

2. Material und Methoden

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Pflanzensorten

2.1.1.1 Verwendete Getreidesorten

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

2.1.1.2 Kulturbedingungen von den Pflanzen

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

2.1.2 *Blumeria graminis*

2.1.2.1 Verwendete *Blumeria graminis*-Isolate

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

2.1.2.2 Kulturbedingungen von *B. graminis*

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

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

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

2.2 Allgemein angewendete Verfahren

2.2.1 Internet-Recherchen

2.2.1.1 Blast-Analysen

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

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

2.2.1.2 siRNA-Scan

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

2.2.1.3 Eclat-Software

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

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

2.2.2 DNA-Isolierung

2.2.2.1 Isolation genomischer DNA aus Pilzsporen

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

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

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

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

2.2.2.2 DNA-Isolation aus Pflanzenmaterial

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

2 x CTAB-Puffer

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

Waschlösung I

76% (v/v)	Ethanol
200 mM	Natriumacetat

Waschlösung II

76% (v/v)	Ethanol
10 mM	Ammoniumacetat

2.2.3 Restriktionsverdau

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

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

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

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

2.2.4 Standard-PCR

Die PCR-Reaktion lief in einem Volumen von 10 μ l ab.

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

PCR-Programm

- 1) 95°C 5 Minuten
- 2) 95°C 30 Sekunden Schritt 2) bis 4)
- 3) T_a 30 Sekunden wurden 29 Mal
- 4) 74°C 1 Minuten wiederholt
- 5) 75°C 10 Minuten
- 6) 4°C

Die *Annealing*-Temperatur (T_a) wurde etwa 2- 4°C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der Primer gewählt.

2.2.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

2.2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

3 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* des Stammes DH10B angeimpft. Die Kultur wuchs für 16 Stunden bei 37°C unter schütteln (220 rpm). Mit 600 µl der Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium mit 250 mM MgSO₄ und 250 mM MgCl in einem 1 Liter-Kolben angeimpft. Die Kultur wuchs bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) für ca. zwei Stunden bis sie eine optische Dichte von $A_{600nm} = 0,4$ (Eppendorf BioPhotometer) erreicht hatte. Dann wurde die Bakteriensuspension 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 3000 rpm bei 4°C abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R). Das Pellet wurde in 10 ml Transformationspuffer I resuspendiert. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut pelletiert (15 Minuten mit 3000 rpm bei 4°C, Heraeus Multifuge 3 S-R). Das Pellet wurde in 4 ml Transformationspuffer II resuspendiert und in 50 µl Aliquots bis zur Verwendung ein -80°C eingefroren.

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

2.2.5.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

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

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

2.2.6 Allgemein verwendete Lösungen und Medien

2.2.6.1 Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung von DNA

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

2.2.6.2 Medien für die Bakterienkultur

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

Verwendete Selektionsmarker:

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

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

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

2.2.7 Chemikalien

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

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

2.3 *Transient-induced gene-silencing* – TIGS

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

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

2.3.1 Erstellung der RNAi-Haarnadel-Konstrukte

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



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

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

2.3.2 Transiente Expression von RNAi-Konstrukten in Getreideblättern

2.3.2.1 Herstellung der sterilen Goldsuspension

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

2.3.2.2 Beschichtung der Goldpartikel mit DNA

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

2.3.2.3 Biolistischer Gentransfer

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

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

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



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

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

2.3.3 Inokulation mit *B. graminis*

Die Gerstenblätter wurden drei Tage nach Beschuss mit *Bgh* inokuliert. Weizenblätter wurden 24 Stunden nach Beschuss mit *Bgt* inokuliert. Dazu wurden sie auf 1%igem (w/v) Phytoagar mit 0,002% (w/v) Benzimidazol in biologischen Testschalen (23 x 23 cm, Schütt, Göttingen, Deutschland) gelegt. Sie wurden mit einer Konidiendichte von ungefähr 150- 200 Konidien/mm² inokuliert. Bis zur Färbung wurden die Blätter in den geschlossenen biologischen Testschalen, die zur Belüftung Löcher im Deckel hatten, bei 20°C in einem klimatisierten Labor an einem Nordfenster gelagert.

2.3.4 Färbung der transienten Zellen

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

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

X-Gluc-Färbelösung

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

Tricloressigsäurelösung

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

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

2.3.5.1 Mikroskopische Auswertung der transienten Zellen

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

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

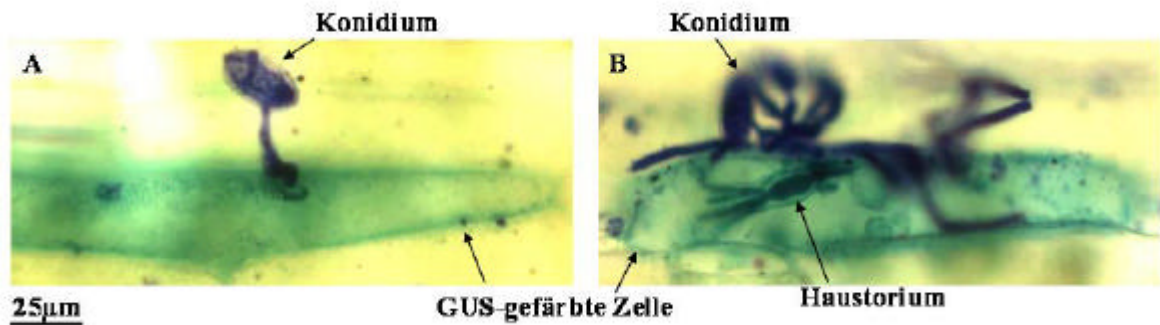


Abb. 2.3: Resistente und anfällige Interaktion zwischen Gerste und *Bgh*

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

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

2.3.5.2 Statistische Auswertung der Mikroskopie-Daten

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

$$d = y_i - x$$

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

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

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

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

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

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

x = Mittelwert
 s = Standardabweichung
 n = Anzahl Experiment

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

2.4 *Virus-induced gene-silencing* – VIGS

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

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

2.4.1 Die Kulturbedingungen der Weizenpflanzen

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

2.4.2 Klonierung der *Antisense*-Konstrukte

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

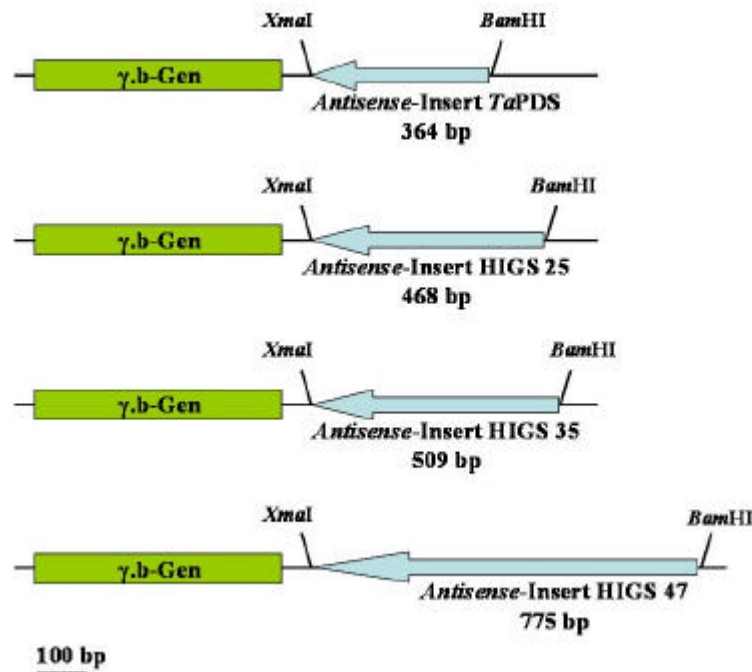


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Antisense-Konstrukte im pT7-BSMV- γ .MCS-Vektor

In 3'-Richtung hinter das γ .b-Gen wurde das Antisense-Insert des entsprechenden Konstrukts kloniert. Dafür wurden die *Xma*I und *Bam*HI-Restriktionsstellen der *Multiple cloning site* des pT7-BSMV- γ .MCS-Vektor genutzt.

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

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

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

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

2.4.3 Infektion der Weizenpflanzen mit BSMV

2.4.3.1 Linearisierung der Plasmide

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

Tab. 2.1: Restriktionsenzyme zur Linearisierung der Plasmide

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

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

2.4.3.2 *in vitro*-Transkription

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

2.4.3.3 Infektion der Pflanzen mit BSMV

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

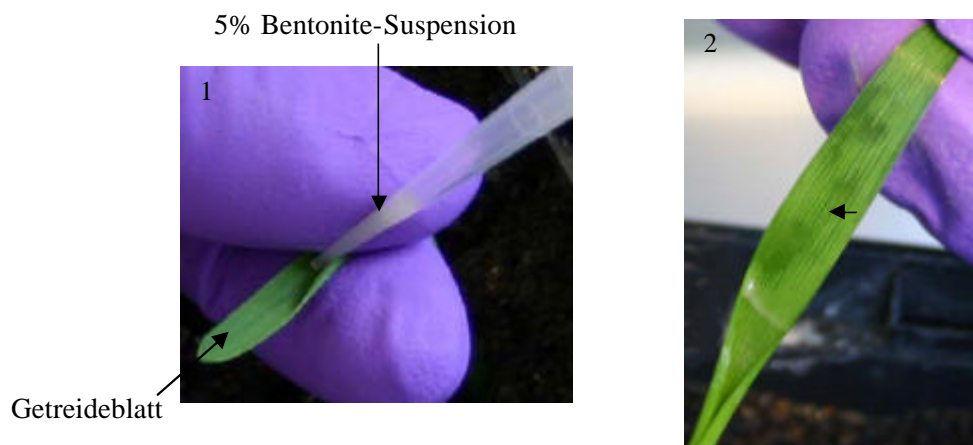


Abb. 2.5: Infektion der Getreidepflanzen mit BSMV

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

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

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

2.4.4 Test auf Anfälligkeit gegenüber *Bgt*

2.4.4.1 Ernte der BSMV-infizierten Blätter

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

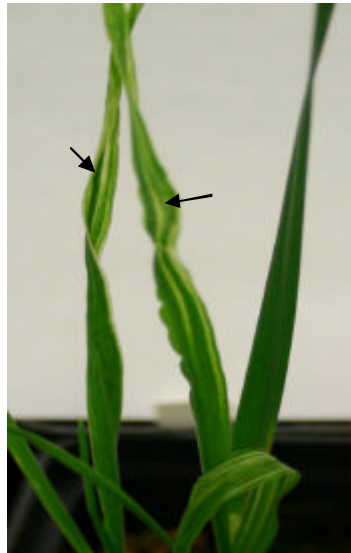


Abb. 2.6: Weizenpflanze mit BSMV-Symptomen

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

2.4.4.2 Färbung des Pilzes

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

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

Coomassie-Färbelösung

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

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

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

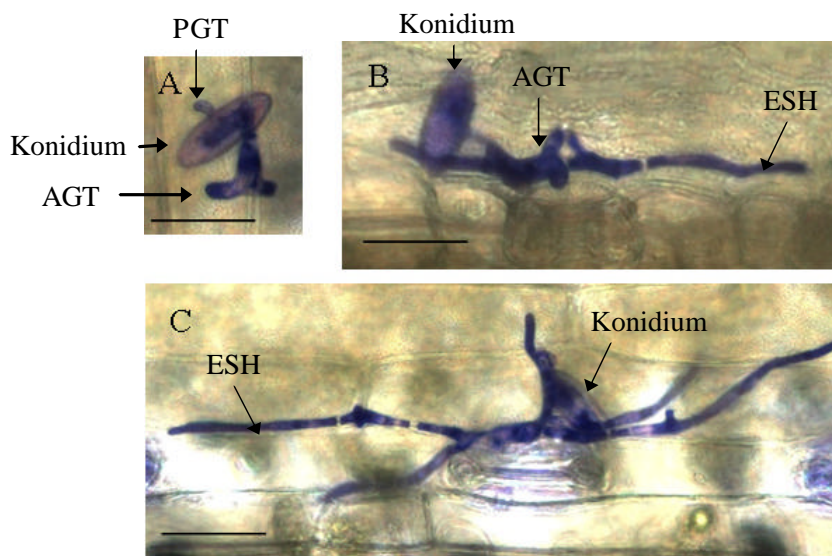


Abb. 2.7: Die Konidien wurden bei der Auswertung der VIGS-Experimente in drei Klassen eingeteilt.

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

2.4.4.3.2 Statistische Auswertung

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

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

2.5 Transgene Pflanzen

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

In der T₁-Generation wurde bei mehreren transgenen Linien die Anfälligkeit gegen *Bgh* analysiert. Makroskopisch wurde das Pilzwachstum sieben Tage nach Inokulation betrachtet (Kapitel 2.5.4.1). Mikroskopisch wurde die Infektionsrate zwei Tage nach Inokulation untersucht (Kapitel 2.5.4.2).

2.5.1 Herstellung der RNAi-Konstrukte

Das für die Transformation eingesetzte Konstrukt gleicht dem in den TIGS-Experimenten verwendeten Konstrukt HIGS 47.2. Die RNAi-Haarnadel-Sequenz ist in beiden Fällen die gleiche, da beide Konstrukte basierend auf dem gleichen Zwischenvektorkonstrukt erstellt wurden. Als RNAi-Vektor wurde in diesem Fall der pIPKb007 mit der *Accession*-Nummer EU161573 (Himmelbach et al., 2007) verwendet und die LR-Reaktion wie bei Douchkov et al. (2005) beschrieben durchgeführt. Das für die Transformation verwendete Konstrukt bekam die ID pIPKb007_HIGS 47.2 (Abb. 2.8).



Abb. 2.8: Schematische Darstellung der RNAi-Kassette des Konstruktes pIPKb007_HIGS 47.2
Die RNAi-Kassette wird durch den ZmUbi1-Promotor gesteuert. Die beiden Wiederholungssequenzen entsprechen einem ausgewählten Sequenzbereich des Gens HIGS 47 und haben jeweils eine Länge von 833 Basen. Sie haben beide die gleiche Basenabfolge, sind aber in gegenläufiger Leserichtung zueinander angeordnet. Die beiden Wiederholungssequenzen sind durch das RGA2-Intron aus *Triticum aestivum* verbunden. Der CaMV 35S-Terminator bildet das Ende der RNAi-Kassette.

2.5.2 Herstellung der transgenen Pflanzen

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

2.5.3 Anzucht der transgenen Pflanzen

Für alle Versuche wurden Pflanzen der T₁-Generation verwendet. Das Saatgut der transgenen Pflanzen keimte auf feuchten Papiertüchern. Zuvor wurden die Samenkörner Oberflächensterilisiert. Dazu wurden sie erst fünf Minuten in 70%igem Ethanol, dann für 15 Minuten in 0,8%iger Natriumhypochloritlösung gewaschen und schließlich mehrfach mit Wasser gespült. Bevor das Saatgut auf die feuchten Papiertücher gelegt wurde, wurde es 16 Stunden bei 4°C in 10 µM Benzylaminopurin inkubiert. Nach drei bis vier Tagen auf Papiertüchern wurden die kleinen Pflanzen in Erde gesetzt. Danach wuchsen sie in Paletten zu 54 Pflanzen. Jede Pflanze hatte einen Topf mit dem Durchmesser von 5 cm zur Verfügung.

2.5.4 Test auf Anfälligkeit der transgenen Gersten gegen *Bgh*

2.5.4.1 Bonitur

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

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

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

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

mittlere infizierte Blattoberfläche

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

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

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

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

2.5.4.2 Mikroskopische Auswertung

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

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

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

2.5.5 Ernte von *Bgh* von der Blattoberfläche

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

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

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

2.6 Transkriptanalyse in Einzelzellen der Gerstenepidermis

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

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

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

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

2.7.1 RNA-Isolierung

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

2.7.2 Elektrophoretische Auftrennung der RNA

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

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

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

2.7.3 Aufbau des *Northern Blots*

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

Die für den *Northern Blot* verwendete Hybond-N-Nylonmembran (Amersham, Buckinghamshire, UK) wurde kurz in DEPC-H₂O angefeuchtet und dann mindestens 15 Minuten in 10 x SSC unter leichtem Schwenken inkubiert.

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

20 x SSC

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

2.7.4 Hybridisierung der RNA mittels radioaktiv-markierter Sonde

2.7.4.1 Radioaktive Markierung der Sonde

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

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

1 M Natriumphosphat-Puffer

1 M NaH₂PO₄
mit 1 M Na₂HPO₄ pH 6,8 einstellen

Church-Puffer

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

2.7.4.2 Hybridisierung der RNA

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

2.7.4.3 Waschung der Membran

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

Waschpuffer

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

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

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

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

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

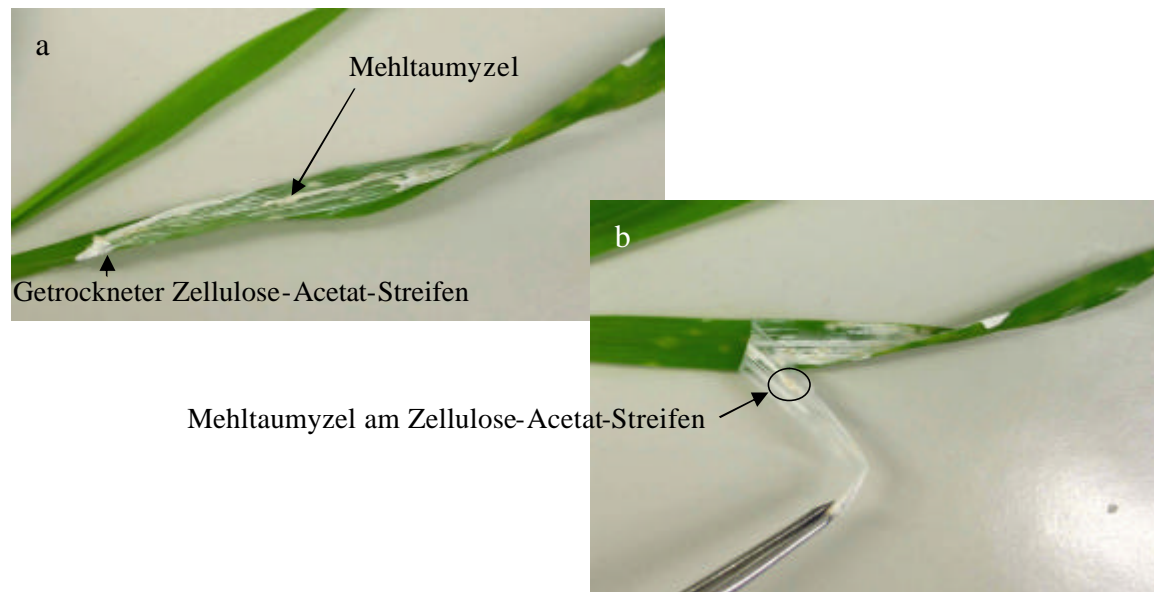


Abb. 2.9: Pilzernte mit Zellulose-Acetat

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

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

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

2.9 Real time-PCR

2.9.1 PCR-Ansatz

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

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

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

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

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

PCR-Programm

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

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

2.9.2 Auswertung der *real time*-PCR

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

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