

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit handelt von Stress bei Pflanzen, Stress der in diesem Fall von dem obligat biotrophen Pathogen, dem Verursacher des Echten Mehltaus an Gerste (*Blumeria graminis* hordei) verursacht wird. Das charakteristische durch den Echten Mehltau verursachte Schadbild, dem der Mehltau seinen Namen verdankt, ist ein dichter weißer Belag aus Myzel und massiv produzierten, mehlig rieselnden Konidiosporen auf der Sprosssepidermis der befallenen Pflanzen. Echter Mehltau verursacht einen enormen wirtschaftlichen Schaden. Bis zu 10% der Ernteaufträge bei Gerste werden auf Mehltau zurückgeführt (Jørgensen 1994). Neben der wirtschaftlichen Bedeutung des Pathosystems, handelt es sich bei Gerste und Mehltau um eines der bestuntersuchteten Pflanze-Pathogen-Interaktionssysteme überhaupt.

Pflanzen reagieren auf Pathogene mit der Ausbildung verschiedenster Abwehrmechanismen, die sich unter anderem auf transkriptioneller Ebene zeigen. Einleitend wurde das Abwehrsystem von Pflanzen im Allgemeinen (Kapitel 1.1) und das im Rahmen der Arbeit verwendete Modellsystem *Blumeria* und Gerste betrachtet (Kapitel 1.2). Fokussiert wurde dabei auf die papillenassoziierte *mlo*-vermittelte Resistenz in Gerste, welche in der vorliegenden Arbeit auf transkriptioneller Ebene näher untersucht wurde (Kapitel 1.3). Da mit der Erstellung der HO-cDNA-Bank und der Untersuchung des Transkriptom grundlegende Ressourcen für die Genomforschung im Pathosystem Gerste und Mehltau geschaffen wurden, wurde ein umfassenderes Kapitel über die Genomforschung in Gerste in die Einleitung integriert (Kapitel 1.4).

1.1 Das Abwehrsystem der Pflanzen

Neben den präformierten Abwehrmechanismen (Kutikula, Enzyminhibitoren, Sekundärmetabolite, etc.) existiert bei Pflanzen ein dem angeborenen Immunsystem der Säuger (*innate immunity system*) (Medzhitov und Janeway 1997), ähnelndes aktives Abwehrsystem. Ein spezifisches Immunsystem, wie es von Wirbeltieren bekannt ist, existiert hingegen nicht. Basis des Abwehrsystems ist die Fähigkeit zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu unterscheiden. Verantwortlich hierfür sind Rezeptoren des Wirtes, die sogenannte Elizitoren erkennen. Elizitoren sind Moleküle, die vom eindringenden Organismus abgegeben werden oder die

durch Abbau pflanzlicher Substanz entstehen. Sie lassen sich in spezifische und allgemeine Elizitoren unterscheiden. Interessanterweise wurden in Pflanzen Elizitoren und Rezeptoren gefunden, die denen der Tiere ähneln (Nürnberger und Brunner 2002; Panstruga und Schulze-Lefert 2003). Wie bei der inflammatorischen Reaktion bei Tieren kommt es auch in Pflanzen zu einer Reihe von Abwehrreaktionen. So wurde die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reaktive oxygen species*) (Hückelhoven und Kogel 2003) und die Akkumulation von Stickstoffmonoxid (NO) gezeigt (Wendehenne *et al.* 2004). Weiterhin kommt es zur hypersensitiven Reaktion (HR), die Parallelen zur Apoptose in tierischen Zellen aufweist (Lam *et al.* 2001). Auch die Signalweitergabe durch MAPK-Kaskaden (*mitogen activated protein kinases cascades*) (Zhang und Liu 2001) und Bildung von Phytoalexinen (Hammerschmidt und Kagan 2001) sind typische Abwehrreaktionen. Die Zellwand, ein charakteristisches Merkmal von pflanzlichen Zellen, kann nach Pathogenbefall durch Abgabe von extrazellulären Substanzen, wie zum Beispiel Kallose (Jacobs *et al.* 2003) und Lignin (von Röpenack *et al.* 1998) verstärkt werden. Für die Signalübertragung bei der Pathogenabwehr in Pflanzen werden verschiedene, sich zum Teil überlagernde Signalwege diskutiert in denen Signalmoleküle wie Jasmonsäure (JA), Ethylen oder Salizylsäure (SA) eine wichtige Rolle spielen (Conrath *et al.* 2002).

Pflanzen werden in Bezug auf Pathogene in Wirtspflanzen und Nichtwirtspflanzen eingeteilt. Pflanzliche Resistenzen werden dementsprechend in Nichtwirtsresistenzen und Wirtsresistenzen unterschieden. Mit Nichtwirtsresistenz wird die Tatsache bezeichnet, dass Pflanzenarten generell von der großen Mehrzahl verschiedenster Mikroorganismen nicht befallen werden. Dies ist natürlich die häufigste Form der pflanzlichen Resistenz. Nichtwirtsresistenz basiert auf präformierten Abwehrbarrieren oder, wie die Wirtsresistenz, auf induzierbaren Abwehrmechanismen (Mysore und Ryu 2004). Demgegenüber steht die Wirtsresistenz (Basiskompatibilität) gegenüber Mikroorganismen: Wirtspflanzenarten werden je nach Varietät oder Rasse der Pflanze und des Mikroorganismus befallen bzw. sind resistent. Bei den bekannten R-Gen vermittelten Resistenzen handelt es sich um derartige Wirtsresistenzen (McDowell und Woffenden 2003).

1.1.1 Pathogenerkennung

Neben der Erkennung durch physikalische Veränderungen der Pflanzenzellen während des Befallsprozesses, erkennen Pflanzen Pathogene durch Signalmoleküle, die als Elizitoren bezeichnet werden. Elizitoren stimulieren die Pathogenabwehr über eine Reihe von Signalkaskaden. Molekulare und physiologische Funktionen von Elizitoren sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Elizitorstrukturen sind (Glyko)Proteine, Peptide und Kohlenhydrate, die einzig in verschiedenen Pathogenen, nicht aber in der Pflanze vorkommen. Es kann sich auch um spezifische Abbauprodukte handeln, die nur durch Interaktion mit Pathogenen entstehen (Nürnberger und Scheel 2001). Elizitoren lassen sich in spezifische und unspezifische Elizitoren unterscheiden, wobei es sich im ersten Fall um Produkte von *Avr*-Genen (*Avirulenz-Genen*) der Pathogene handelt, auf die im Kapitel 1.1.3 „R-Gen-vermittelte Resistenz“ eingegangen wird.

1.1.2 Unspezifische Elizitoren

Typische, aus der pilzlichen Zellwand bekannte, unspezifische Elizitoren, sind Peptidoglycane aus grampositiven Bakterien, das bakterielle Geißelprotein Flagellin, Chitinfragmente, Mannane, Ergosterol und Proteine (Boller und Keen 1999). Eine Reihe dieser Substanzen wurden sowohl in Pflanzen als auch in Tieren beschrieben. Unspezifische

Elizitoren, die im Wirt nicht vorkommende molekulare Muster aufweisen, für das Pathogen essentiell und für ganze Pathogengattungen charakteristisch sind, werden im Vergleich mit dem angeborenen Immunsystem der Tiere als PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*) bezeichnet (Medzhitov und Janeway 1997).

Ein gut untersuchter unspezifischer Elizitor mit typischen PAMP-Merkmalen ist PEP13, ein internes Peptidfragment eines Glycoproteins (42 kDa), das für eine kalziumabhängige Transglutaminase kodiert und aus der Zellwand von *Phytophthora sojae* isoliert wurde. Das auf Arten der Gattung *Phytophthora* beschränkte Motiv PEP13 induziert zahlreiche Abwehrgene und Phytoalexine in Zellen der Nichtwirtspflanzen Petersilie und Kartoffel (Nürnberger und Brunner 2002).

Weitere prominente Beispiele von Elizitoren mit PAMP-Struktur sind das bakterielle Flagellin flg 22 (Zipfel *et al.* 2004) und pilzliches Chitin (Ramonell *et al.* 2002). Kohlenhydratmoleküle (Schweizer *et al.* 2000) bzw. Cutinmonomere wurden ebenfalls beschrieben (Schweizer *et al.* 1996). Während zahlreiche hochaffine Bindungsstellen für PAMPs (zum Beispiel Elizitine, Chitin, PEP13, Hepta- β -glukosid) beschrieben wurden (Nürnberger und Brunner 2002), ist nur ein molekular charakterisierter PAMP-Rezeptor bekannt. Dieser mit FLS2 bezeichnete Rezeptor erkennt Flagellin. FLS2 ist eine transmembrane Rezeptorkinase mit externer LRR-Domäne (*leucin rich repeat*, Leucin reiche Wiederholung) und cytosolischer Serin-Threonin-Kinase-Domäne, die dem R-Protein Xa21 aus Reis ähnelt (Gomez-Gomez *et al.* 2001). Die Signalweitergabe des FLS2 Rezeptors erfolgt in einer MAPK-Kaskade (Asai *et al.* 2002) und mündet beim intakten Rezeptor in der Induktion von zahlreichen Abwehrgenen (Zipfel *et al.* 2004). Möglicherweise erfolgt die Signalübertragung bei PAMP-Rezeptoren ähnlich wie bei R-Proteinen (siehe GUARD-Hypothese).

1.1.3 Spezifische Elizitoren und R-Protein-vermittelte Resistenz

R-Proteine, die Produkte der R-Gene, vermitteln kultivarspezifische Wirtsresistenz gegenüber einer ganzen Reihe von Krankheiten, die von Bakterien, Viren, Pilzen und Nematoden ausgelöst werden. Die genetische Basis des Phänomens der R-Gen vermittelten Resistenz wurde von Flor, nach Untersuchungen des Pathosystems Flachs und Flachsrost (*Melampsora lini*) erkannt und mit der Gen-für-Gen Hypothese beschrieben (Flor 1971). Die Gen-für-Gen Hypothese besagt, dass es zu jedem Resistenzgen (*R-Gen*) der Pflanze ein Avirulenzgen (*Avr-Gen*) des Pathogens gibt (korrespondierende Gene). Fehlt eines der beiden Gene bzw. Genprodukte kommt es zur Besiedelung der Pflanze. Biochemisch betrachtet ergibt sich daraus folgendes hypothetisches Szenario. AVR-Proteine (spezifische Elizitoren) werden vom Pathogen abgegeben und von sogenannten R-Proteinen, die sich an der Zelloberfläche bzw. im Zellinneren befinden, erkannt.

Durch molekularbiologische Ansätze konnte die Struktur, Lokalisation und Funktion der R-Proteine teilweise aufgeklärt werden. Es wurde gezeigt, dass R-Proteine im Zytoplasma oder in der Zellmembran lokalisiert sind (Schulze-Lefert und Vogel 2000). Die große Mehrzahl der R-Gen-Allele kodiert für NBS-LRR-Proteine (*nucleotide-binding-site-leucin rich-repeat-proteins*) die eine Nukleotid-Bindungsstelle und eine Wiederholung von leucinhaltenen Motiven aufweisen. Das charakteristischste Merkmal von LRRs ist, dass sie als Protein-Protein- oder Protein-Kohlenhydrat-Interaktionsstellen funktionieren (Kobe und Deisenhofer 1994). NBS-LRR-Proteine haben unterschiedliche N-terminale Enden, entweder einen CC-Anhang (*coiled-coil-Anhang*) oder eine Domäne des Toll-Rezeptors aus *Drosophila* beziehungsweise des aus Säugern bekannten IL-1 Rezeptors. Derartige Rezeptoren werden auch als TIR-Rezeptoren (*Toll/Interleukin 1 resistance domain*) bezeichnet.

Aufgrund ihrer Struktur lassen sich R-Gene in fünf Gruppen einteilen. Gut untersuchte NBS-LRR-Proteine aus *Arabidopsis* sind zum Beispiel RPM1, das Resistenz gegen *Pseudomonas*

syringae und *Mi*, das Resistenz gegen Nematoden und Blattläuse vermittelt. Weitere charakteristische Vertreter von R-Proteinen sind *Pto* aus Tomate und *Xa21* aus Reis. Beide weisen eine Serin-Threonin-Kinase-Domäne auf, wobei *Xa21* im Gegensatz zu *Pto* eine Transmembrandomäne sowie einen LRR besitzt. Den R-Proteinen Cf-9 bzw. Cf-2 in Tomate fehlt dagegen die Serin-Threonin-Kinase, eine Transmembrandomäne sowie ein LRR sind vorhanden (Dangl und Jones 2001). Auch *Mla* aus Gerste, das Mehlauresistenz vermittelt, gehört wie die meisten R-Gene zur Gruppe der NBS-LRR-Proteine (Shen *et al.* 2003).

Durch die vollständigen Genomanalysen von Reis und *Arabidopsis* wurde bekannt, dass Pflanzen ein beträchtliches Arsenal an R-Genen aufweisen. So wurden in *Arabidopsis* ca. 130 und in Reis ca. 600 verschiedene R-Gene der NBS-LRR Gruppe gefunden. Während von den *Arabidopsis*-Genen 85 ein TIR Motiv aufwies, fehlt dieses in Reis (Goff *et al.* 2002).

Jedes R-Protein hat die Aufgabe, ein AVR-Signal zu erkennen und *downstream*-Komponenten zu aktivieren, die letztlich die Abwehrreaktion der Pflanze auslösen. Das einfachste Modell für das Zusammenspiel zwischen dem intrazellulär bzw. membranständig lokalisierten R-Protein und dem AVR-Protein ist eine direkte Interaktion (Ligand-Rezeptor-Modell) (Bent 1996). Obwohl in *in vitro* Studien von wenigen R/AVR Paaren gezeigt werden konnte, dass dies geschieht (die PTO-Kinase der Tomate interagiert direkt mit dem AVR-PTO-Protein von *P. syringae* (Pedley und Martin 2003); ein AVR-PITA/PITA-Komplex entsteht bei der Interaktion von Reis und *Magnaporthe grisea* (Jia *et al.* 2000)), ist es unwahrscheinlich, dass AVR- und R-Proteine allein für die Erkennung und Signalübertragung stehen, da in zahlreichen detaillierten Untersuchungen von anderen AVR-R-Paaren keine direkte Interaktion gefunden werden konnte.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen gibt die Guard-Hypothese. Danach existieren im Wirt sogenannte Virulenz-Targets, an welche die AVR-Proteine zunächst binden. Durch Konformationsänderung werden die Virulenz-Target-AVR-Komplexe aktiviert. Diese Komplexe wirken als Elizitoren sortenspezifischer Resistenzreaktionen, die von R-Proteinen erkannt werden (Van der Hoorn *et al.* 2002). Die Guard-Hypothese konnte durch Untersuchungen in verschiedenen Pflanze-Pathogen-Interaktionen erhärtet werden. Van der Hoorn *et al.* (2002) zeigen 9 R-Protein-Komplexe, die nach der Guard-Hypothese zu funktionieren scheinen (zum Beispiel Cf-2/Rcr3/Avr2 sowie RPM1/RIN4AvrRPM1).

Wie genau Signale nach der Erkennung durch R-Gene bzw. PAMP-Rezeptoren weitergegeben werden, kann noch nicht schlüssig erklärt werden. Möglicherweise ähneln PAMP-Rezeptoren den R-Gen-Rezeptoren, wie für den FLG2-Rezeptor und die LRR-Rezeptorkinase *Xa21* aus Reis gezeigt werden konnte. (Gomez-Gomez *et al.* 2001). Offensichtlich ist, dass sich die Abwehrreaktionen, die durch unspezifische Elizitoren bzw. AVR-Proteine ausgelöst werden, stark ähneln, wenngleich erstere selten HR auslösen (Mysore und Ryu 2004).

1.1.4 Reaktionen der Pflanze nach Pathogenkontakt

Eine der frühesten pflanzlichen Reaktionen auf ein Pathogen ist die Öffnung spezifischer Ionenkanäle, die zur Depolarisation der Plasmamembran und zum Influx von Kalziumionen und zum Efflux von Kalium- und Chloridionen führt. Der Kalzium-Ioneneinfluss scheint für die Bildung von ROS notwendig zu sein (Scheel 1998). Es kommt zur Aktivierung von MAPK (Asai *et al.* 2002) und Phytooxylin-Kaskaden (Blee 2002). Der Pathogenerkennung folgen eine Reihe von Abwehrreaktionen der Pflanze. Im Mittelpunkt der Forschung stehen dabei die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (siehe Kapitel 1.1.5), die hypersensitive Reaktion (siehe Kapitel 1.1.6), die Verstärkung der Zellwand durch extrazelluläre Substanzen wie zum Beispiel Kallose (Jacobs *et al.* 2003) und Lignin (von Röpenack *et al.* 1998), die Bildung von Phytoalexinen (Hammerschmidt und Kagan 2001) und die Akkumulation von

PR-Proteinen, die mit den zuvor genannten Phänomenen in Zusammenhang steht (siehe Kapitel 1.1.4.3). Induzierte Resistenz (SAR, *systemic acquired resistance* und ISR, *induced systemic resistance*, siehe Kapitel 1.1.4.4), Suberisation (Bolwell *et al.* 1997), Hydroxyprolin reiche Glykoproteine (HRGPs, *hydroxyprolin rich glycoproteins*) (Raggi 2000) und die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO, *nitric oxide*) (Wendehenne *et al.* 2004) sind weitere untersuchte Phänomene.

1.1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Die schnelle Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Wasserstoffperoxid: H₂O₂, Superoxidradikale: O₂⁻ und freie Hydroxylradikale: OH[·]) nach Kontakt mit einem pflanzlichen oder tierischen Pathogen wird als oxidativer Ausbruch (*oxidative burst*) bezeichnet. Verantwortlich dafür ist möglicherweise eine NADPH-Oxidase (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase), die durch Depolarisation der Plasmamembran aktiviert wird. Die frühen aktiven ROS dienen möglicherweise als *Second-Messenger* für das Auslösen der HR und weiterer Abwehrreaktionen. ROS werden als Auslöser von SAR diskutiert, sind möglicherweise direkt toxisch für das Pathogen und sind an der Verstärkung der Zellwand durch Insolubilisieren und Quervernetzen (*crosslinken*) von Zellwandproteinen beteiligt (Wojtaszek 1997; Keller und Feuillet 2000; Hückelhoven und Kogel 2003).

1.1.4.2 Hypersensitive Reaktion

Die hypersensitive Reaktion (*hypersensitive response*, hypersensitiver Zelltod, HR) ist ein Abwehrmechanismus von Pflanzen, der sich nach Infektion mit Pilzen, Bakterien oder Viren ereignet. An der Infektionsstelle sterben Zellen bzw. stirbt Gewebe ab, und es erscheinen manchmal braune, makroskopisch sichtbare Flecken. In einzelnen Zellen ist die HR nur mikroskopisch zu beobachten. Es wird angenommen, dass durch die HR das Wachstum und die Ausbreitung des Pathogens eingedämmt wird. Der Mechanismus der HR ähnelt dem apoptotischen Zelltod in Tieren, der sich beispielsweise durch Fragmentierung von DNA oder Anhäufung apoptotischer Zellkörper zeigt. Die HR-vermittelte Resistenz wird nach den Regeln der Gen-für-Gen Hypothese monogenetisch vererbt, wie aus der Untersuchung einer Reihe von Pflanzen/Pathogen-Interaktionen hervorging (Thordal-Christensen *et al.* 1997; Gilchrist 1998). Viele bekannte R-Gene vermitteln HR-Resistenz.

1.1.4.3 Induktion von pathogenassoziierten Genen

In der vorliegenden Arbeit werden Gene, deren Transkripte nach Kontakt mit einem Pathogen bzw. einem Elizitor verstärkt akkumulieren (induzierte Gene) bzw. verschwinden (reprimierte Gene), mit dem Term pathogenregulierte Gene bezeichnet. Gene, die mit Resistenz bzw. Anfälligkeit assoziiert sind werden als resistenzassoziierte bzw. anfälligkeitsassoziierte Gene beschrieben. Andere aus der Literatur bekannte Bezeichnungen für Abwehrgene sind „*pathogen-responsive-genes*“, „*defence-responsive-genes*“ oder „*defence-related-genes*“. Eine ursprünglich identifizierte Kollektion von pathogenassoziierten Genen wurde mit dem Begriff „PR-Gene“ (*pathogenesis-related-genes*) bezeichnet und genauer untersucht. PR-Gene kodieren beispielsweise für Enzyme, welche die pilzliche Zellwand abbauen, für antimikrobiell wirkende Polypeptide, für Komponenten aus Signalübertragungskaskaden, für β -1-3-Glucanasen, Chitinasen, Peroxidasen, Defensine, Thionine, Lipid-Transfer-Proteine

und Proteine mit unbekannter Funktion. Insgesamt wurden 19 Familien von PR-Proteinen vorgeschlagen (Van Loon und Van Strien 1999).

Weitaus umfangreicher ist ein kürzlich erschienener Übersichtsartikel, in dem 113 Abwehrfamilien aus Pflanzen beschrieben werden (Rushton und Somssich 1998). Dazu zählen Gene, die für Enzyme kodieren, die Primär- und Sekundärmetabolismus verbinden (zum Beispiel Shikimat- und Phenylpropanoidstoffwechselweg), an der Bildung von phenolischen, antimikrobiell wirkenden Substanzen beteiligt sind (Phytoalexinen, Lignine) sowie eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und Hydrolasen, die mit verschiedenen Stoffwechselwegen verbunden sind.

Durch *large scale* Transkriptomanalysen, wie beispielsweise in der vorliegenden Arbeit für die Interaktion von *Bgh* und *mlo*-resistenter Gerste beschrieben, erhöht sich die Zahl pathogenregulierter Gene in Pilz-Pflanze-Interaktionen beträchtlich und geht weit über die bisher beschriebenen pathogenassoziierten Gene und Genfamilien hinaus (siehe auch 1.4.3.1 und Diskussion Kapitel 4.2)

1.1.4.4 Induzierte Resistenz

Während sich die beschriebenen Formen der Signalweitergabe auf die Zelle beschränken, existiert bei Pflanzen ein weiterer Abwehrmechanismus, der zu Resistenz in benachbarten Geweben bzw. der gesamten Pflanze führt und als induzierte Resistenz bezeichnet wird. Induzierte Resistenz kann lokal oder systemisch (SAR) wirken und wurde vor allem in den dikotyledonen Pflanzen Tabak, *Arabidopsis* und Gurke sehr gut untersucht. Bei der Signalübertragung scheint Salizylsäure eine entscheidende Rolle zu spielen. Das systemisch wandernde Signal bei der Ausbreitung der SAR konnte aber bisher nicht gefunden werden. Durch SAR werden zahlreiche Abwehrgene induziert (Willits und Ryals 1998). SAR ist ein unspezifisches Phänomen, das heißt Resistenz gegen ein Pathogen ist durch verschiedene inkompatible Pathogene induzierbar. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Abwehrreaktion der Pflanzen ähnlich dem angeborenen Immunsystem der Tiere funktioniert. Der Effekt der induzierbaren Resistenz kann auch durch nicht pathogene Bakterien der Rhizosphäre und Mykorrhizapilze ausgelöst werden. Eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung spielen hier die Pflanzenhormone Ethylen und Jasmonsäure. Induzierte Resistenz die durch Ethylen bzw. Jasmonsäure vermittelt wird und die nicht durch die Akkumulation von Abwehrgenen begleitet ist, wurde auch als ISR (*induced systemic resistance*) bezeichnet (Pieterse *et al.* 1998; Verhagen *et al.* 2004).

1.2 Die Interaktion zwischen Gerste und *Blumeria graminis*

Das Pathosystem Gerste und Gerstenmehltau (*Blumeria graminis*) stellt eine typische Interaktion zwischen einem obligat biotroph lebenden phytopathogenen Pilz und seiner Wirtspflanze dar und ist heute eines der wichtigsten Modellsysteme bei der Erforschung von Pflanzenkrankheiten. Umfangreiche Forschungsergebnisse zu Morphologie, Physiologie, Zytologie, Verbreitung, Molekularbiologie und Resistenzzüchtung wurden im Laufe von Jahrzehnten erarbeitet.

1.2.1 Die Kulturpflanze Gerste

Die Gerste (*Hordeum vulgare*) ist die am frühesten kultivierte Getreideart und leitet sich von der Wildform *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* ab. Ursprünglich kommt die Gerste aus dem vorderasiatischen Raum, wie aus der Analyse von DNA-Fragmentmustern hervorgeht. Heute gedeiht Gerste vorwiegend im gemäßigten Klima, aber auch in den Subtropen und den Hochländern der Tropen. Gerste ist eine monokotyledone, diploide und selbstbefruchtende Pflanze und gehört zur Familie der Gräser (Poaceae). Zusammen mit Weizen (*Triticum*), Roggen (*Secale*) und einigen weiteren Gräsern zählt Gerste zu dem Tribus Triticeae. Es gibt Sommer- und Wintergerstensorten, welche sich in Vegetationsdauer und Temperaturansprüchen unterscheiden. Sommergerste wird im Frühjahr gesät, benötigt etwa 95 Tage bis zur Reifung und ist daher auch für den Anbau im hohen Norden geeignet. Wintergerste wird schon im vorjährigen Herbst gesät, hat eine längere Vegetationsdauer und ist allgemein für wärmere Regionen geeignet. Weltweit steht Gerste, nach Weizen, Reis und Mais, an vierter Stelle aller landwirtschaftlich genutzten Fruchtarten. In Deutschland ist Gerste, nach Weizen, die wichtigste Getreideart. Sommer- als auch Wintergerste werden nebeneinander angebaut. Gerste wird als Futtermittel in der Geflügel- und Schweinemast (Wintergerste), als Nahrungsmittel (Fladenbrot, Graupen, Grütze) und als Braugerste beim Bierbrauen verwendet (Sommergerste) (Franke 1997).

1.2.2 Die Echten Mehltaupilze

Blumeria graminis, der Echte Mehltau der Gerste, ist eine von ca. 650 Arten der Echten Mehltaupilze (Erysiphales), die in sieben Gattungen (*Blumeria*, *Erysiphe*, *Leveillula*, *Microsphaera*, *Podosphaera*, *Spaerotheca* und *Uncinula*) eingeteilt werden. Zur Gattung *Blumeria* gehört nur eine Art mit acht Formae speciales (*f.sp.*). Die Getreidearten befallenden *f.sp.* sind *avenae* an Hafer (*Avena*), *hordei* an Gerste (*Hordei*), *secalis* an Roggen (*Secalis*) und *tritici* an Weizen (*Tritici*). Weitere vier *f.sp.* befallen Wildgräser. Die Echten Mehltaupilze sind auf Blütenpflanzen spezialisiert und in der Regel sehr wirtsspezifisch. Bis auf die kürzlich beschriebene Gattung *Blumeria*, die in Europa auf ca. 45 Gräsergattungen vorkommt, zählen ausschließlich dikotyle Angiospermen zu den Wirtspflanzen (Braun 1995; Wyand und Brown 2003).

1.2.3 Resistenzen in Gerste

Die Gerste wird, wie alle anderen untersuchten Pflanzen auch, von den meisten potentiellen Pathogenen (zum Beispiel *Blumeria graminis f.sp. tritici*, *Bgt*) nicht befallen, was als Nichtwirtsresistenz bezeichnet wird und worauf an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll. Andererseits sind Pathogene (Bakterien, Viren und Pilze) bekannt, die Krankheiten auslösen und gegenüber denen Wirtsresistenzen bestehen. Neben *Bgh* werden Pilzkrankheiten der Gerste vor allem durch die Pathogene *Bipolaris sorokina*, *Pyrenophora graminea*, *Ustilago nuda*, *Ustilago hordei*, *Drechslera graminea*, *Drechslera teres*, *Rhynchosporium secalis*, *Fusarium spec.* und *Puccinia graminis* ausgelöst (Brandenburger 1985).

Aus der Züchtungsforschung sind zahlreiche klassische rassenspezifische R-Gene gegen verschiedene Gerstenpathogene bekannt, die nach der Gen-für-Gen Hypothese vererbt werden. Im Pathosystem Gerste und *Bgh* sind dies derzeit 85 R-Gene die sich auf 10 Loci verteilen (Jørgensen 1994), die beispielsweise mit *Mla*, *MLK*, *MLH* und *MLG* bezeichnet wurden (Abbildung 1.1). Die R-Gene wurden entweder von der Wildgerste *Hordeum vulgare* ssp.

spontaneum oder aus anderen resistenten Gerstensorten eingekreuzt. Einkreuzt in resistente Sorten finden rassenspezifische R-Gene in der Landwirtschaft Anwendung. Charakteristisch an rassenspezifischer Resistenz ist, dass sie teilweise bereits nach kurzer Zeit (*Mlg* ca. 10 Jahre, *Rph12* zwei Jahre) durch neue Pathogenrassen evolutionär überwunden wird (Deising *et al.* 2002).

Einige dieser R-Gen spezifischen Loci bzw. R-Gene wurden auf molekularer Ebene näher untersucht. Am besten untersucht ist der *Mla-Locus* an welchem 32 verschiedene Gene auf Chromosom 5 (1H) beschrieben wurden (Jørgensen 1994). Der *Mla-Locus* wurde mittels *map-based-cloning* kloniert und sequenziert, dabei wurden 11 verschiedene Gene die sich in drei verschiedene Gruppen homologer Gene aufteilen, aber von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, gefunden (Wei *et al.* 1999; Wei *et al.* 2002; Shen *et al.* 2003). Gemeinsames Strukturmerkmal dieser Gene ist das CC-NBS-LRR-Motiv.

Einige *Mla*-Resistenzen sind von den *downstream*-Komponenten RAR1 und SGT1 des SCF-Ubiquitin-Ligase Komplexes abhängig (Azevedo *et al.* 2002). Höchstwahrscheinlich sind die MLA- als auch das RAR1 Proteine im Cytoplasma lokalisiert. Durch *site directed mutagenesis* konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Abhängigkeit von RAR1 durch einen einzigen AS-Austausch bewirkt wird (Haltermann und Wise 2004)

Mla-vermittelte Resistenz ist mit HR gekoppelt, die sich in der betroffenen Epidermiszelle bzw. in den darunterliegenden Mesophyllzellen ereignet. Beispielsweise vermittelt *Mla1*, *Mla6* und *Mla13* schnelle und absolute Resistenz, wobei andere wie zum Beispiel *Mla7*, *Mla10* und *Mla12* eine intermediäre Resistenz vermitteln (Caldo *et al.* 2004). Während es bei den *Mla*-vermittelten rassenspezifischen Resistenzen zumindest zur ansatzweisen Ausbildung eines Haustoriums kommt, kann der Pilz bei der *Mlg*-vermittelten Resistenz die Zelle nicht penetrieren (Gorg *et al.* 1993). In der epidermalen Zelle ereignet sich die HR. Die *Mlg*-vermittelte Resistenz ähnelt der Mehлтаuresistenz die durch den chemischen *Inducer* DCINA (2,6-Dichlorisonikotinsäure) ausgelöst wird (Kogel *et al.* 1994). Die Funktion einiger *Mla*-vermittelter Resistenzen ist an *Rar1* und *Rar2* gekoppelt, die von *Mlg*-vermittelten Resistenzen jedoch nicht.

Durch *map-based-cloning* wurde ein weiteres R-Gen (*Rpg1*) der Gerste kloniert, welches Resistenz gegenüber den meisten Pathotypen von *Puccinia graminis* (Schwarzrost) vermittelt. Hierbei handelt es sich um ein membrangebundenes Rezeptorprotein. *Rpg1* ist ein *single copy* Gen und kodiert für eine S-Rezeptor-Kinase (*membran spanning serine-threonine-kinase*), die strukturelle Ähnlichkeit zu den aus Tomate bekannten *Pto*-Gen aufweist (Staples 2003). Kürzlich wurde die anfällige Gerstenlinie Golden Promise mit *Rpg1* transformiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Resistenz durch dieses eine *single copy* Gen vermittelt wird (Horvath *et al.* 2003). Weiterhin wird derzeit versucht, das *Rph7*-Gen, das Resistenz gegen *Puccinia hordei* (Scherrer *et al.* 2004), das *Rdg2*-Gen, das Resistenz gegen *Pyrenophora graminea* (Bulgarelli *et al.* 2004) und das *Rh2*-Gen, das Resistenz gegen *Rhynchosporium secalis* (Röder, persönliche Mitteilung) vermittelt, zu klonieren.

Eine Ausnahme von den oben beschriebenen dominant oder semidominant vererbbaaren, rassenspezifischen Resistenzen der Gerste bildet die sogenannte rezessiv vererbbaare, *mlo*-vermittelte Breitbandresistenz (siehe Kapitel 1.3 *mlo*-vermittelte Resistenz). Gemeinsame *downstream*-Komponenten von *Mla*-vermittelter und *mlo*-vermittelter Resistenz sind bisher nicht bekannt.

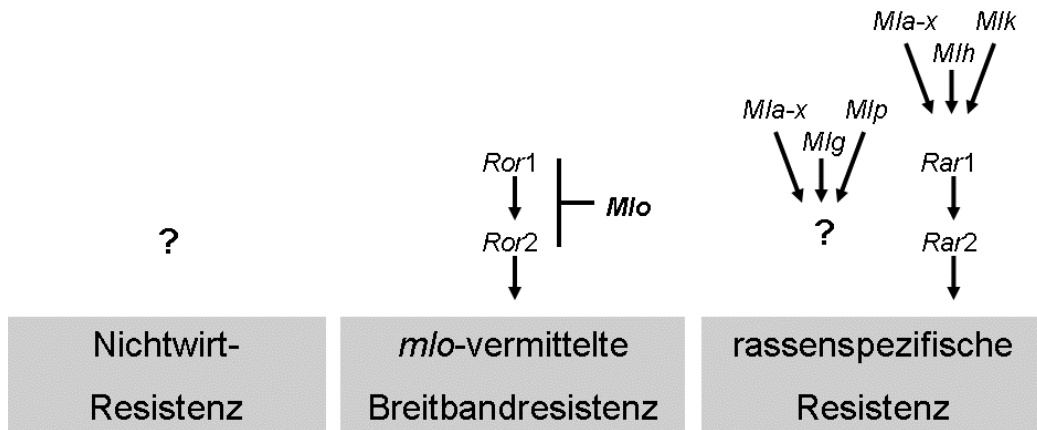


Abbildung 1.1: Mehltauresistenzen in Gerste. Mindestens zwei unabhängige Wege führen in Gerste zu rassenspezifischer Resistenz. (*Mla*-vermittelte Resistenz). Die *mlo*-vermittelte Resistenz wirkt dagegen gegen alle Pathotypen des Mehltaus (nach Schulze-Lefert und Vogel, 2000)

1.2.4 Entwicklung von *Blumeria graminis* auf Gerste

Der Entwicklungszyklus von *Blumeria* kann in einen asexuellen und einen sexuellen unterteilt werden (Abbildung 1.2; 1.3), wobei der für diese Arbeit relevante asexuelle Zyklus hier genauer betrachtet werden soll (Abbildung 1.4). Die Entwicklung von *Bgh* ist auf die Epidermis beschränkt.

Während einer Epidemie im Feld verbreitet sich der Mehltau mit Hilfe von Konidiosporen, die über relativ weite Entfernungen durch den Wind transportiert werden (Limpert et al., 1999). Im Labor werden die Pflanzen künstlich inokuliert, wobei viele Konidien gleichzeitig auf den Blättern auftreffen. Die Entwicklung des Pilzes erfolgt dabei relativ synchron.



Abbildung 1.2: Die asexuelle Erscheinungsform gibt dem Mehltau seinen Namen, die Pflanze erscheint wie mit Mehl überpudert (links). Ursache hierfür ist ein dichter weißer Belag aus hyalinem Myzel und Konidienträgern mit Konidien auf der Blattepidermis. Typisches Merkmal für die sexuelle Erscheinungsform sind die schwarzen kugelförmigen Fruchtkörper, die als Cleistothecien bezeichnet werden (rechts).

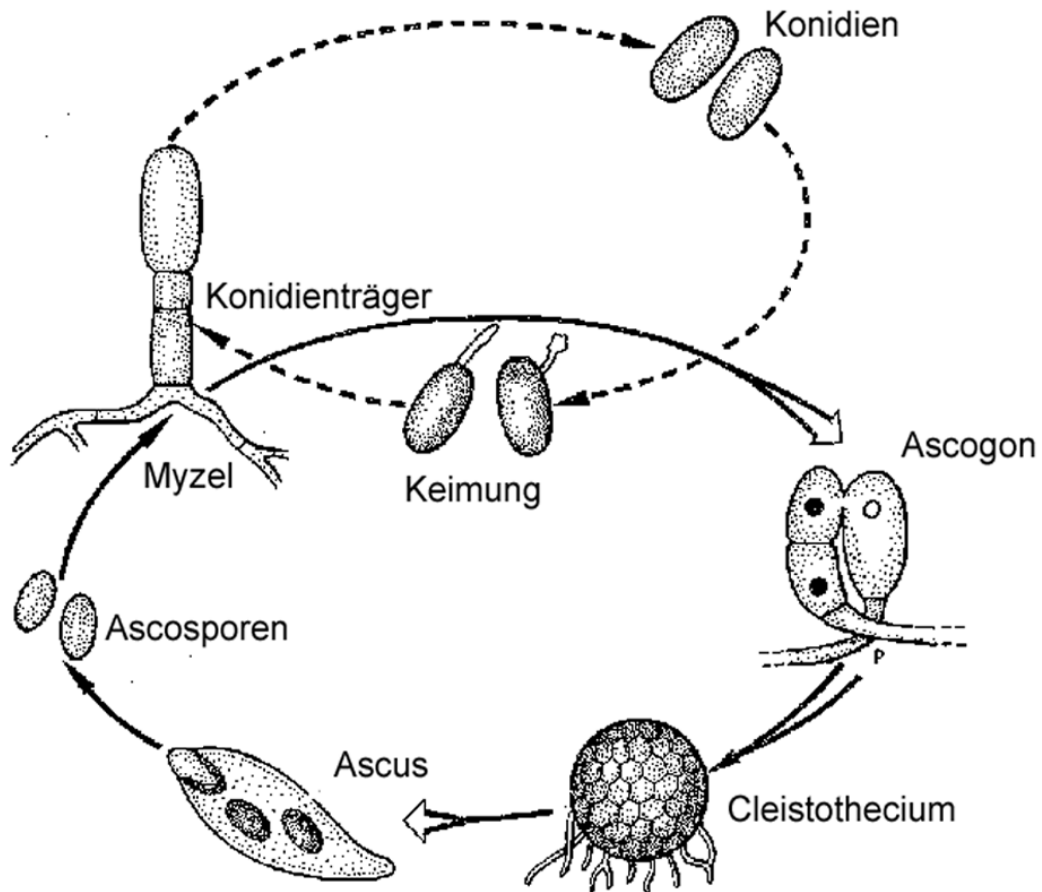
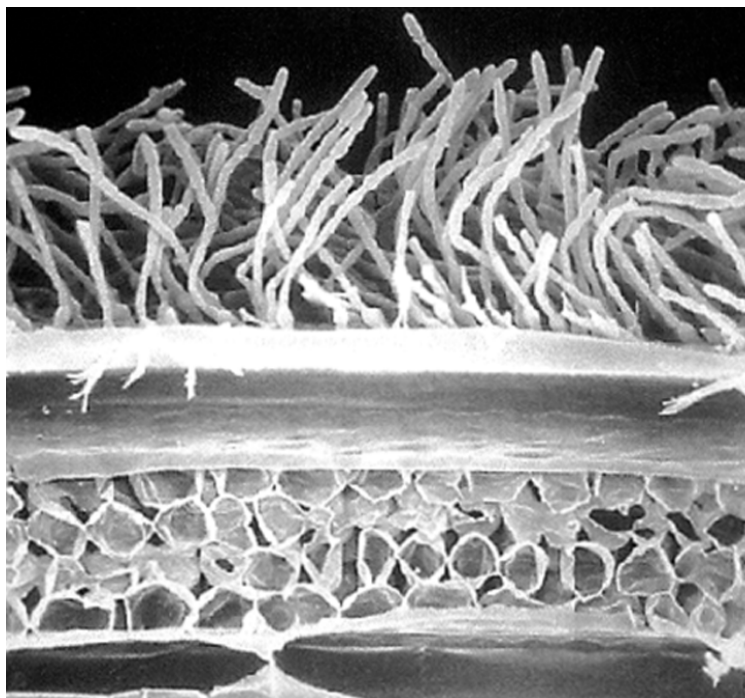


Abbildung 1.3: Der asexuelle und der sexuelle Entwicklungszyklus von *Blumeria graminis*. Nach dem Zusammentreffen zweier Hyphen bilden sich die Ascomata. Die Ascosporen liegen in den sogenannten Ascis (Schläuchen) (Abbildung: Uwe Braun, 1985).



Konidienträger
mit Konidien

Epidermiszelle
mit Haustorien

Mesophyllzellen

Abbildung 1.4: Der asexuelle Entwicklungszyklus ist auf die Epidermis des Blattes beschränkt, wie in dem Längsschnitt durch ein mehltreubefallenes Blatt (120 hpi) zu erkennen ist (Foto: Schweizer und Dudler 1999).

Nach dem Auftreffen des Konidiums auf die Blattoberfläche sondert dieses eine Flüssigkeit ab, die mit dem Abbau epikutikulärer Wachskristalle assoziiert ist. Ein bis zwei Stunden später bildet sich der primäre Keimschlauch aus, eine Struktur, die nur bei der Gattung *Blumeria* bekannt ist. Dieser durchdringt die Zellwand mit einer Penetrationshyphale, dann hört die weitere Entwicklung auf. Zweck und Funktion des primären Keimschlauchs ist möglicherweise die Aufnahme von Kutinmonomeren, niedermolekularen Substanzen und Wasser. Aufgrund der Tatsache, dass ausschließlich Mehltaupilze der Gattung *Blumeria* einen primären Keimschlauch besitzen und die Verbreitung der asexuellen Form des Pilzes bei Trockenheit erfolgen kann, wird vermutet, dass vom Konidium über den primären Keimschlauch Wasser aufgenommen werden kann. Von Nachteil für den Pilz dürfte die Induktion von Abwehrmechanismen sein, die bereits durch den primären Keimschlauch ausgelöst werden (Thordal-Christensen *et al.* 1999; Green *et al.* 2002).

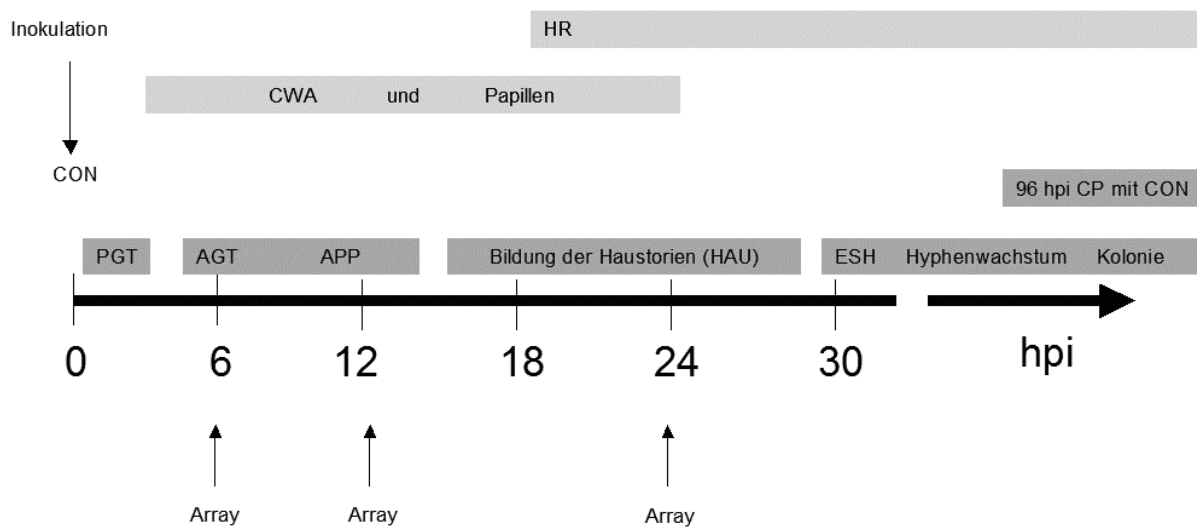


Abbildung 1.5: Der Asexuelle Entwicklungszyklus von *Bgh* (dunkelgrau unterlegt). Ein bis zwei Stunden nach der Inokulation (hpi) bildet sich der primäre Keimschlauch. 4 hpi entsteht der appressoriale Keimschlauch an dessen Ende nach 9 Stunden ein Appressorium (Anhaftungsorgan) entsteht. Danach wird die Zellwand, durch eine Kombination von Turgordruck und Zellwandhydrolyse, durchbrochen und das Haustorium wird ausgebildet. Das führt zur Einstülpung der Plasmamembran. Ab ca. 28 hpi sind die Haustorien reif und es bilden sich elongierende, sekundäre Hyphen. Dies ist der Startpunkt für die Kolonieentwicklung. Mit der Bildung von Konidien und Konidiophoren schließt sich der asexuelle Zyklus. Je nach Abwehrstrategie der Pflanze (hellgrau unterlegt) bilden die Gerstenpflanzen Papillen oder reagieren mit HR, was zu Resistenz führen kann. AGT: appressorialer Keimschlauch; APP: Appressorien; CON: Konidien; CP: Konidiophoren; CWA: Zellwandablagerungen (Papillen); ESH: elongierende sekundäre Hyphen; HAU: Haustorien; HR: hypersensitive Reaktion; PGT: primärer Keimschlauch

Das Haustorium entsteht 12 bis 22 Stunden nach der Inokulation (hpi). Es stülpt das pflanzliche Plasmalemma so ein, dass es den haustorialen Komplex gegen das pflanzliche Zytoplasma hin abschließt. Die pilzliche innenliegende und die, lichtmikroskopisch wesentlich dicker erscheinende, pflanzliche außenliegende Membran (extrahaustoriale Membran) liegen eng beieinander und umschließen die extrahaustoriale Matrix. Die erfolgreiche Etablierung der Haustorien wird von sekundären elongierenden Hyphen an der Blattoberfläche begleitet. Ab diesem Schritt ist die Entstehung von Kolonien wahrscheinlich. 96 Stunden nach dem Auftreffen der Konidiosporen auf die Blattoberfläche bilden sich neue Konidiosporen an aufrecht stehenden Konidienträgern. Der asexuelle Zyklus ist geschlossen (Thordal-Christensen *et al.* 1999; Green *et al.* 2002).

Die sexuelle Entwicklung des Pilzes beginnt mit zunehmender Seneszenz des Pflanzengewebes unterhalb alternder Myzelien. Hierbei entstehen aus befruchteten Ascogonien Cleistothecien (geschlossene Fruchtkörper von Ascomyzeten), die aus einem dichten Geflecht von Hyphen bestehen. Reife Cleistothecien enthalten ca. 25 diploide Asci mit jeweils 8 haploiden Ascosporen. Die Ascosporen werden durch Aufquellen herausgeschleudert. Die Cleistothecien werden nicht wie bei anderen Gattungen der Erysiphales im Herbst, sondern im Sommer gebildet. Möglicherweise geschieht dies, um die Trockenperiode zu überbrücken (Braun 1995).

1.2.5 Physiologie, Genexpression und Enzyme in *Blumeria graminis*

Von *Blumeria graminis*, dem pilzlichen Partner der Interaktion, sind bisher nur wenige Informationen zu Proteinmustern und Genexpression vorhanden, da die Präparation von brauchbarem Material aus appressorialen und haustorialen Stadien, die sich auf der Wirtspflanze entwickeln, sehr schwierig ist. Expressionsstudien von pilzlichen Genen mit abgezogener inokulierter Epidermis wurden bisher nicht durchgeführt. Gleichwohl existieren cDNA-Banken, die aus Material von nicht gekeimten Konidien, gekeimten Konidien und Appressorien, die auf künstlichem Untergrund (Zellulosemembran) wuchsen, präpariert wurden. Von diesen cDNA-Banken wurden 4.908 ESTs erstellt und analysiert, wobei 1.669 Gene beschrieben wurden (Thomas *et al.* 2001). Außerdem wurde dieses Material in einer SAGE Analyse (*serial analysis of gene expression*) untersucht, wobei Daten produziert wurden, die frühe Veränderungen der Transkriptabundanzen pilzlicher Gene bei der Infektion der Pflanze zeigen (Thomas *et al.* 2002). Eine genetische Karte von *Bgh* wurde erstellt (Pedersen *et al.* 2002). Weiterhin wurden in *Blumeria* Gene gefunden, die nur in pathogenen, filamentösen Pilzen vorkommen und die mit Egh16H bezeichnet wurden. Egh16H-Gene bilden eine 10 Mitglieder zählende Genfamilie und werden im Penetrationsstadium und während der Entwicklung der Haustorien exprimiert (Grell *et al.* 2003).

Auf Proteinebene wurden in den Konidien von *Bgh* mittels IEF (isoelektrische Fokussierung) die Enzyme Malat-Dehydrogenase, Phosphoglucanat-Dehydrogenase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Esterasen, saure Phosphatase, Triose-Phosphat-Isomerase, Glucose-Phosphat-Isomerase und NADH-Diaphorase nachgewiesen (Koch und Kohler 1991). Außerdem wurde ein löslicher Kohlenhydrat-Elizitor gefunden, der im Entwicklungsstadium vor der Penetration der Pflanze von den Konidien abgegeben wird (Schweizer *et al.* 2000). AVR-Gene bzw. AVR-Proteine von *Blumeria* konnten bisher nicht beschrieben werden.

1.2.6 Antwort der Gerste nach Inokulation mit *Blumeria graminis*

Prinzipiell werden zwei verschiedene, sich überlagernde, Abwehrstrategien von Gerste gegenüber *Blumeria graminis* postuliert: die Papillenbildung und die HR. Mittels immunologischer Techniken, Enzymaktivitätsmessungen und Transkriptanalysen wurden zahlreiche Gene bzw. Substanzen gefunden, die durch *Bgh* induziert werden und die entweder allgemein mit Stress oder spezifischer mit Papillenbildung, HR, Resistenz, Anfälligkeit oder mit der Entwicklung des Pilzes assoziiert wurden.

1.2.6.1 Frühe zelluläre Ereignisse

Infolge der Inokulation von Gerste mit *Bgh* sind sehr früh zytologische Veränderungen in den Epidermiszellen sichtbar. Vier Stunden nach Inokulation kommt es zur Akkumulation von

Zytoplasmaaggregaten unterhalb der pilzlichen Strukturen. Außerdem wandern die Zellkerne, die ursprünglich zentral liegen, unter die Interaktionsstellen der Keimschläuche und vergrößern ihr Volumen um das Doppelte. Dabei verdoppeln sich ebenfalls die Kern-DNA-Gehalte. Die Wanderung des Zellkerns ist begleitet von einer Umordnung der Zytoskelett-Mikrotubuli und Veränderungen der Chromatin-Struktur (Zeyen *et al.* 2002).

1.2.6.2 Papillenbildung

Die Papillen (*CWA, cell wall apposition*) sind Zellwandverdickungen, die nach Auftreffen des Konidiums auf der Blattoberfläche unterhalb des primären Keimschlauches bzw. des entstehenden Appressoriums, auf der Innenseite der äußeren Epidermiszellwand entstehen. Die Entwicklung des Pilzes kann in der Papille gestoppt werden, oder die Penetration ist erfolgreich. Nach der Penetration entsteht in der Papille ein sogenannter Collar (Hals), in dem sich die „*neck region*“ des Haustoriums bildet. Es wird postuliert, dass die Papillen eine physikalische Barriere gegenüber dem Pathogen darstellen und dessen Wachstum abbremsen.

In den Papillen und den umgebenden Halos (Höfen) konnte eine große Anzahl von akkumulierten Substanzen nachgewiesen werden. Hauptbestandteil der Papillen ist Kallose. Kallose ist ein Cellulose ähnliches Polymer, bestehend aus β -1-3-verknüpften Glucan-Resten, dessen Synthese durch biotischen sowie abiotischen Stress induzierbar ist (Zeyen *et al.* 2002). Eine eindeutige resistenzvermittelnde Rolle von Kallose konnte bisher nicht gezeigt werden (Jacobs *et al.* 2003). Es wird vermutet, dass Kallose ausschließlich als Matrixmaterial dient (Zeyen *et al.* 2002). Charakteristisch für die Papillen ist die Bildung von Wasserstoffperoxid, wie mit einer DAB-Färbung von Gerstenblattabschnitten gezeigt werden konnte (Thordal-Christensen *et al.* 1997). Außerdem wurden in den Papillen hydrolytische Enzyme sowie eine Peroxidase gefunden (Zeyen *et al.* 2002). Neben seiner Funktion als Signalmolekül könnte Wasserstoffperoxid an der Quervernetzung von Proteinen und der Polymerisation von Phenolen zu ligninolytischen Verbindungen beteiligt sein (Thordal-Christensen *et al.* 1997). Allerdings ist noch unklar, ob tatsächlich Lignin in den Papillen von Gerste vorkommt. Lignin konnte in Weizenpapillen, nicht aber in Gerstenpapillen nachgewiesen werden (Wei *et al.* 1994). Die Anreicherung von Silizium in den Papillen wurde ebenfalls gezeigt. Obwohl Hydrokulturen von Gerste mit steigenden Siliziumgehalten erhöhte Resistenz gegenüber *Bgh* zeigen, korrelieren hohe Siliziumgehalte in den Papillen nicht mit der Resistenz (Zeyen *et al.* 2002). Die Papillenbildung ist ein charakteristisches Merkmal, der in der vorliegenden Arbeit untersuchten, *mlo*-vermittelten Resistenz.

1.2.6.3 Hypersensitive Reaktion

Die Hypersensitive Reaktion (HR, hypersensitive response) ist ein pflanzlicher Abwehrmechanismus, der bei rassenspezifischer Resistenz in Gerste gegen *Bgh* wirksam wird. Die HR setzt erst nach dem Durchbruch der Papillen bzw. nach der Entstehung der Haustorien ein. Abhängig vom R-Gen sterben bei der HR einzelne epidermale Zellen (*Single-Cell-HR*) bzw. ganze Bereiche im Mesophyll (*necrotic lesion, Multi-Cell-HR*). Mit *Single-Cell-HR* und *Multi-Cell-HR* werden minimale und maximale Ausprägungen der HR beschrieben. Dazwischen liegen diverse Abstufungen. Die *Single-Cell-HR* wird 15-24 Stunden nach der Penetration durch die Penetrationshyphe ausgelöst. Die Entwicklung des Haustoriums erreicht hierbei höchstens das Stadium des Zentralzylinders. Bei der *Multi-Cell-HR* entstehen zunächst Haustorien, danach sterben die Mesophyllzellen unterhalb der befallenen Epidermiszelle ab. Inwieweit die HR bei der *mlo*-vermittelten Resistenz eine Rolle spielt ist unklar. Nachdem die Entwicklung des Pilzes aufgehört hat, kommt es hierbei zu einer

späten hypersensitiven Reaktion im Mesophyllgewebe (Thordal-Christensen *et al.* 1997; Hückelhoven und Kogel 2003).

1.2.7 Induzierte Resistenz in Gerste

In Monokotyledonen, speziell in Getreiden, ist im Vergleich zu Dikotyledonen bisher nur sehr wenig über das Phänomen der induzierten Resistenz bekannt. Ouchi *et al.* (1976) konnten im Pathosystem Gerste und *Bgh* zeigen, dass Anfälligkeit gegenüber einer ursprünglich inkompatiblen Rasse oder Resistenz gegenüber einer ursprünglich kompatiblen Rasse, durch vorherige Inokulation mit der kompatiblen bzw. der inkompatiblen Rasse induziert werden kann. SAR im engeren Sinn konnte im Pathosystem Gerste und *Bgh* bisher nicht gezeigt werden. Ebenso konnten keine steigenden Salizylsäuregehalte nach *Bgh*-Befall bzw. unterschiedliche Gehalte in den Genotypen *mlo/Mlo* gefunden werden (Hückelhoven *et al.* 1999). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Applikation der Salizylsäureanaloge 2,6-Dichlorisonicotinsäure (DCINA) und Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester (BTH) die Pflanzen vor einer Infektion mit *Bgh* schützt. Dieses Phänomen wurde als chemisch induzierte Resistenz beschrieben und führt gleichzeitig zur Expression eines Sets chemisch induzierter Gene (Kogel *et al.* 1995). Ein weiteres Resultat im Zusammenhang mit induzierter Resistenz sind erhöhte Gehalte von Jasmonsäure bei gleichzeitiger Induktion von Abwehrgenen in Reiskeimlingen nach Verwundung (Schweizer *et al.* 1998).

1.2.8 Expression von pathogenregulierten Komponenten der Gerste

Bis heute sind im Pathosystem *Bgh* und Gerste ca. 50 Gene bzw. mRNA Transkripte des Wirtes beschrieben, die mit der Abwehr bzw. mit Anpassung bei der erfolgreichen Besiedlung assoziiert sind. Eine gute Zusammenfassung geben Collinge *et al.* (2002). Der Verlauf der Transkription von pathogenregulierten Komponenten der Gerste erfolgt prinzipiell in zwei Phasen: In der ersten Phase 2-6 hpi akkumulieren Transkripte als Antwort auf den Kontakt mit dem primären Keimschlauch und in der zweiten Phase akkumulieren Transkripte als Antwort auf die Penetrationsversuche des appressorialen Keimschlauches (12-24 hpi). Ein weiteres Maximum von pathogenregulierten Transkripten bildet sich drei bis fünf Tage nach Inokulation (Boyd *et al.* 1994; Clark *et al.* 1995). Es wurde versucht, Gene HR- sowie papillenvermittelter Resistenz und Gene die mit Anfälligkeit assoziiert sind, zu unterscheiden (Thordal-Christensen *et al.* 1999).

Zunächst zu den Genen, die für klassifizierte PR-Proteine (Collinge *et al.* 2002) kodieren: In Gerstebältern wurden bisher die PR-Proteine PR-1; PR-2 (β -1-3-Glucanasen); PR-3 (Chitinasen); PR-4 (biochemische Funktion unklar); PR-5 (Thaumatococcus ähnliche Proteine, biochemische Funktion unklar); PR-9 (Peroxisomen); PR-13 (Thionine) und PR-14 (Lipid Transfer Proteine) nach Inokulation mit *Blumeria graminis* gefunden.

Als PR-17 wurden die Transkripte BH6-12 und BH6-17 beschrieben (Gregersen *et al.* 1997). WCI-5 ist ein PR17-Homolog, welches aus Weizen bekannt ist (Schweizer *et al.* 1999). Bisher konnte die biochemische Funktion nicht aufgeklärt werden. Die Transkripte kodieren für Proteine mit N-terminalen Signalpeptiden, die in den Apoplasten sekretiert werden (Okushima *et al.* 2000).

Ebenfalls induziert sind Transkripte von Oxalat-Oxidase und einem Germin-ähnlichen Protein (HvGLP4) mit Mangan-Superoxid-Dismutase-Aktivität (Christensen *et al.* 2004). HvGLP4 wird mit strukturellen Veränderungen in Zusammenhang gebracht und ist ausschließlich in der Epidermis exprimiert (Wei *et al.* 1998).

14-3-3 Proteine und Endoplasmin (GRP94, *endoplasmic heat shock protein*) sind regulatorische Proteine, die nach Befall mit *Bgh* induziert sind (Gregersen *et al.* 1997). 14-3-3 Proteine sind epidermisspezifisch exprimiert, besitzen ein Molekulargewicht von 30 kDa und bilden Homo oder Heterodimere. In Pflanzen sind sie an der Bindung und Aktivierung der Plasmamembran H⁺-ATPase beteiligt. GPR94 ist ein molekulares Chaperon (Roberts 2003).

Blumeria-induzierte Transkripte, die den ersten Schritt bei der Bildung von Phenylpropansäuren katalysieren, kodieren auch für Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) (Boyd *et al.* 1995). Von einem der PAL-Gene ist bekannt, dass es bereits 0,5 hpi induziert wird (Shiraishi *et al.* 1995). Möglicherweise spielt es eine Rolle bei der Signalweitergabe nach Erkennung von *Bgh*. Weitere induzierte Transkripte aus dem Sekundärstoffwechsel, die möglicherweise mit der Bildung von Flavonoiden oder der Bildung von ligninartigen Substanzen im Zusammenhang stehen, sind eine Chalcone-Synthase (CHS) (Gregersen *et al.* 1997) und Flavonoid- bzw. Kaffeesäure-O-Methyltransferasen (COMT) (Christensen *et al.* 1998).

Neben der Induktion zahlreicher mRNA-Transkripte von Genen diverser Stoffwechselwege sind in Gerste auch einige niedermolekulare Komponenten beschrieben, die mit Pathogenbefall assoziiert sind. Hierbei handelt es sich um die Stoffklassen der Hordatine (Hordatin, p-Cumaroylagmatin, p-Cumaroylhydroxyagmatin), der Thionine und des Indolalalkaloids Gramin (Matsuo *et al.* 2001; Burhenne *et al.* 2003). Enzymaktivitätsmessungen im Apoplasten von Gerstenblättern ergeben außerdem erhöhte Gehalte von Ascorbat-Peroxidasen (APX) und Katalasen nach Inokulation mit *Bgh* (Vanacker *et al.* 1998).

1.2.9 Bedeutung des Pathosystems Echter Mehltau und Gerste

In der phytopathologischen Forschung existieren eine Reihe von Pflanze-Pathogen-Interaktionen mit Modellcharakter von unterschiedlicher wirtschaftlicher Bedeutung (zum Beispiel *Cladosporium vulvum* und Tomate, *Magnaporthe grisea* und Reis oder *Pseudomonas syringae* und *Arabidopsis*). Eines der wichtigsten Modellsysteme, das entscheidende experimentelle Vorteile aufweist, ist Gerste und *Bgh*.

Ursache dafür ist die Verfügbarkeit isogener Linien von Sorten mit rassenspezifischer Resistenz (zum Beispiel *Mla*) oder *mlo*-vermittelter Resistenz, ferner die schnelle, gleichmäßige und synchrone Entwicklung von *Bgh* (Konidien keimen synchron, Keimschläuche entwickeln sich in etwa gleicher Länge, Penetrationsversuche ereignen sich in einem definierten Zeitraum, kein zeitliches Überlappen der individuellen Entwicklungsstadien). Die Interaktion eignet sich auch sehr gut für mikroskopisch-morphologische Untersuchungen, da sich der Lebenszyklus auf die hyaline Epidermis beschränkt. Außerdem lässt sich die Epidermis sehr gut vom restlichen Gewebe abtrennen, was die separate Untersuchung dieses Gewebes ermöglicht. Mit der Erweiterung des Modellsystems auf *Arabidopsis* und das Wirtspathogen *Erysiphe cichoracearum* bzw. *Erysiphe cruciferarum* als auch das Nichtwirtspathogen *Bgh* sind vergleichende Untersuchungen vor allem auf molekularem Niveau sehr gut möglich (Somerville und Vogel 2002). Außerdem existiert ein etabliertes transientes Überexpressions- und TIGS-System (*transient induced gene silencing*), welches Genfunktionsanalysen in der Gerste-*Bgh*-Interaktion erlaubt (Panstruga 2004).

Nachteilig an dem Pathosystem ist, dass der Pilz aufgrund seiner obligat biotrophen Lebensweise nur auf Wirtspflanzen kultivierbar ist. Dadurch ist unter anderem die Mutantenforschung massiv erschwert. Ein weiterer Nachteil des Modells ist, dass das Genom der Gerste bisher nicht sequenziert wurde.

1.3 Die *mlo*-vermittelte Breitband-Resistenz

Das Fehlen von MLO führt zu Resistenz von Sommergerste gegenüber allen getesteten, natürlich vorkommenden *Bgh*-Isolaten. Dieses Phänomen wird als *mlo*-vermittelte Resistenz oder Breitband-Resistenz bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Grundlagen der *mlo*-vermittelten Resistenz untersucht. Im Gegensatz dazu steht die ebenfalls gut untersuchte rassenspezifische Resistenz. Die *mlo*-vermittelte Resistenz, die in der europäischen Gerstenzüchtung seit mehr als 20 Jahren genutzt wird, ist nach wie vor äußerst effektiv (Schulze-Lefert und Vogel 2000). Allerdings sind auch zwei Mehlausisolate bekannt, welche die *mlo*-vermittelte Resistenz durchbrechen können. Eines davon wurde im Labor mit dem Ziel einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *mlo*-resistenten Pflanzen selektiert, ein anderes ist ein Feldisolat aus Japan (Collins *et al.* 2002). Die *mlo*-vermittelte-Resistenz ist eine monogenetisch, rezessiv vererbare Resistenz, die nicht der Gen-für-Gen Hypothese entspricht. Entdeckt wurde das Phänomen während einer deutschen Exkursion in den Jahren 1937 bis 1938 in Äthiopien, bei der Gersten-Accessionen gesammelt wurden, die gegenüber allen getesteten *Bgh*-Isolaten resistent waren. Unabhängig davon wurden später EMS- und Röntgenbestrahlungs-Mutanten hergestellt, die eine ähnliche monogenetische Breitbandresistenz zeigten (Schulze-Lefert und Vogel 2000).

1.3.1 Der *mlo*-Resistenz-Phänotyp

Der offensichtliche Unterschied zwischen *mlo*- und *Mlo*- tragenden Gerstensorten ist die Resistenz bzw. Anfälligkeit gegenüber Mehltau. Während in *mlo*-resistenten Linien die Penetrationsraten auf unter 1% fallen, weisen *Mlo*-anfällige Gerstenlinien eine Penetrationseffizienz von 50-70% auf (Freialdenhoven *et al.* 1996). Lichtmikroskopisch betrachtet bleibt in *mlo*-resistenten Pflanzen die Entwicklung des Pilzes während des Penetrationsprozesses bzw. im prähaustorialen Stadium stehen und ist verbunden mit der verstärkten Bildung von Papillen. Weiterhin wurde in *mlo*-resistenten-Pflanzen verstärkte Neigung zu spontanen Zelltod im Mesophyllgewebe und beschleunigte Blattseneszenz (Wolter *et al.* 1993; Peterhänsel *et al.* 1997; Piffanelli *et al.* 2002), erhöhte Akkumulation von Chitinase-, Peroxidase- und PR-1- Transkripten (Peterhänsel *et al.* 1997) und erhöhte Akkumulation der phenolischen Substanz p-Cumaroylhydroxyagmatin (von Röpenack *et al.* 1998) gefunden. Außerdem wurden Ertragsminderungen im Vergleich zum Wildtyp in Feldversuchen beobachtet (Jørgensen 1992). Ein Merkmal *mlo*-resistenter Linien sind die größeren und schneller gebildeten Papillen, in denen Wasserstoffperoxid verstärkt akkumuliert. Dies wurde kürzlich mit einer wasserstoffperoxidnachweisenden *in situ* Färbung, bei der DAB (3,3'-Diaminobenzidine) als Substrat für wasserstoffperoxidkatalysierte Peroxidation von den Pflanzen aufgenommen wurde, gezeigt (Hückelhoven *et al.* 1999). Neben der Tatsache, dass Wasserstoffperoxid direkt toxisch auf Mikroorganismen wirken kann (Lamb und Dixon 1997), ist es möglicherweise an einem peroxidasekatalysierten *crosslinking* von Proteinen und ligninartigen Substanzen in den Papillen beteiligt.

1.3.2 Die Gen- und Protein Struktur von *Mlo* und *mlo*

Mlo wurde 1997 durch *map-based-cloning* isoliert. Es liegt auf Chromosom 4H im Gerstengenom. MLO ist ein 60 kDa großes Protein von 533 Aminosäuren mit sieben Transmembrandomänen und extrazellulären N-terminalen- und intrazellulären C-terminalen-Ende (Buschges *et al.* 1997) (Abbildung 1.6). Der intrazelluläre C-terminale-Schwanz ähnelt

G-Protein-gekoppelten Rezeptorproteinen (GCRP) (Devoto *et al.* 1999), ist aber wahrscheinlich nicht mit der *Mlo*-vermittelten Anfälligkeit in Zusammenhang zu bringen. Das MLO-Protein interagiert mit dem Kalziumsensor Calmodulin (Kim *et al.* 2002).

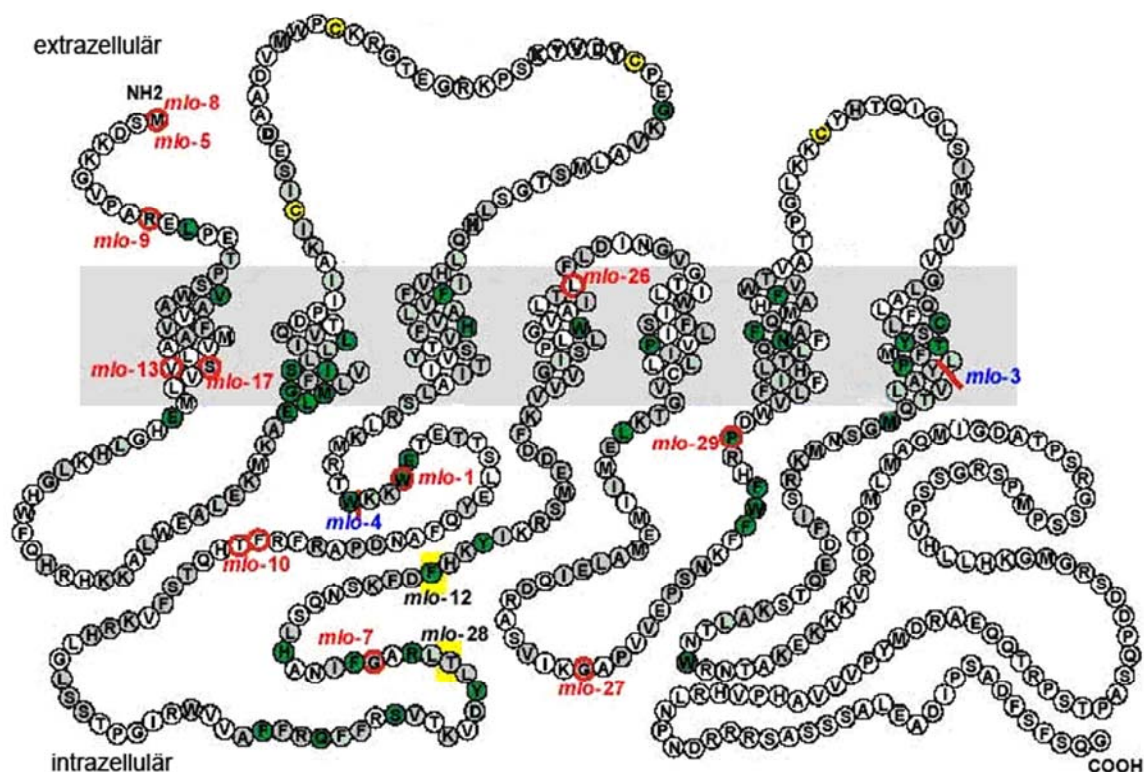


Abbildung 1.6: Topologie und Konservierung des Siebentransmembranproteins MLO. Die graue Fläche stellt die Plasmamembran dar. Grüne Kreise sind unveränderliche AS, hellgrüne sind konservative AS-Austausche (50% Identität), hellviolette sind nicht-konservative AS-Austausche und gelbe Kreise sind konservierte Cysteinreste, rote Umrandungen zeigen die Lokalisierung der Mutationsallele (Elliott 2003).

15 der 17 durch Einwirkung von EMS-, Nitrosomethylharnstoff, Natriumazid oder Röntgenstrahlung entstandenen, molekular charakterisierten Mutanten weisen totale Resistenz gegenüber *Bgh* auf (zum Beispiel *mlo5*), während nur zwei partielle Resistenz zeigen (*mlo12*, *mlo28*). Während einige der Mutationen höchstwahrscheinlich zum Abbruch der Translation führen (Totalmutanten), kommt es bei anderen zum einfachen Austausch von Aminosäuren. Bei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten isogenen Linie Ingrid *mlo5* befindet sich die Mutation am N-terminalen-Ende des Proteins. Das Protein wird also höchstwahrscheinlich nicht translatiert. Guanin wird durch Adenin ersetzt, wobei auf der Ebene der Aminosäuren Methionin durch Isoleucin ersetzt wird (Buschges *et al.* 1997; Piffanelli *et al.* 2002; Piffanelli *et al.* 2004).

Kürzlich wurde das MLO-Gen der einzig bekannten natürlich entstandenen Mutante „*mlo11*“ inklusive regulatorischer Bereiche sequenziert. Dabei konnte innerhalb des MLO-Gens keine Mutation gezeigt werden, wohl aber wurden komplexe tandemartige Wiederholungen in *upstream* liegenden regulatorischen Bereichen identifiziert. Die tandemartigen Wiederholungen bestehen aus 3,5 kb langen regulatorischen Bereichen und 1.1 kb langen kodierenden Sequenzen von *Mlo* (Piffanelli *et al.* 2004).

Auch in anderen monokotyledonen als auch in dikotyledonen Pflanzen existieren zahlreiche Homologe von *Mlo* (Devoto *et al.* 1999). In *Arabidopsis* wurden 15 und in Mais 9 paraloge Sequenzen, basierend auf den nahezu vollständig sequenzierten Genomen bzw. auf der Mais-EST-Datenbank der Firma DuPont, gezählt. Außerdem wurden in EST-Datenbanken vier sehr

ähnliche Sequenzen in Reis, drei in Weizen und zwei in Gerste gefunden (Devoto *et al.* 2003). Homologe von *Mlo* existieren an syntenischen Positionen in allen drei Genomen von hexaploiden Weizen (*Triticum aestivum*) und in Reis (*Oryza sativa*) (Elliott *et al.* 2002). Homologe in Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*Mus musculus*) oder Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) wurden nicht gefunden.

1.3.3 Die biologische Funktion von MLO

Die biologische Funktion des auf Pflanzen beschränkten Proteins MLO wird in zweierlei Kontexten diskutiert. Zum einen stellt sich die Frage, welche molekulare Funktion *mlo* in Bezug auf die Breitbandresistenz von Gerste gegenüber *Blumeria graminis* hat. Zum anderen stellt sich die Frage nach der allgemeinen biologischen Funktion, der in Monokotyledonen und Dikotyledonen vorkommenden, hochkonservierten, MLO-Proteinfamilie. Bisher waren Funktionen, die über die Regulation von Abwehrreaktionen in Gerste gegenüber Pathogenen hinausgehen, nicht bekannt. Kürzlich konnte aber mit *Arabidopsis mlo*-Mutanten in *AtMlo2* gezeigt werden, dass *mlo* auch in der Interaktion von *Arabidopsis* und Mehltau Resistenz vermittelt (Patent WO 98/04586, 2004).

Für das *Mlo*-Gen wurde als Funktion in Bezug auf Pathogenresistenz vorgeschlagen, dass es als negativer Regulator, das unkontrollierte Überschießen von Abwehrreaktionen und Zelltod bei Stress verhindert (Schulze-Lefert und Panstruga 2003). Diese Hypothese wurde durch Experimente, bei denen Gerstenblattabschnitte transient transformiert wurden, gestützt. Durch Überexpression von *Mlo* in Gerstenblattabschnitten des *Mlo*-Wildtyps wurde Überanfälligkeit auslöst (Kim *et al.* 2002). Das deutet darauf hin, dass MLO die Abwehrreaktionen nicht vollständig unterdrücken kann und vielmehr für eine Feinabstimmung der Pathogenabwehr verantwortlich ist. Möglicherweise limitiert *Mlo* auch die Dauer der Abwehrreaktion, wie aus Untersuchungen hervorgeht, bei denen die mRNA-Abundanzen von *Mlo* gemessen wurden. Drei Stunden nach Pathogenbefall (*Bgh*, *Magnaporthe grisea*) bzw. Stress (Verwundung, Paraquat-Behandlung, während Seneszenz) steigt die MLO und die *Mlo*-mRNA-Konzentration, des normalerweise relativ niedrig exprimierten *Mlo*-Gens stark an (Piffanelli *et al.* 2002). Ob MLO spezifische Abwehrreaktionen oder die räumliche Koordination von Abwehrreaktionen steuert ist noch unklar.

Die Tatsache, dass die Expression von *Mlo* auch von anderen Stressfaktoren beeinflusst wird, zeigt, dass MLO nicht ausschließlich für die Resistenz gegenüber Mehltau verantwortlich ist, sondern vielmehr weitere Stressantworten reguliert. Am C-terminalen-Ende von MLO aus Gerste konnte eine Calmodulinbindungsstelle identifiziert werden. Das Fehlen der CaM-Bindungsstelle in gezielten *Mlo*-Mutanten vermindert die negative Regulation von Abwehrreaktionen durch MLO. Durch transiente Expression von Calmodulin RNAi-Konstrukten in Blattsegmenten von *Mlo*-Pflanzen wurden diese weniger anfällig und nach Überexpression mehr anfällig gegenüber *Bgh* (Kim *et al.* 2002).

1.3.4 Downstream-Komponenten der *mlo*-Resistenz

Über einen genetischen Ansatz wurden zwei Gene die für die *mlo*-vermittelte Resistenz wichtig sind, *HvRor1* und *HvRor2* (*required for mlo resistance*), identifiziert. Diese wurden durch Remutagenese *mlo*-resistenter Gerste gefunden. Die Doppelmutanten *mlo/ror* werden teilweise vom Pilz befallen und bilden vermindert CWAs im Vergleich zu *mlo*-resistenten Linien (Freialdenhoven *et al.* 1996). Die Funktion, Sequenz und Proteinstruktur von HvROR1 konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Dagegen wurde *HvRor2* kürzlich erfolgreich isoliert

und als Syntaxin identifiziert (t-SNARE Rezeptor) (Collins *et al.* 2003). SNARE Proteine sind an Vesikeltransport und Proteinzielsteuerung beteiligt.

Außerdem wurden mit TIGS- (*transient induced gene silencing*) und Überexpressionsexperimenten drei weitere Gene gefunden, die zum Durchbrechen der *mlo*-vermittelten Resistenz beitragen. Eines davon ist ein sogenannter BAX-Inhibitor, ein Membranprotein, das in die Zelltodregulation bei Säugern verwickelt ist (Hückelhoven *et al.* 2003; Eichmann *et al.* 2004). Weitere Gene sind der Actin-depolymerisierende Faktor *Adf3*, der am Umbau oder der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt ist (persönliche Mitteilung Panstruga, MPI Köln) und das mit Vesikeltransport assoziierte Protein HvSNAP34 (Collins *et al.* 2003) (siehe auch Diskussion).

1.4 Genomforschung in Gerste

Genomforschung in Gerste findet in Deutschland hauptsächlich im Rahmen des Programms GABI (Genominitiative im biologischen System Pflanze, <http://www.gabi.de>) des BMBF statt. Die Genomforschung wird allgemein in zwei verschiedene Bereiche unterteilt. Ein Bereich ist die strukturelle Genomforschung (*structural genomics*), wobei die Struktur und Sequenz ganzer Genome untersucht wird. Der andere Bereich ist die funktionelle Genomforschung (*functional genomics*), welche die Genfunktionen auf globaler Ebene untersucht. Funktionelle Genomforschung umfasst die Analyse des Transkriptom, des Proteoms und des Metaboloms, das heißt die Analyse aller mRNA-Transkripte, Proteine und Metaboliten. Die vorliegende Arbeit ist damit in den Bereich der funktionellen Genomforschung einzuordnen.

1.4.1 Strukturelle Genomforschung

Grundlage der Genomforschung sind die mehr oder weniger vollständig sequenzierten Genome von Modellorganismen wie *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans*. Pflanzliche Modellorganismen mit vollständig sequenzierten Genomen sind die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) und der Reis (*Oryza sativa*) (Anon 2000; Goff *et al.* 2002; Yu *et al.* 2002). *Arabidopsis* wurde aufgrund der kurzen Vegetationszeit, des relativ kleinen Genoms (110 Mb) und des kleinen Habitus zur bestuntersuchtsten Modellpflanze der Genomforschung.

Gründe für die vollständige Sequenzierung von Reis, der sich durch seine herausragende agronomische Bedeutung und seine Zugehörigkeit zu der für die menschliche Ernährung wichtigen Pflanzenfamilie der Gramineae auszeichnet, sind die monokotyledone Entwicklung und die geringe Genomgröße (ca. 3 x *Arabidopsis* und 40 x weniger als Weizen). Weiterhin besteht eine hohe Colinearität zu anderen Genomen von Gräsern, nicht aber zwischen Gräsern und *Arabidopsis* (Keller und Feuillet 2000).

Mit Hilfe der vollständig sequenzierten Genome wird es möglich, für weitere wichtige Modellpflanzen genetische und physikalische Genomkarten zu erstellen. Während physikalische Kartierungen die physischen Abstände zwischen einzelnen Markern im Genom beschreiben, beruhen genetische Karten oder Kopplungskarten auf der Analyse von Rekombinationshäufigkeiten zwischen Markern. Genetische und physikalische Genomkarten stellen zusammen mit sequenzspezifischen Markern eine wichtige Grundlage für die zukünftige Züchtungsforschung dar. Diese ermöglichen Gene über ihre Kartenposition zu isolieren (*map-based-cloning*), die exakte Größe von Teilen der Genome zu bestimmen und die Anzahl der Gene abzuschätzen. Der finanzielle Aufwand der Sequenzierung und die geschätzte Größe der Genome (Reis 430 Mbp; Tomate 950 Mbp; Mais 2.670 Mbp; Gerste 5.400 Mbp; Weizen 14.000 Mbp) lassen es aber unwahrscheinlich erscheinen, dass in nächster Zukunft weitere

Genome von Getreidearten vollständig sequenziert werden (Rudd 2003). Aufgrund dieser Tatsache sind Alternativen erforderlich, die es ermöglichen, die Genomorganisation zu untersuchen und Gene aus Getreide zu beschreiben.

1.4.2 cDNA-Banken und EST-Datenbanken

Eine Alternative zur Sequenzierung ganzer Genome liegt in der Erstellung repräsentativer EST-Kollektionen, die durch Sequenzierung von cDNA-Banken generiert werden. ESTs sind uneditierte, unterschiedlich lange, in EST-Datenbanken gespeicherte, automatisch prozessierte und einmalig erzeugte Teilsequenzen von Genen, die ausgehend von cDNA-Klonen sequenziert werden (Abbildung 1.7).

cDNA-Banken, welche die Grundlage für die EST-Kollektionen bilden, lassen sich aus einzelnen Zellen, Geweben oder einem ganzen Organismus erstellen. Grundlage für die Erstellung einer cDNA-Bank sind mRNA-Populationen aus Zellen, Geweben oder ganzen Organismen, die durch *reverse* Transkription in cDNA-Populationen umgeschrieben werden. Jede mRNA bzw. cDNA repräsentiert ein exprimiertes Gen. Die cDNAs werden in Plasmid-Vektoren inseriert, die in Bakterien (*Escherichia coli*) transformiert und kloniert werden. Mit zufällig ausgewählten Klonen wird eine cDNA-Bank angelegt. Jede EST-Kollektion und jede cDNA-Bank repräsentiert also eine Momentaufnahme des Transkriptoms einer einzelnen Zelle, eines Gewebes oder eines ganzen Organismus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Transkriptom von mit *Bgh* und *Bgt* interagierenden Gerstenepidermiszellen der isogenen Linie Ingrid BC *mlo5* aufgenommen.

ESTs haben gegenüber vollständig sequenzierten Genomen den Vorteil, dass sie sich wesentlich kostengünstiger produzieren lassen. Von ESTs existieren in der Regel sogenannte 3'-EST- und 5'-EST-Varianten. Das heißt die Sequenzen entstanden entweder vom 3'-Ende oder vom 5'-Ende der entsprechenden cDNA innerhalb des jeweiligen Klons. Erkennbar ist die Richtung aus der sequenziert wurde an der Struktur der ESTs: „Nukleotide/PolyA-Schwanz“ ist gleich 5'-EST, „PolyT-Schwanz/Nukleotide“ ist gleich 3'-EST. Nachteilig an ESTs ist, dass wichtige regulatorische Bereiche von Genen nicht sequenziert werden und dass teilweise fehlerhafte Sequenzen in die Datenbanken eingehen.

Weltweit sind zurzeit 24.536.626 ESTs öffentlich verfügbar. Die meisten pflanzlichen ESTs stammen von agronomisch bedeutsamen Pflanzen bzw. von Modellpflanzen (zum Beispiel *Arabidopsis*). Bei Getreiden sind 352.924 von *Triticum aestivum*, 367.798 von *Hordeum vulgare*, 416.886 von *Zea mays*, 298.857 von *Oryza sativa* und 190.949 von *Sorghum bicolor* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html, 06.12.2004) bekannt. Die größten pflanzlichen EST-Kollektionen sind in den Datenbanken „TIGR *Plant gene indices*“, „NCBI *Unigenes*“, „MIPS *Sputniks*“ und „*Plant GDB*“ über das Internet verfügbar.

Die am IPK Gatersleben erzeugten ESTs sind in der CR-EST-Datenbank (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/est/menu.php>) abgelegt, hier sind zurzeit 187.281 ESTs der Gerste, 8.414 der Erbse, 2.079 der Kartoffel und 2.824 des Weizens verfügbar (Stand Februar 2004). Die in CR-EST enthaltenen ESTs der Gerste entstammen 33 verschiedenen cDNA-Banken, die aus einer Reihe von Geweben und Entwicklungszuständen präpariert wurden, um möglichst viele Gene zu erfassen und den gesamten Lebenszyklus von Gerste abzubilden. Themenkomplexe für die Erstellung der cDNA-Banken waren vegetative Organe (grüne Blätter, etiolierte Blätter, Wurzeln), Samenentwicklung (Karyopse, keimende Samen), Kallusentwicklung, weibliche und männliche Blütenstände und nicht zuletzt Pathogenbefall (Stand Februar, 2004). Unter http://pgrc.ipk-gatersleben.de/est/cdna_lib.php wurde die ausführliche Beschreibung zu Präparation und technischen Details der cDNA-Banken abgelegt. Die in der vorliegenden Arbeit erstellte und analysierte cDNA-Bank mit dem Identifikationscode (ID) „HO“ ist eine dieser cDNA-Banken. Aufgrund der bisher analysierten vorläufigen EST-

Kollektion (CR-EST; 110.981 ESTs) wurden für Gerste 25.224 Unigene ermittelt, die sich aus 14.151 Primärconsensi und 11.073 Singletons zusammensetzen (Zhang *et al.* 2004). Mit Hilfe von EST-Kollektionen ist es möglich Untersuchungen zur Synthänie (Colinarität) gegenüber Modellgenomen, wie zum Beispiel Reis, durchgeführten. Außerdem dienen EST-Kollektionen als Tool für Gen- und Genomannotationen und zum Finden von Spleißvarianten eines Genes. SNP- und Mikrosatelliten-Marker für die molekulare Züchtungsforschung lassen sich entwickeln. Die Kombination von cDNA-Banken und EST-Kollektionen gestattet Transkriptomanalysen mit cDNA-Makroarrays, -Mikroarrays und oligonukleotidbasierten Arrays. Mit der wachsenden Zahl von Sequenzdaten und vollständig sequenzierten Genomen verschiebt sich der Schwerpunkt der Genomforschung in Richtung funktioneller Analyse.

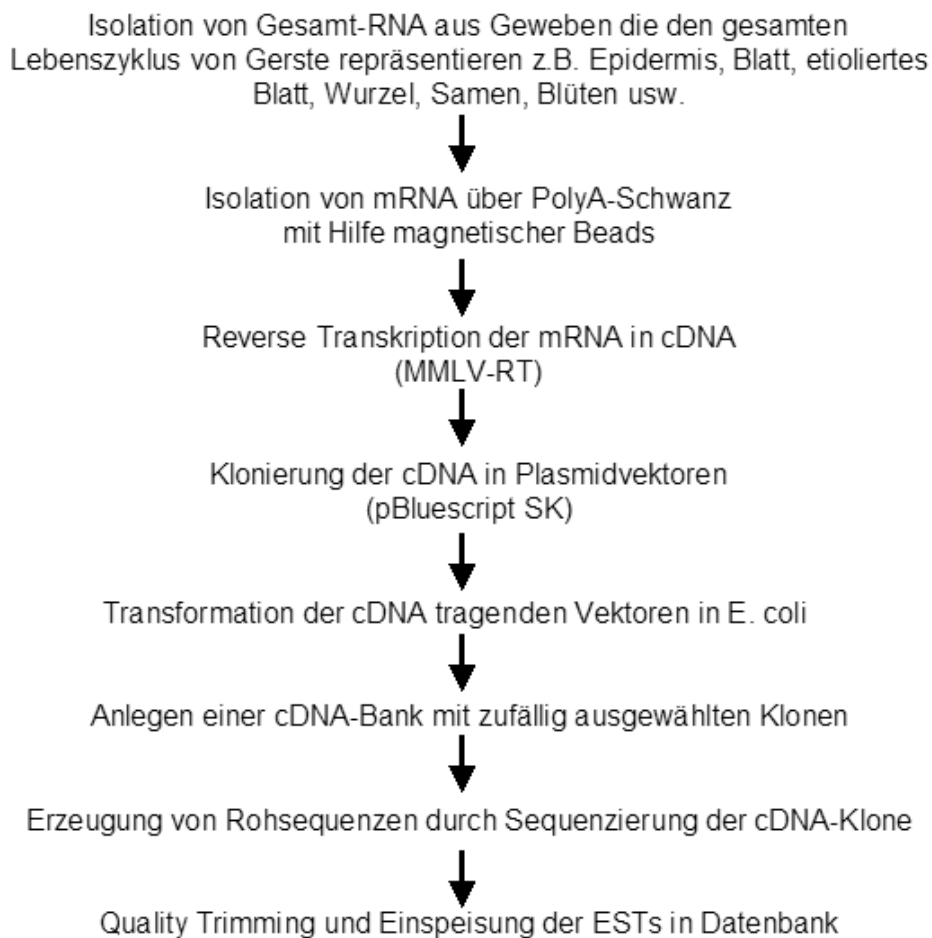


Abbildung 1.7: Herstellung einer cDNA-Bank zur Generierung von EST-Sequenzen

1.4.3 Funktionelle Genomforschung

Aspekte funktioneller Genomforschung in Gerste sind: 1) Die Untersuchung der Gen-expression, 2) das gezielte Ausschalten bzw. Überexprimieren von Genen in transient- bzw. stabiltransformierten Pflanzenteilen bzw. ganzen Pflanzen und 3) die gezielte Suche nach mutierten Allelen bekannter Gene durch TILLING und Transposon-Mutagenese.

1.4.3.1 Transkriptomanalysen

Die Transkriptabundanzen von einzelnen Genen lassen sich sehr gut mit *Northern-Blots* oder *Real-time-PCR* bestimmen. Methoden um die Transkriptabundanzen ganzer mRNA-Populationen (ganzer Transkriptome) zu analysieren sind dagegen Makroarrays, Mikroarrays, Oligonukleotid-Arrays (Freeman *et al.* 2000), SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) (Velculescu *et al.* 1997; Thomas *et al.* 2002), AFLP *Transkript Profiling* (Polverari *et al.* 2003) und *Electronic Northern* (Zhang *et al.* 2004).

Transkriptomanalysen in Gerste wurden bisher unter verschiedenen Aspekten wie zum Beispiel Photosynthese, Kornentwicklung und Malzqualität durchgeführt. In Pflanze-Pathogen-Interaktionen wurden seit 1999 ca. 20 Transkriptomanalysen auf der Basis von Arrays bekannt. Verschiedene Themen wie elizitorinduzierte Basalresistenz, R-Gen-vermittelte Resistenz, SAR, ISR, Mykorrhizza-Symbiosen oder mechanischer Stress durch saugende Insekten wurden untersucht (Tabelle 1.1). Etwa die Hälfte der Analysen wurde im Modellorganismus *Arabidopsis* durchgeführt. Kürzlich wurde eine erste Transkriptomanalyse zum Thema *Mla*-vermittelte-Resistenz im Pathosystem Gerste und *Blumeria* veröffentlicht (Caldo *et al.* 2004) (siehe auch Diskussion Kapitel 4.1).

Tabelle 1.1: Transkriptomanalysen auf der Basis von Makroarray-, Mikroarray- und Oligonukleotid-Arrays in Pflanze-Pathogen-Interaktionen.

Wirtspflanze	Pathogen bzw. Behandlung	Untersuchung	Plattform	Anzahl Gene	Autor(en)
<i>Arabidopsis</i>	14 verschiedene Behandlungen	SAR	Microarray	ca. 7.000 Unigene	Maleck <i>et al.</i> , 2000
<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	Rpp4,Rpp7,Rpp8-vermittelte Resistenz	Affymetrix AtGenome1 Array	ca. 8.000 Unigene	Eulgem <i>et al.</i> , 2004
<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	RPS2, RPM1 NahG, ndr1	Affymetrix AtGenome1 Array	ca. 8.000 Unigene	Tao <i>et al.</i> , 2003
<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae pv.tomato</i>	RPS2-vermittelte Resistenz	Makroarray auf Nylonmembran	ca. 13.000 Unigene	Scheideler <i>et al.</i> , 2002
<i>Arabidopsis</i>	Chitin-Elizitor	Basalresistenz	Mikroarray	2.375 Unigene	Ramonell <i>et al.</i> , 2002
<i>Arabidopsis</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	Nichtwirts-resistenz	Microarray	11.000 Gene	Huitema <i>et al.</i> , 2003
<i>Arabidopsis</i>	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	RCH1-vermittelte Resistenz	Mikroarray	ca. 7.000 Unigene	Narusaka <i>et al.</i> , 2004
<i>Arabidopsis</i>	Verwundung und Larve von <i>Pieris rapae</i>	mechanischer Stress	Mikroarray	ca. 150 bekannte Abwehrgene	Reymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Arabidopsis</i>	<i>Rhizobacteria</i>	ISR	Affymetrix AtGenome1 Array	ca. 8.000 Unigene	Verhagen <i>et al.</i> , 2004
Baumwolle Hypokotyl und Wurzeln	<i>Fusarium oxysporium</i> f. sp. <i>vasinfektum</i>	kompatible Interaktion	Mikroarray	6.000 Gene aus (nicht)infizierten und Gewebe	Dowd <i>et al.</i> , 2004
Gerstenkeimlinge	<i>Bgh</i>	<i>mlo</i> -vermittelte Resistenz und Basalresistenz	Makroarray auf Nylonmembran	3.136 epidermale Unigene	Zierold <i>et al.</i> , 2005
Gerstenkeimlinge	<i>Bgh</i>	<i>Mla</i> -vermittelte Resistenz	Affymetrix Barley1 Chip	22.792 Unigene aller Gewebe	Caldo <i>et al.</i> , 2004
<i>Glycine max</i>	<i>Phytophthora sojae</i>	kompatible Interaktion	Mikroarray	ca. 4.000 Unigene	Moy <i>et al.</i> , 2004
Kartoffel	<i>Phytophthora infestans</i>	kompatible Interaktion	Makroarray	182 Gene aus normalisierten cDNA-Banken	ROS <i>et al.</i> , 2004

<i>Medicago truncata</i>	Elizitor von Grünalge	Basalresistenz	Makroarray auf Nylonmembran	152 bekannte Abwehrgene	Cluzet <i>et al.</i> , 2004
<i>Medicago truncata</i>	<i>Glomeromycota</i> bzw. <i>Rhizobiaceae</i>	AM-Mykorrhizza bzw. Wurzelknöllchen	Makro- und Mikroarrays	5.648 Gene aus Knöllchen bzw. Mykorrhizza	Manthey <i>et al.</i> , 2004
<i>Nicotina attenuata</i>	<i>Manduca sexta</i>	Vaccination durch Herbivoren	Mikroarray und Oligonukleotidarray	234 Gene aus normalisierten cDNA-Banken	Voelkel und Baldwin, 2004
Reis	<i>Nilaparvata lugens</i>	Antwort auf saugendes Insekt	Makroarray auf Nylonmembran	105 bekannte Unigene	Zhang <i>et al.</i> , 2004
Reis-Zellen	Flagellin <i>Acidovorax avenae</i>	Basalresistenz	Mikroarray	3.353 Gene	Fujiwara <i>et al.</i> , 2004
Reis-Kallus	Abcisinsäure und Gibberillin	Induktion durch Hormon	Mikroarray	8.987 Gene	Yazaki <i>et al.</i> , 2003

1.4.3.2 Revers-genetische Ansätze

Revers-genetische Ansätze, um Gene des Genoms von Gerste in hohem Durchsatz systematisch auszuschalten und funktionell zu analysieren, sind VIGS (*virus induced gene silencing*) und TIGS (*transient induced gene silencing*), TILLING (*Targeting Induced Local Lesions In Genomes*) und die Mutagenisierung durch springende Gene (*Transposon induced mutagenesis*). Während sich mit den mutagenisierenden Methoden einzelne Gene ausschalten lassen, haben Methoden die auf interferierender RNA (RNAi) beruhen den Vorteil, dass sich auch duplizierte Gene ausschalten lassen.

VIGS

VIGS (*virus induced gene silencing*) ist eine *gene silencing* Methode, bei der interferierende RNA (RNAi) durch Viren in Pflanzenzellen eingeschleust wird. Bei ausreichender Sequenzhomologie zur Ziel-RNA wird diese im Zytoplasma abgebaut. In Monokotyledonen wie Gerste, Hafer, Weizen und Mais wird derzeit der Plus-Strang RNA-Virus BSMV (*Barley stripe mosaic virus*) verwendet (Holzberg *et al.* 2002). Für Gerste wird ein Projekt am SCRI (Scottish Crop Research Institut) bearbeitet (Lacomme *et al.* 2003).

TIGS

Analog zu dem Begriff VIGS wurde der Begriff TIGS (*Transient induced gene silencing*) geschaffen. Das transiente „Ausschalten“ von Genen bzw. das transiente Überexprimieren von Genen in einzelnen epidermalen Zellen von Blattabschnitten, vermittelt durch biologisches Bombardement, hat sich in den letzten Jahren als eine attraktive Alternative zur stabilen Pflanzentransformation bei der Untersuchung von Getreide-Pathogen-Interaktionen erwiesen, da sich transiente Tests schnell und reproduzierbar durchführen lassen und hochdurchsatztauglich sind. In einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel wurden Vor- und Nachteile des transienten Systems ausführlich dargelegt und 35 TIGS- bzw. Überexpressionsexperimente in Gerste bzw. in Weizen beschrieben, in denen die Resistenz respektive Anfälligkeit der Pflanzen beeinflusst wurde (Panstruga 2004). Untersuchungen zur Übertragbarkeit der Ergebnisse von transienten Systemen auf die gesamte Pflanze sind noch sehr limitiert. Bisher konnten die *Mla*-vermittelten Resistenzen durch Überexpression von *Mla* und die *mlo*-vermittelte Resistenz durch TIGS von *Mlo* im transienten System phänokopiert werden (Panstruga 2004). Transgene Weizenpflanzen existieren von einer im Überexpressionstest gefundenen, resistenzvermittelnden Peroxidase, die mit WIR3 respektive TAPERO bezeichnet wurde (Schweizer *et al.* 1999) Hier wurde eine erhöhte Resistenz

gegenüber *Bgh* im Fahnenblatt transgener Pflanzen der T2 Generation gezeigt (Altpeter und Varshney *et al.*, eingereicht). TIGS ist ein Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit.

TILLING

Mit TILLING wird nach EMS-induzierten Punkt-Mutationen in bekannten Genen gesucht, wobei es möglich ist ganze Bibliotheken von M2-Pflanzen abzusuchen. Es lassen sich subletale Mutationen zur phänotypischen Analyse ermitteln. Die DNA der M2 Pflanzen wird dazu extrahiert und in *Pools* zur Verfügung gestellt. Anschließend werden die Polymorphismen durch Heteroduplexanalysen von Wildtyp-DNA und Mutanten-DNA entweder durch denaturierende HPLC oder durch *mismatch*-spezifische Spaltung mittels einer Einzelstrang spezifischen Endonuclease (Cel1) und anschließende Gelelektrophorese detektiert. Colbert *et al.* beschreiben eine *Screening*-Methode, die auf *mismatch*-spezifischer Spaltung beruht und mit der sich ein Gen pro Woche in einer Pflanzenpopulation analysieren lässt (McCallum *et al.* 2000; Colbert *et al.* 2001). Ein großes Projekt, in dem mit TILLING mutagenisierte und charakterisierte M2 Gersten-Accessionen erzeugt wurden, ist am SCRI (*Scottish Crop Research Institute*, <http://www.scri.sari.ac.uk>) etabliert und soll durch ein Projekt am IPK (GABI-TILL) ergänzt werden.

Transposon induzierte Mutagenese

Eine weitere revers-genetische Methode, die bei der Isolation und Untersuchung der Genfunktion in Gerste Anwendung findet, ist die *Transposon induced mutagenesis* oder *Insertional mutagenesis*. Hierbei werden sogenannte Transposons („springende Gene“) genutzt, die in kodierende Regionen von Genen gezielt inserieren. Koprak *et al.* (2000) etablierten ein funktionelles *two-element transposon tagging system* für Gerste, dass sich der Transposons Ac/Ds aus Mais in Gerste bedient.

Stabile Transformationssysteme

Im Zusammenhang mit der funktionellen Untersuchung von Genen wird derzeit erfolgreich an der Etablierung von *Agrobacterium* basierten Transformationssystemen der Gerste gearbeitet (persönliche Mitteilung Kumlehn, IPK Gatersleben). Derartige Systeme erlauben es unter anderem große genomische Fragmente in Gerste routinemäßig stabil zu klonieren. Andere Transformationssysteme auf der Basis von Protoplastentransfektion, viraler Vektoren oder biolistischem Bombardement hatten bisher nur wenig Erfolg.

1.5 Ziel der Dissertation

Ziel der Dissertation war die Charakterisierung des epidermalen Transkriptoms mehltaubefallener *mlo*-resistenter Gerste mittels cDNA-basierter Makroarraytechnologie. Als Modellsystem sollten die beiden isogenen Sommergerstenlinien Ingrid und Ingrid BC *mlo5* dienen. Damit verbunden war die mögliche Identifikation und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der *mlo*-vermittelten-Resistenz bzw. von Komponenten der Basalresistenz.

Folgendes Vorgehen war geplant (Abbildung 1.8): Zunächst sollte eine cDNA-Bank aus Epidermen von mehltaubefallenen Gerstenkeimlingen der Sorte Ingrid BC *mlo5* erstellt werden, mit der unter anderem das cDNA-Bank Sortiment des IPK ergänzt werden sollte. Die erstellte cDNA-Bank sollte aber auch als Grundlage für die Transkriptomanalyse mittels cDNA-basierter Makroarraytechnologie dienen. Dazu sollte das aus dieser cDNA-Bank resultierende Unigenet auf eigens zu erstellende Makroarraymembranen gespottet werden.

Mit den in der Transkriptomanalyse durchgeführten Vergleichen „*Mlo versus mlo5*“ sollten mit der *mlo*-vermittelten Resistenz assoziierte Gene, mit den Vergleichen „inokuliert“ *versus* nicht „inokuliert“ allgemein pathogen induzierte Gene und mit den Vergleichen Epidermis *versus* „Restblatt“ gewebespezifisch exprimierte Gene gefunden werden. Aus der Transkriptomanalyse sollten Zusammenstellungen von Kandidatengen resultieren. Diese sollten anschließend mittels TIGS (*Transient Induced Gene Silencing*), einer im Labor etablierten Methode um Gene zeitlich beschränkt auszuschalten, auf ihre Funktion bei der *mlo*-vermittelten Resistenz untersucht werden.

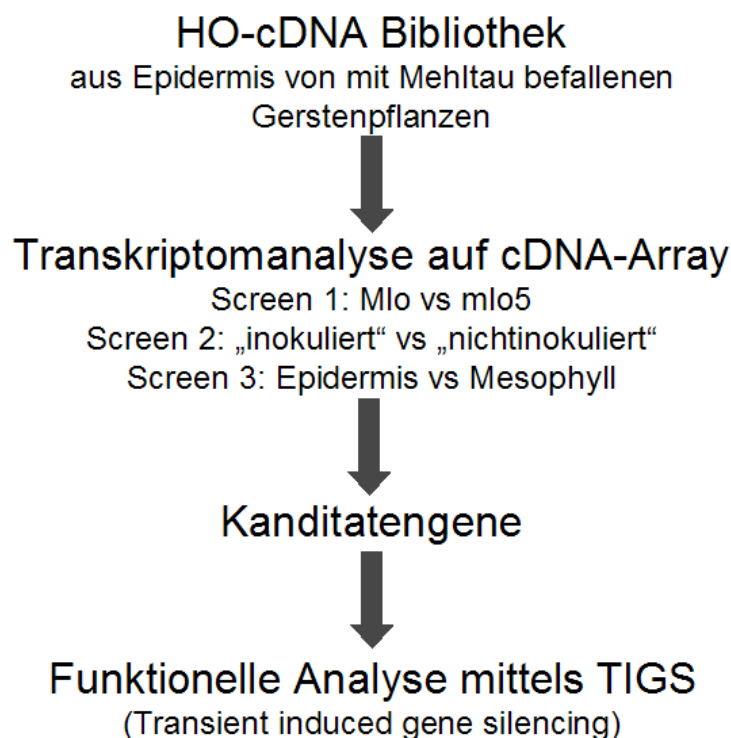


Abbildung 1.8: Schema des experimentellen Vorgehens.

