		WT_5	50,34
J445_6		WT_6	38,35
J445_7		WT_7	28,44
J445_8		WT_8	4,67
J445_9	5,27	WT_9	2,66
J445_10		WT_10	57,5
J445_11	21,46	WT_11	12,31
J445_12		WT_12	41,95
J445_13		WT_13	31,94
J445_14	24,34	WT_14	61,46
J445_15		WT_15	17,22
J445_16		WT_16	15,27
J445_17	15,03	WT_17	13,22
J445_18		WT_18	45,21
J445_19	12,36	WT_19	0,86
J445_20		WT_20	17,17
J445_21	7,27	WT_21	54,44
J445_22	5,33	WT_22	
J445_23	3,52	WT_23	
J445_24		WT_24	7,68
J445_25		WT_25	1,83
J445_26	3,12	WT_26	
J445_27		WT_27	12,62
J445_28		WT_28	8,12
J445_29	1,74	WT_29	23,81
J445_30		WT_30	21,89
		WT_31	44,2
		WT_32	37,94
		WT_33	44,5
		WT_34	3,8
		WT_35	3,93
		WT_36	35,19
MW	10,03	MW	24,92
σ M	7,60	σ M	19,93
n	11	n	33

Anhang

Zweites Replikat von *GstA1_p::TaMlo*-RNAi-DH 1 (J445):

% Befallsfläche J445

% Befallsfläche WT

Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J445_1	72,55	WT_1	
J445_2	37,84	WT_2	79,71
J445_3		WT_3	68,84
J445_4		WT_4	87,86
J445_5	80,74	WT_5	83,48
J445_6	6,2	WT_6	62,15
J445_7	3,53	WT_7	77,31
J445_8		WT_8	99,63
J445_9	2,34	WT_9	78,74
J445_10	23,83	WT_10	89,91
J445_11	2,17	WT_11	
J445_12		WT_12	
J445_13		WT_13	2,56
J445_14	88,98	WT_14	44,29
J445_15		WT_15	68,31
J445_16		WT_16	94,29
J445_17		WT_17	75,36
J445_18		WT_18	63,3
J445_19		WT_19	69,92
J445_20		WT_20	7,15
J445_21	22,81	WT_21	
J445_22		WT_22	87,13
J445_23		WT_23	
J445_24		WT_24	81,78
J445_25	98,08	WT_25	11,3
J445_26	55,17	WT_26	57,5
J445_27	4,76	WT_27	98,92
J445_28		WT_28	
J445_29	8,89	WT_29	
J445_30	8,89	WT_30	61,96
		WT_31	87,4
		WT_32	
		WT_33	41,87
		WT_34	45,59
		WT_35	63,27
		WT_36	97,44
MW	34,45	MW	67,39
σM	35,17	σM	26,61
n	15		28

Anhang

Drittes Replikat von *GstAl_P::TaMlo*-RNAi-DH 1 (J445):

% Befallsfläche J445		% Befallsfläche WT	
Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J445_1	42,32	WT_1	77,02
J445_2	57,17	WT_2	92,06
J445_3	51,36	WT_3	99,76
J445_4	33,99	WT_4	78,16
J445_5	68,5	WT_5	65,9
J445_6	87,42	WT_6	80,54
J445_7	76,04	WT_7	42,77
J445_8	86,58	WT_8	100
J445_9	75,92	WT_9	80,34
J445_10	57,32	WT_10	91,51
J445_11	81,96	WT_11	85,95
J445_12	36,65	WT_12	95,4
J445_13	95,09	WT_13	71,85
J445_14	68,07	WT_14	69,06
J445_15	60,17	WT_15	86,58
J445_16	71,42	WT_16	76,09
J445_17	62,36	WT_17	61,69
J445_18	60,89	WT_18	83,4
J445_19	65,97	WT_19	56,47
J445_20	96,7	WT_20	75,99
J445_21	58,81	WT_21	92,1
J445_22	70,81	WT_22	
J445_23	82,92	WT_23	69,72
J445_24	67,55	WT_24	74,87
J445_25	73,61	WT_25	
J445_26	37,8	WT_26	95,56
J445_27	68,5	WT_27	62,6
J445_28	91,91	WT_28	50,23
J445_29	49,81	WT_29	89,33
J445_30	54,96	WT_30	87,88
		WT_31	60,14
		WT_32	
		WT_33	73,25
		WT_34	70,17
		WT_35	75,49
		WT_36	76,59
MW	66,42	MW	77,23
σM	16,94	σM	14,00
n	30		33

Anhang

Erstes Replikat von *GstA1p::Tamlo*-RNAi-DH 2 (J470):

% Befallsfläche J470		% Befallsfläche WT	
Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J470_1	5,41	WT_1	45,02
J470_2	66,38	WT_2	1,63
J470_3	2,71	WT_3	
J470_4	19,12	WT_4	13,44
J470_5	1,93	WT_5	8,17
J470_6	12,11	WT_6	3,76
J470_7	74,27	WT_7	9,28
J470_8	3,09	WT_8	2,85
J470_9	4,82	WT_9	31,59
J470_10	6,01	WT_10	56,72
J470_11	2,79	WT_11	24,68
J470_12	77,78	WT_12	91,25
J470_13	1,69	WT_13	
J470_14	1,59	WT_14	7,42
J470_15		WT_15	10,96
J470_16		WT_16	2,49
J470_17		WT_17	10,08
J470_18	2,88	WT_18	16,56
J470_19	5,3	WT_19	11,29
J470_20	8,51	WT_20	7,29
J470_21		WT_21	19,3
J470_22	10,27	WT_22	2,48
J470_23	9,38	WT_23	35,83
J470_24	4,4	WT_24	4,83
J470_25	2,82	WT_25	6,36
J470_26	5,35	WT_26	40,38
J470_27	8,66	WT_27	8,46
J470_28	5	WT_28	27,39
J470_29	3,3	WT_29	3,42
J470_30		WT_30	32,65
		WT_31	12,1
		WT_32	6,86
		WT_33	15,11
		WT_34	5,57
		WT_35	6,21
		WT_36	7,22
MW	13,82	MW	17,31
σ M	22,64	σ M	18,98
n	25		34

Anhang

Zweites Replikat von *GstAlp::TaMlo*-RNAi-DH 2 (J470):

% Befallsfläche J470		% Befallsfläche WT	
Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J470_1		WT_1	67,07
J470_2	52,85	WT_2	93,67
J470_3	73,13	WT_3	79,39
J470_4	95,31	WT_4	69,24
J470_5	90,94	WT_5	72,12
J470_6	76,82	WT_6	61,14
J470_7	88,23	WT_7	47,84
J470_8	87,36	WT_8	68,68
J470_9		WT_9	55,46
J470_10	95,07	WT_10	99,89
J470_11	78,01	WT_11	98,45
J470_12	50,81	WT_12	78,61
J470_13	60,69	WT_13	91,33
J470_14	97,13	WT_14	84,78
J470_15	51,56	WT_15	87,67
J470_16	69,79	WT_16	79,86
J470_17		WT_17	77,87
J470_18	90,1	WT_18	88,19
J470_19	73,83	WT_19	87,21
J470_20	78,24	WT_20	79,08
J470_21	92,97	WT_21	69,1
J470_22	70,32	WT_22	59,78
J470_23	89,03	WT_23	78,82
J470_24	97,78	WT_24	96,1
J470_25	91,57	WT_25	95,47
J470_26	99,97	WT_26	75,5
J470_27	71,49	WT_27	83,16
J470_28	78,64	WT_28	
J470_29	69,13	WT_29	83,59
J470_30	93,21	WT_30	
		WT_31	
		WT_32	
		WT_33	
		WT_34	64,42
		WT_35	89,06
		WT_36	
MW	80,15	MW	78,75
σ M	14,72	σ M	13,23
n	27		30

Anhang

Drittes Replikat von *GstAI_P::Tamlo*-RNAi-DH 2 (J470):

% Befallsfläche J470		% Befallsfläche WT	
Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J470_1	65,06	WT_1	80,51
J470_2	68,45	WT_2	
J470_3	81,94	WT_3	89,07
J470_4	57,22	WT_4	85,98
J470_5	41,14	WT_5	69,68
J470_6	91,67	WT_6	
J470_7	48,97	WT_7	76,59
J470_8	72,49	WT_8	50,09
J470_9	87,19	WT_9	
J470_10	65,23	WT_10	48,66
J470_11	93	WT_11	56,73
J470_12	85,74	WT_12	48,52
J470_13	67,88	WT_13	97,39
J470_14	65,78	WT_14	77,64
J470_15	57,74	WT_15	68,37
J470_16	65,12	WT_16	71,41
J470_17		WT_17	65,13
J470_18	75,18	WT_18	
J470_19	60,21	WT_19	92,82
J470_20	50,7	WT_20	52,22
J470_21	91,4	WT_21	46,88
J470_22	75,08	WT_22	66,9
J470_23	75,96	WT_23	69,91
J470_24	89,07	WT_24	86,7
J470_25	79,91	WT_25	
J470_26	57,11	WT_26	80,61
J470_27	80,67	WT_27	44
J470_28	76,45	WT_28	
J470_29	66,32	WT_29	79,11
J470_30	95,23	WT_30	80,18
		WT_31	64,71
		WT_32	77,76
		WT_33	64,67
		WT_34	82,39
		WT_35	81,82
		WT_36	92,57
MW	72,00	MW	71,63
σ M	14,28	σ M	15,06
n	29		30

Anhang

Erstes Replikat von *GstA1_p::TaMlo*-RNAi-DH 3 (J487):

% Befallsfläche

J487		% Befallsfläche WT	
Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J487_1	25,48	WT_1	36,97
J487_2	4,49	WT_2	32,07
J487_3		WT_3	47,89
J487_4	16,43	WT_4	46,21
J487_5	10,54	WT_5	18,36
J487_6	5,83	WT_6	33,5
J487_7	4,14	WT_7	44,39
J487_8	45,98	WT_8	12,63
J487_9	38,34	WT_9	37,27
J487_10	33,13	WT_10	27,9
J487_11	6,5	WT_11	15,27
J487_12	7,41	WT_12	21,6
J487_13	45,19	WT_13	64,68
J487_14	5,79	WT_14	44,33
J487_15	68,24	WT_15	23,36
J487_16	54	WT_16	24,44
J487_17	4,53	WT_17	19,6
J487_18	4,42	WT_18	57,57
J487_19	10,89	WT_19	16,97
J487_20	6,49	WT_20	3,98
J487_21	9,28	WT_21	22,16
J487_22	9,15	WT_22	49,49
J487_23	9,62	WT_23	44,03
J487_24	5,82	WT_24	33,14
J487_25	8	WT_25	24,84
J487_26	9,29	WT_26	32,82
J487_27	8,25	WT_27	48,52
J487_28	19,32	WT_28	37,1
J487_29	20,37	WT_29	18,63
J487_30	9,23	WT_30	9,96
		WT_31	50,08
		WT_32	76,01
		WT_33	30,24
		WT_34	15,69
		WT_35	32,86
		WT_36	44,85
MW	17,45	MW	33,32
σM	17,20	σM	16,04

Anhang

Zweites Replikat von *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH 3 (J487):

% Befallsfläche

J487

% Befallsfläche WT

Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J487_1	15,43	WT_1	91,8
J487_2	88,85	WT_2	
J487_3	13,43	WT_3	82,59
J487_4	29,62	WT_4	91,33
J487_5	40,09	WT_5	
J487_6	25,18	WT_6	89,14
J487_7		WT_7	
J487_8	19,06	WT_8	92,43
J487_9	80,04	WT_9	87,55
J487_10	78,57	WT_10	95,84
J487_11	97,23	WT_11	69,26
J487_12	69,5	WT_12	
J487_13	23,02	WT_13	89,54
J487_14	12,3	WT_14	52,88
J487_15	10,42	WT_15	37,25
J487_16		WT_16	80,1
J487_17	83,2	WT_17	76,04
J487_18	80,93	WT_18	89,11
J487_19	93,55	WT_19	92,62
J487_20	92,37	WT_20	66,93
J487_21	23,6	WT_21	86,6
J487_22	62,85	WT_22	77,81
J487_23	16,95	WT_23	31,49
J487_24	72,29	WT_24	81,89
J487_25		WT_25	94,28
J487_26	78,01	WT_26	76,16
J487_27	76,68	WT_27	66,96
J487_28	75,26	WT_28	74,81
J487_29		WT_29	96,68
J487_30	93,29	WT_30	94,75
		WT_31	87,35
		WT_32	
		WT_33	95,59
		WT_34	96,31
		WT_35	
		WT_36	91,04
MW	55,84	MW	81,20
σM	31,94	σM	16,58

Anhang

Drittes Replikat von *GstA1_P::TaMlo*-RNAi-DH 3 (J487):

% Befallsfläche J487		% Befallsfläche WT	
Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J487_1	24,11	WT_1	47,36
J487_2	40,7	WT_2	18,89
J487_3	78,95	WT_3	40,65
J487_4	19,42	WT_4	65,3
J487_5	45,19	WT_5	89
J487_6		WT_6	97,04
J487_7		WT_7	98,05
J487_8	18,29	WT_8	32,95
J487_9	28,03	WT_9	26,57
J487_10	24,97	WT_10	
J487_11		WT_11	
J487_12	21,51	WT_12	90,91
J487_13	39,3	WT_13	41,81
J487_14	32,23	WT_14	97,83
J487_15	22,42	WT_15	29,52
J487_16	21,68	WT_16	
J487_17	26,81	WT_17	
J487_18	17,94	WT_18	37,39
J487_19	25,25	WT_19	94,63
J487_20	31,92	WT_20	39,05
J487_21	27,84	WT_21	40,2
J487_22	70,3	WT_22	24,24
J487_23	20,16	WT_23	99,17
J487_24	28,16	WT_24	28,49
J487_25	46,7	WT_25	28,71
J487_26	45,95	WT_26	35,03
J487_27	20,09	WT_27	52,28
J487_28	49,18	WT_28	29,11
J487_29	20,64	WT_29	
J487_30	34,64	WT_30	44,15
		WT_31	
		WT_32	91,05
		WT_33	54,98
		WT_34	23,02
		WT_35	22,77
		WT_36	81,84
MW	32,68	MW	53,40
σM	15,40	σM	28,49

Anhang

Erstes Replikat der azygoten DH-Linie (J469)

% Befallsfläche J469		% Befallsfläche WT	
Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J469_1	99,41	WT_1	67,07
J469_2	95,07	WT_2	93,67
J469_3		WT_3	79,39
J469_4		WT_4	69,24
J469_5	99,9	WT_5	72,12
J469_6		WT_6	61,14
J469_7		WT_7	47,84
J469_8	81,65	WT_8	68,68
J469_9	83,64	WT_9	55,46
J469_10	96,86	WT_10	99,89
J469_11		WT_11	98,45
J469_12	94,1	WT_12	78,61
J469_13		WT_13	91,33
J469_14		WT_14	84,78
J469_15		WT_15	87,67
J469_16		WT_16	79,86
J469_17		WT_17	77,87
J469_18	94,82	WT_18	88,19
J469_19		WT_19	87,21
J469_20	89,99	WT_20	79,08
J469_21	84,96	WT_21	69,1
J469_22	98,71	WT_22	59,78
J469_23	85,81	WT_23	78,82
J469_24		WT_24	96,11
J469_25		WT_25	95,47
J469_26	70,86	WT_26	75,5
J469_27		WT_27	83,16
J469_28	92,02	WT_28	
J469_29	85,37	WT_29	87,67
J469_30		WT_30	
MW	90,21133333	WT_31	
σ M	14,31473923	WT_32	
n	15	WT_33	
		WT_34	64,42
		WT_35	89,06
		WT_36	
		MW	78,888
		σ M	14,84697143

Anhang

Zweites Replikat der azygoten DH-Linie (J469)

% Befallsfläche J469		% Befallsfläche WT	
Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J469_1	88,06	WT_1	95,85
J469_2	91,06	WT_2	
J469_3	85,69	WT_3	95,56
J469_4	78,65	WT_4	90,96
J469_5	80,89	WT_5	85,41
J469_6		WT_6	
J469_7	88,79	WT_7	91,72
J469_8	95,32	WT_8	67,09
J469_9	95,82	WT_9	
J469_10	88,12	WT_10	74
J469_11		WT_11	74,72
J469_12	56,87	WT_12	75,16
J469_13	76,97	WT_13	99,34
J469_14		WT_14	89,68
J469_15	72,16	WT_15	91,81
J469_16	71,94	WT_16	82,55
J469_17	80,25	WT_17	85,96
J469_18		WT_18	
J469_19		WT_19	96,16
J469_20	100	WT_20	73,36
J469_21	97,17	WT_21	78,83
J469_22		WT_22	79,91
J469_23	92,79	WT_23	98,06
J469_24		WT_24	87,45
J469_25		WT_25	
J469_26		WT_26	80,73
J469_27	89,16	WT_27	83,75
J469_28	91,48	WT_28	
J469_29	96,94	WT_29	90,13
J469_30	95,35	WT_30	90,29
MW	86,35619048	WT_31	88,72
SD	10,65216291	WT_32	95,15
MD	8,326621315	WT_33	85,78
n	21	WT_34	94,62
		WT_35	95,94
		WT_36	96,33
		MW	87,16733333
		SD	8,564190456
		MD	7,061688889

Anhang

Drittes Replikat der azygoten DH-Linie (J469)

J469 / WJDL5.4		WT / WJDL5.4	
% Befallsfläche J469		% Befallsfläche WT	
Individuum	Anfälligkeit	Individuum	Anfälligkeit
J469_1	99,87	WT_1	95,97
J469_2	71,09	WT_2	39,64
J469_3	61,69	WT_3	80,76
J469_4	92,54	WT_4	90,43
J469_5		WT_5	85,41
J469_6	65,75	WT_6	49,25
J469_7	87,33	WT_7	96,19
J469_8	47,75	WT_8	23,71
J469_9	66,74	WT_9	99,89
J469_10	99,92	WT_10	93,99
J469_11	67,83	WT_11	85,44
J469_12	91,94	WT_12	54,24
J469_13	99,57	WT_13	60,7
J469_14	99,28	WT_14	100
J469_15	99,8	WT_15	62,49
J469_16	78,58	WT_16	87,22
J469_17	100	WT_17	75,1
J469_18	67,46	WT_18	93,91
J469_19	95,78	WT_19	97,52
J469_20	95,99	WT_20	99,97
J469_21	100	WT_21	86,96
J469_22	79,57	WT_22	92,94
J469_23	62,5	WT_23	88,24
J469_24	66,44	WT_24	100
J469_25	92,06	WT_25	86,12
J469_26	52,9	WT_26	
J469_27	91,27	WT_27	45,39
J469_28	84,61	WT_28	99,63
J469_29	84,69	WT_29	93,78
J469_30	87,22	WT_30	80,22
MW	82,41965517	WT_31	72,94
SD	15,99	WT_32	82,89
MD	13,84	WT_33	99,35
n	29	WT_34	75,39
		WT_35	94,28
		WT_36	94,27
		MW	81,84
		SD	19,54
		MD	14,98

Anhang

Messwerte der real-time RT-PCR:

Probe Mlo Primer	CT	Quantität
J445 Epidermis	19.032.686	1,4637
	18.564.724	2,0650
	18.090.622	2,9263
	18.975.079	1,5271
	18.797.258	1,7404
J469 Epidermis	17.508.657	4,4892
	17.134.613	5,9105
	17.171.130	5,7539
	17.509.918	4,4851
	17.215.500	5,5692
J470 Epidermis	17.805.086	3,6100
	17.821.783	3,5659
	17.733.189	3,8060
	17.939.184	3,2710
	17.938.627	3,2723
J487 Epidermis	18.086.266	2,9357
	17.923.843	3,3081
	18.149.525	2,8022
	18.068.993	2,9732
	17.920.736	3,3157
WT Epidermis	19.839.020	0,8090168
	20.071.627	0,6818257
	19.867.067	0,7925021
	19.965.658	0,7370805
	19.692.146	0,9012853
J445 Restblatt	23.107.836	0,0731215
	23.214.420	0,0676093
	22.969.719	0,0809382
	22.831.420	0,0896024
	22.128.735	0,1502194
J469 Restblatt	20.644.579	0,4474023
	20.730.906	0,4198841
	20.909.868	0,3681093
	20.519.062	0,4906623
	20.463.308	0,5111966
J470 Restblatt	21.521.927	0,2346999
	20.976.576	0,3504882
	20.984.770	0,3483827

Anhang

	21.491.575	0,2399970
	20.934.723	0,3614426
J487 Restblatt	21.749.630	0,1985157
	21.528.490	0,2335699
	21.838.600	0,1859438
	21.476.862	0,2426077
	21.420.525	0,2528693
WT Restblatt	22.943.730	0,0824999
	23.030.983	0,0773728
	22.734.608	0,0962138
	2.318.269	0,0692054
	22.160.728	0,1467265
	-	cycles/log decade
Slope	31.313.124	
Y-Intercept		19.550.806
R ²		0.9924639

Anhang

Probe GAPDH Primer	CT	Quantität
J445 Epidermis	16.929.731	0,6941
	16.844.791	0,7359
	16.943.780	0,6874
	16.886.278	0,7152
	16.843.302	0,7367
J469 Epidermis	16.710.253	0,8075
	16.680.466	0,8242
	16.596.443	0,8734
	16.716.050	0,8073
	16.546.879	0,9038
J470 Epidermis	16.678.453	0,8254
	16.491.674	0,9388
	16.659.565	0,8362
	16.551.450	0,9009
	16.539.198	0,9086
J487 Epidermis	16.454.554	0,9632
	16.402.136	0,9986
	16.308.783	1,0650
	16.436.707	0,9751
	16.242.847	1,1146
WT Epidermis	16.945.894	0,6863743
	16.761.337	0,7795291
	16.812.430	0,7525428
	16.897.686	0,7095752
	16.945.967	0,6863399
J445 Restblatt	17.011.162	0,6561673
	16.872.375	0,7220686
	16.868.605	0,7239487
	17.000.113	0,6611859
	16.891.937	0,7123937
J469 Restblatt	17.526.950	0,4597749
	17.457.811	0,4822267
	17.479.692	0,4750051
	17.556.534	0,4504906
	17.459.087	0,4818026
J470 Restblatt	16.977.726	0,6714721
	16.965.899	0,6769710
	16.959.180	0,6801143
	17.076.073	0,6274440

Anhang

	16.954.521	0,6823031
J487 Restblatt	17.854.458	0,3668285
	17.789.110	0,3837368
	17.647.305	0,4231571
	17.672.960	0,4157365
	17.495.987	0,4696977
WT Restblatt	17.170.727	0,5877976
	17.029.175	0,6480671
	17.079.767	0,6258475
	17.333.832	0,5252679
	16.975.788	0,6723700
	-	cycles/log decade
Slope	33.391.051	
Y-Intercept		16.400.154
R ²		0.99546117

Danksagung

Herrn Dr. Jochen Kumlehn möchte ich für die Bereitstellung des Themas, die guten Arbeitsmöglichkeiten und die fachliche Diskussion danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen für die Tätigkeit als Referenten in der Durchführung der Dissertation.

Herrn Dr. habil. Patrick Schweizer danke ich für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Diskussion und für seine Tätigkeit als Korreferent.

Herrn Prof. Dr. Maiss danke ich für die Übernahme der Tätigkeit als Drittprüfer bei der Durchführung der Dissertation.

Dr. Ralph Panstruga danke ich für die Bereitstellung des Transformationsvektors „*GstA1_P::TaMlo-RNAi*“, der für die Transformation der Pflanzen verwendet wurde, auf die diese Arbeit basiert.

Für die Durchführung der Transformation von Pflanzen mittels Partikelbombardement möchte ich mich bei Dr. Alok Varshney ganz herzlich bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei Frau Heike Büchner für ihre hervorragende technische Hilfe bedanken.

Herrn Dr. Uwe Zierold, Frau Dr. Isolde Saalbach, Dr. Axel Himmelbach sowie Dr. Götz Hensel danke ich für die praktische als auch theoretische Unterstützung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dipl. Biol. Christine Kastner und Dr. Carolin Berger für zahlreiche Denkanstöße und ihre stetige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie bin ich zu besonderem Dank für ihre stete Hilfsbereitschaft, der freundlichen Aufnahme in die Gruppe und dem netten Arbeitsklima verpflichtet.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich immer in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Sabine (Butzo), die alle Höhen und Tiefen miterleben durfte.

Lebenslauf

Lebenslauf

Vor- und Zuname: Jan Hendrik Riechen

Adresse: Stobenstr. 24
06484 Quedlinburg

Geburtsdatum: 25.02.1979

Geburtsort: Lübeck

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Ausbildung:

08.85 - 07.89 Besuch der Gerhardt-Hauptmann-Grundschule in Stockelsdorf

08.89 - 06.99 Besuch des „Gymnasium Am Mühlenberg“ in Bad Schwartau

02.07.1999 Abitur

08.99 - 06.00 Zivildienst im "Begegnungszentrum Wilhelmine Possehl" in Bad Schwartau

10.00 - 08.04 Studium der Biologie an der CAU Kiel

08.04 - 07.05 Diplomarbeit im Biochemischen Institut der CAU Kiel

Titel: Einfluss der Matrixmetalloproteinase-19 auf Endothelzellen

08.05 - 11.05 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Biochemischen Institut an der CAU Kiel

Ab 12.05 Wissenschaftlicher Mitarbeiter IPK Gatersleben

Erklärung

Erklärung zur Dissertation

gemäß §6 (1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel:

„Etablierung einer Mehлтаuresistenz in Weizen durch Suppression von MLO“

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie
gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig
angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere
Prüfungsarbeit verwendet.

Gatersleben, 15. Juli 2011

Jan Hendrik Riechen