

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

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

Dissertation

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

vorgelegt von

Diplombiologin Daniela Nowara
geb. am 08.08.1977 in Remscheid

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

Verteidigung am 15. Dezember 2008

Halle/Saale, Juni 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014975

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

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

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

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

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

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

Abkürzungsverzeichnis

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

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