

## 7. Zusammenfassung

Obligat biotrophe Phytopathogene wie der Getreidemehltau *Blumeria graminis* stellen eine ernstzunehmende Gefahr für die Landwirtschaft dar. Trotzdem ist diese Pathogengruppe noch relativ unerforscht, und ihre molekulare Analyse gestaltet sich als schwierig, weil diese Pilze sich nicht auf künstlichen Medien kultivieren lassen. Dadurch sind genetische Transformation oder die Kultivierung von Mutanten schwierig wenn nicht unmöglich.

In dieser Arbeit wurde das Phänomen des *host-induced gene-silencing* (HIGS) in *B. graminis* vorgestellt. Dabei war es möglich durch *in planta* exprimierte RNAi-Konstrukte gegen pilzliche Gene die Anfälligkeit des Wirt-Pathogen-Systems zu reduzieren.

Mittels TIGS-Experimenten konnte in der Gersten-*Bgh*-Interaktion für zehn unterschiedliche Gene aus *Bgh* nachgewiesen werden, dass die Expression von RNAi-Konstrukten im Wirt zu einer Reduktion der Anfälligkeit führt.

Für drei dieser Kandidatengene konnte dieser Effekt mittels VIGS-Experimenten mit BSMV in der Weizen-*Bgt*-Interaktion bestätigt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass RNAi unterschiedlicher Gene zu unterschiedlichen Wachstumsstörungen bei *Bgt* führte. So konnte durch RNAi gegen *BgGTF1* eine verringerte Haustorienbildung und durch RNAi gegen *BgGTF2* verringertes Hyphenwachstum induziert werden.

Mittels mehrerer transgener Gerstenlinien, die ein RNAi-Konstrukt gegen *BgGTF1* trugen, wurde der Beweis erbracht, dass HIGS auf der Expression des RNAi-Konstruktes im Wirt beruht und nicht auf der Aufnahme von Plasmid-DNA durch den Pilz.

Es wurden drei Arbeitshypothesen aufgestellt. Die erste Hypothese, welche besagt, dass HIGS auf der Aufnahme von Plasmid-DNA oder BSMV-Partikeln beruht, konnte mit den Experimenten an den transgenen Pflanzen widerlegt werden.

Die zweite Hypothese besagt, dass der Pilz mRNA in die Wirtszelle sekretiert, um den Stoffwechsel des Wirts zu seinen Gunsten zu manipulieren. HIGS findet also in der Wirtszelle statt.

Die dritte Hypothese schlägt vor, dass das RNAi-Konstrukt im Wirt exprimiert wird, der Pilz unspezifisch dsRNA oder siRNA-Moleküle aufnimmt, und das *Silencing* des Zielgens im Pilz stattfindet.

Es wurde kein schlüssiger Nachweis für die Sekretion von pilzlichen Transkripten in den Wirt erbracht, und es war auch nicht möglich nachzuweisen, dass der Transkriptgehalt des Zielgens im Pathogen durch HIGS herunterreguliert wurde. Anhand der durchgeführten Experimente ließ sich nicht nachweisen, ob das *Silencing* der Zielsequenz im Pathogen stattfindet oder in der Pflanze, nachdem der Pilz mRNA in seinen Wirt sekretiert hatte. Weitere Experimente unter Verwendung von *in situ* Techniken können möglicherweise Aufschluss über die Wirkungsweise von HIGS geben.

## Summary

Obligate biotrophic phytopathogens such as the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* represent a serious danger for agriculture. Nevertheless this group of pathogens is still relatively unexplored, and its molecular analysis is quite difficult because these fungi cannot be cultivated on artificial media. Thus genetic transformation or the cultivation of mutants is difficult if not impossible.

In this work the phenomenon of host-induced gene-silencing (HIGS) in *B. graminis* was described. Thereby it was possible to reduce the susceptibility of the host-pathogen-system through *in planta* expressed RNAi constructs against fungal genes.

By means of TIGS experiments it could be demonstrated that the expression of ten different RNAi constructs against genes from *Bgh* reduces the susceptibility of the barley-*Bgh*-interaction.

For three of these candidate genes this effect could be confirmed by means of VIGS experiments using BSMV in the wheat-*Bgt*-interaction. In addition it was shown that it was possible to inhibit fungal growth at different stages with antisense constructs against these candidate genes. RNAi of *BgGTF1* caused a reduced haustorium formation whereas RNAi against *BgGTF2* reduced hyphal growth.

By means of several transgenic barley lines, which carried an RNAi construct against *BgGTF1*, evidence was provided that HIGS is based on the expression of the RNAi construct in the host and not on uptake of plasmid DNA by the fungus.

Three working hypotheses were raised. The first hypothesis, which says that HIGS is based on the uptake of plasmid DNA or BSMV particles could be disproven by the results from transgenic plants.

The second hypothesis suggests secretion of mRNA by the fungus into the host cell in order to manipulate the host metabolism in favour of infection. Silencing through HIGS takes place in the host cell.

The third hypothesis proposes that the RNAi construct in the host is expressed and the fungus inadvertently absorbs dsRNA or siRNA molecules and silencing of the target gene takes place in the fungus.

No conclusive proof for the secretion of fungal transcripts into the host was produced and it was not possible to prove that the transcript abundance of the target gene in the pathogen was reduced by HIGS. With the preformed experiments it was not possible to prove whether silencing of the target sequences takes place in the pathogen or in the plant after the fungus secreted mRNA into its host.

More dedicated experiments including *in situ* techniques will be required to obtain a clearer picture as to the mode of action of HIGS.