

**Genexpressionsstudien und funktionelle  
Analysen in den Pathosystemen *Arabidopsis  
thaliana* bzw. Gerste (*Hordeum vulgare* L.) -  
*Fusarium***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Sibylle von Räden  
aus Lüdenscheid

Gutachter: Prof. Dr. Hubert Felle  
Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel

Dekan: Prof. Dr. Peter R. Schreiner

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>WIRT-PATHOGEN-INTERAKTIONEN</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>FORMEN DER RESISTENZ GEGENÜBER PHYTOPATHOGENEN ORGANISMEN</b>	<b>2</b>
1.2.1	NICHT-WIRT-RESISTENZ	2
1.2.2	WIRT-RESISTENZ	2
1.2.3	INDUZIERTE RESISTENZ (IR)	3
<b>1.3</b>	<b>MECHANISMEN ZUR PATHOGENABWEHR</b>	<b>4</b>
1.3.1	PASSIVE KOMPONENTEN DER ABWEHR	4
1.3.2	AKTIVIERTE KOMPONENTEN DER ABWEHR	4
<b>1.4</b>	<b>SIGNALWEGE DER PFLANZLICHEN ABWEHR UND DEREN ELEMENTE</b>	<b>6</b>
<b>1.5</b>	<b>DIE GETREIDEPATHOGENE <i>FUSARIUM CULMORUM</i> UND <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i></b>	<b>9</b>
<b>1.6</b>	<b>DER MUTUALISTISCHE WURZELENDOPHYT <i>PIRIFORMOSPORA INDICA</i></b>	<b>12</b>
<b>1.7</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL &amp; METHODEN</u></b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>PFLANZENMATERIAL UND ANZUCHTBEDINGUNGEN</b>	<b>15</b>
2.1.1	GERSTEN- UND WEIZENKULTIVARE	15
2.1.2	<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	15
<b>2.2</b>	<b>PATHOGENE</b>	<b>18</b>
2.2.1	<i>FUSARIUM CULMORUM</i> (W. G. SMITH) SACC.	18
2.2.2	<i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> SCHWABE	18
2.2.3	<i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> SCHLECHT (VERSCHIEDENE <i>FORMAE SPECIALAE</i> )	19
<b>2.3</b>	<b>BEHANDLUNGEN DES PFLANZENMATERIALS</b>	<b>19</b>
2.3.1	INOKULATION VON BLÄTTERN	19
2.3.2	INOKULATION VON ÄHREN	20
<b>2.4</b>	<b>MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>20</b>
2.4.1	FIXIERUNG VON BLÄTTERN	20
2.4.2	FÄRBUNG PILZLICHER STRUKTUREN MIT ESSIGSAURER TINTE	20
2.4.3	FÄRBUNG PILZLICHER STRUKTUREN MIT WGA ALEXA FLUOR <sup>®</sup> 488	20
2.4.4	MIKROSKOPIE	21
<b>2.5</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>21</b>
2.5.1	RNA-EXTRAKTION UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	21
2.5.2	CDNA-SYNTHESE	22
2.5.3	STANDARD-PCR (POLYMERASEKETTENREAKTION)	22
2.5.4	SEMI-QUANTITATIVE <i>TWO-STEP</i> RT-PCR	23
		I

2.5.5	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	23
2.5.6	GENBANK-SEQUENZVERGLEICH	24
2.5.7	RADIOAKTIVER REVERSER <i>NORTHERN</i>	25
2.5.7.1	Herstellung komplexer cDNA-Sonden	25
2.5.7.2	Hybridisierung mit komplexen cDNA-Sonden	27
2.5.7.3	Auswertung der Filterscans	28
2.5.7.4	Entfernen der Sonden von den Filtern	28
<b>2.6</b>	<b>ARABIDOPSIS-SCREENING</b>	<b>29</b>
2.6.1	NACHZUCHT HOMOZYGOTER T-DNA-INSERTIONSLINIEN	29
2.6.2	DAS <i>SCREENING</i> AUF RESISTENZ GEGENÜBER <i>FUSARIUM</i>	30
<b>2.7</b>	<b>ERTRAGSVERSUCH</b>	<b>31</b>
2.7.1	KULTIVIERUNG VON <i>PIRIFORMOSPORA INDICA</i>	31
2.7.2	VERSUCHSAUFBAU & ANZUCHTBEDINGUNGEN	32
2.7.3	UNTERSUCHUNG DER PARAMETER WACHSTUM, CHLOROPHYLL, ENTWICKLUNG UND ERTRAG	33
<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>ANFÄLLIGKEIT VERSCHIEDENER GERSTENSORTEN BEI EINER BLATTINFEKTION MIT <i>FUSARIUM CULMORUM</i></b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG <i>FUSARIUM</i>-RESPONSIVER GENE DER GERSTE</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>EXPRESSIONSANALYSE DER KANDIDATENGENE IN VERSCHIEDENEN PFLANZENORGANEN</b>	<b>44</b>
3.3.1	BESTÄTIGUNG DER ARRAY-ANALYSEN IN EINEM UNABHÄNGIGEN GERSTENBLATT-VERSUCH	44
3.3.2	EXPRESSIONSMUSTER DER KANDIDATENGENE IN GERSTENÄHREN	46
3.3.3	EXPRESSIONSMUSTER DER KANDIDATENGENE IN WEIZENBLÄTTERN	49
3.3.4	EXPRESSIONSMUSTER DER KANDIDATENGENE IN WEIZENÄHREN	51
3.3.5	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER SEMI-QUANTITATIVEN <i>TWO-STEP</i> RT-PCRS	52
<b>3.4</b>	<b>DAS ARABIDOPSIS-SCREENING</b>	<b>53</b>
3.4.1	DIE ETABLIERUNG DES ARABIDOPSIS – <i>FUSARIUM SCREENINGS</i>	54
3.4.2	AUSWAHL DER GENE FÜR DAS ARABIDOPSIS-SCREENING	55
3.4.3	VERMEHRUNG DER HOMOZYGOT TRANSGENEN T-DNA-INSERTIONSLINIEN	56
3.4.4	DAS <i>SCREENING</i>	57
<b>3.5</b>	<b>EINFLUSS VON <i>F. GRAMINEARUM</i> UND <i>P. INDICA</i> AUF GERSTE</b>	<b>60</b>
3.5.1	EINFLUSS VON <i>P. INDICA</i> UND <i>F. GRAMINEARUM</i> AUF DAS WACHSTUM IN GERSTE	62
3.5.2	EINFLUSS VON <i>P. INDICA</i> UND <i>F. GRAMINEARUM</i> AUF DEN CHLOROPHYLLGEGHALT IN GERSTE	64
3.5.3	EINFLUSS VON <i>P. INDICA</i> UND <i>F. GRAMINEARUM</i> AUF DIE ENTWICKLUNG IN GERSTE	65
3.5.4	EINFLUSS VON <i>P. INDICA</i> UND <i>F. GRAMINEARUM</i> AUF DEN ERTRAG IN GERSTE	68

<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b><u>72</u></b>
<b>4.1</b>	<b>EXPRESSIONSSTUDIEN UND FUNKTIONELLE ANALYSEN</b>	<b>73</b>
4.1.1	<i>MACROARRAY</i> -ANALYSEN	73
4.1.2	WEITERGEHENDE EXPRESSIONSANALYSEN UND FUNKTIONELLE ANALYSEN IM PATHOSYSTEM <i>ARABIDOPSIS – FUSARIUM</i>	75
4.1.2.1	Gene, die laut <i>macroarray</i> -Analysen nur in cv. Nikel differentiell exprimiert waren	76
4.1.2.2	Gene, die laut <i>macroarray</i> nur in cv. Maresi differentiell exprimiert waren	78
4.1.2.3	Gene, die laut <i>macroarray</i> in cv. Nikel und cv. Maresi differentiell exprimiert waren	80
4.1.3	ABHÄNGIGKEIT DER RESISTENZ GEGEN <i>FUSARIUM</i> VON PROGRAMMIERTEM ZELLTOD	82
<b>4.2</b>	<b>BETEILIGUNG BEKANNTER SIGNALWEGE AN DER ABWEHR VON <i>FC</i> UND <i>FOM</i></b>	<b>86</b>
<b>4.3</b>	<b>EINFLUSS VON <i>F. GRAMINEARUM</i> UND <i>P. INDICA</i> AUF GERSTENPFLANZEN</b>	<b>94</b>
<b>5</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>100</u></b>
<b>6</b>	<b><u>SUMMARY</u></b>	<b><u>102</u></b>
<b>7</b>	<b><u>LITERATUR</u></b>	<b><u>104</u></b>
<b>8</b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b><u>117</u></b>



## Abkürzungsverzeichnis

### Genbezeichnungen

<i>2OG</i>	<i>2-oxoglutarate dependent dioxygenase</i>
<i>ARP</i>	<i>auxin-repressed protein</i> , durch Auxin reprimiertes Protein
<i>BI-1</i>	BAX-Inhibitor 1
<i>CEV</i>	<i>constitutive expression of vegetative storage protein</i>
<i>CHIB</i>	eine saure Endochitinase
<i>COI</i>	<i>coronatine insensitive</i>
<i>CRT</i>	Calreticulin
<i>DAD</i>	<i>defender against apoptotic death</i>
<i>EDS</i>	<i>enhanced disease susceptibility</i>
<i>EIN</i>	ET-insensitive
<i>ETO</i>	<i>ethylene overexpression</i>
<i>ETR</i>	ET response
<i>FAD</i>	<i>fatty acid desaturase</i>
<i>GLP</i>	<i>germine-like protein</i>
<i>GRP</i>	Glycin-reiches Protein
<i>JAR</i>	JA resistant
<i>JIN</i>	<i>jasmonate insensitive</i>
<i>JIP</i>	Jasmonat-induziertes Protein
<i>LRR</i>	<i>leucine rich repeat</i>
<i>MAPK</i>	Mitogen aktivierte Proteinkinase
<i>MR-TF</i>	<i>myb-related transcription factor</i>
<i>NPR</i>	<i>non-expresser of PR-genes</i>
<i>PAD</i>	<i>phytoalexin deficient</i>
<i>PER1</i>	Peroxiredoxin
<i>PP1</i>	putative Peroxidase
Prx	Peroxiredoxin
<i>PR</i>	<i>pathogenesis related</i>
<i>RELA</i>	RELA-Homolog
<i>SAP</i>	Seneszenz-assoziiertes Protein
<i>vSNARE</i>	<i>vesicle soluble NSF attachment protein receptor</i>
<i>VTC1</i>	für Vitamin C-Synthese benötigtes Gen

### sonstige

<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
cci	<i>chlorophyll content index</i>
cDNA	copy DNA, mit mRNA als Vorlage synthetisierte DNA
Col-0	Arabidopsis Ökotyp Columbia
cv.	Kultivar
ET	Ethylen
<i>Fc</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
<i>Fg</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>Foc</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>
<i>Fom</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>matthiolae</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoxid
hpi	<i>hours past inoculation</i> , Stunden nach Inokulation
<i>Hv</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
ISR	<i>induced systemic resistance</i>
JA	Jasmonat

<i>Pi</i>	<i>Piriformospora indica</i>
SA	Salizylat
<i>Ta</i>	<i>Triticum aestivum</i>
T-DNA	transfer DNA
TKG	Tausend-Korn-Gewicht
wpi	weeks past inoculation, Wochen nach Inokulation

## 1 EINLEITUNG

Ein erklärtes Ziel des Welternährungsgipfels von 1996 war die Halbierung der Zahl der weltweit Hungernden von damals 800 Mio. auf 400 Mio. bis zum Jahr 2015. Der Jahresbericht der Welternährungsorganisation (FAO) aus dem Jahr 2003 offenbarte jedoch eine andere Realität. Allen Fortschritten in Wissenschaft und Technik zum Trotz nahm die Zahl der Hungernden weltweit weiter zu: von Unterernährung und Hunger waren nun 842 Mio. Menschen betroffen. Im darauf folgenden Jahr 2004 lag diese Zahl bereits bei 852 Mio. Das Vorhaben, den weltweiten Hunger zu reduzieren, wird vor allem dadurch erschwert, dass bis zum Jahr 2015 mit einem Bevölkerungszuwachs von ca. 2 Milliarden Menschen zu rechnen ist. Man erwartet daher in den Entwicklungsländern zusätzliche 600 Mio. Menschen, die unterernährt sein werden (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/a0200e/a0200e01.pdf>). Schon heute gibt es weltweit pro Kopf nur noch halb so viel Ackerfläche wie 1960 – weltweit etwa 1,5 Milliarden Hektar – zudem sind viele Anbauflächen in Entwicklungsländern ausgelaugt und weitere Flächen v. a. in Afrika und Asien sehr gefährdet. Vor diesem Hintergrund kommt der Agrarforschung eine wichtige Rolle zu, um eine ausreichende Steigerung des Ertrags auf den landwirtschaftlich genutzten Flächen zu erzielen.

Einen bedeutenden Anteil an der Diskrepanz zwischen theoretisch erreichbarem und tatsächlich erzieltm Ertrag haben mit weltweiten Ertragsverlusten von 17,5 % pflanzliche Pathogene (OERKE 1997). Auch der intensive Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel bringt durch ungenügende Applikationstechniken oder ungünstige äußere Bedingungen (z.B. Regen) oft nicht die gewünschte Wirkung. Zudem ist der Einsatz chemischer Mittel in dem Maße, in dem er notwendig wäre, aus ökologischen und ökonomischen Gründen oft nicht sinnvoll. Auch die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Pflanzenschutzmitteln verhindert deren erwünschte Wirkung auf lange Sicht. Es ist daher notwendig und sinnvoll, größeren Wert auf alternative Pflanzenschutzkonzepte, wie die Verbesserung des natürlichen Resistenzpotentials der Pflanzen, zu legen. Dazu ist es notwendig, ein genaues Kenntnis über die jeweilige Pathogenese und die zugehörigen Abwehrreaktionen der Pflanzen zu erhalten.

### 1.1 WIRT-PATHOGEN-INTERAKTIONEN

Pflanzen kommen in der Natur mit einer Vielzahl von potentiellen Krankheitserregern in Kontakt. Im Fall einer kompatiblen (verträglichen) Interaktion schafft es der Mikroorganismus (Virus, Bakterium, Pilz), die Pflanze erfolgreich zu besiedeln und sich zu vermehren. Die Pflanze wird in diesem Fall als Wirt und der entsprechende Mikroorganismus

als virulentes Pathogen bezeichnet (SCHLÖSSER 1997). Eine Besonderheit ist hierbei die Toleranz gegenüber einem Pathogen: das Pathogen vermehrt sich in gleichem Maße wie in nicht-toleranten anfälligen Pflanzen, verursacht aber keine starken Krankheitssymptome und auch keine deutliche Reduktion der Biomasse bzw. des Ertrags (AGRIOS 1997).

Bei der auch als Basisresistenz bezeichneten inkompatiblen (unverträglichen) Interaktion wird die Besiedelung durch den in diesem Fall avirulenten Erreger erfolgreich verhindert. Die Pflanze ist resistent und es kommt zu keiner oder nur schwachen Ausprägung von Symptomen (SCHLÖSSER 1997).

## **1.2 FORMEN DER RESISTENZ GEGENÜBER PHYTOPATHOGENEN ORGANISMEN**

### **1.2.1 Nicht-Wirt-Resistenz**

Die am weitesten verbreitete Art der Resistenz von Pflanzen gegenüber Mikroorganismen ist die so genannte Nicht-Wirt-Resistenz oder Basisresistenz. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie dauerhaft und Rassen/Sorten-unspezifisch ist, also alle Angehörigen einer Pflanzenart gegenüber allen Pathotypen eines Erregers resistent sind. Gründe hierfür liegen zum einen auf Seiten des Pathogens, wenn nämlich dessen Physiologie und Umweltansprüche einer Besiedelung entgegen sprechen. Zum anderen wirkt eine Vielzahl unspezifischer (poly- oder multigener) Abwehrmechanismen von Seiten der Pflanzen einer Besiedelung entgegen. Dazu zählen passive, präformierte (mechanische oder biochemische) Barrieren aber auch aktive, postinfektionelle Abwehrmechanismen (SCHLÖSSER 1997).

### **1.2.2 Wirt-Resistenz**

Durchbricht ein Pathogen im Laufe der koevolutiven Entwicklung die Nicht-Wirt-Resistenz, kommt es zur Basiskompatibilität, d.h. das Pathogen ist in der Lage, sich auf bzw. in der Pflanze zu vermehren (HEATH 1981). Die Pflanzen wiederum entwickeln Mechanismen, die es ihnen ermöglichen, die Resistenz zurück zu gewinnen. Bei der so entstandenen Resistenz handelt es sich meist um eine vertikale, rassensorten-spezifische Resistenz. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass ein Genotyp einer Pflanzenart gegenüber einer physiologischen Rasse des Pathogens resistent ist, was auf der rassenspezifischen Erkennung eines Avirulenzgenprodukts (Elicitor) des Pathogens durch das korrespondierende Resistenzgenprodukt (Rezeptor) der Pflanze beruht (Gen-für-Gen-Modell, FLOR 1971). Durch diese Erkennung wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zu einer effektiven Abwehr des Pathogens führt (HEATH 2000). Der Vorteil dieser qualitativen Resistenz liegt darin, dass sie

der Pflanze gegen einen bestimmten Pathotyp eines Erregers vollständigen Schutz verleiht. Durch ihren monogenen Ursprung ist ihre Wirksamkeit allerdings meist zeitlich begrenzt, nämlich solange, bis ein neuer Pathotyp an die resistente Sorte angepasst ist.

Ist eine Resistenz gegenüber allen Erregerrassen gleichermaßen effektiv, so spricht man von horizontaler, rassenunspezifischer Resistenz. Diese quantitative Form der Resistenz hat ebenso wie die Nicht-Wirt-Resistenz einen polygenen Charakter. Dadurch handelt es sich hierbei wiederum um eine dauerhafte Resistenz, die aber meist unvollständig ist (SCHLÖSSER 1997).

### 1.2.3 Induzierte Resistenz (IR)

Die induzierte Resistenz umfasst alle Formen der Resistenz, die durch eine Stimulation der Pflanze vor einer Pathogenattacke ausgeprägt werden. Sie ist unspezifisch und definiert als eine Erhöhung der pflanzeigenen Widerstandsfähigkeit nach Induktion durch verschiedene biotische oder abiotische Stimuli. Es handelt sich hierbei um einen Prozess, der sowohl die Auslösung und Verstärkung zellulärer Abwehrmechanismen umfasst, als auch die erhöhte Bereitschaft der Pflanze, schneller und stärker auf einen Pathogenbefall zu reagieren. Diese erhöhte Abwehrbereitschaft wird auch *priming* genannt (CONRATH *et al.* 2001).

Das Phänomen der biologisch induzierten Resistenz (bIR) wurde schon früh im System Tabak / Tabakmosaikvirus (TMV) entdeckt und beschrieben (CHESTER 1933). Nach einer lokalen Infektion wurde sowohl das befallene Blatt als auch die gesamte Pflanze resistenter gegen nachfolgende TMV-Infektionen. ROSS prägte für diese Form der Resistenz 1961 den Begriff der SAR (*systemic acquired resistance*). Da der durch SAR erworbene Schutz mehrere Wochen bis Monate anhalten kann ist dieser Mechanismus für die biotechnologische Anwendung sehr interessant (HAMMERSCHMIDT 1993; STICHER *et al.* 1997). Mit Einsetzen der SAR kommt es in dikotylen Pflanzen zur Akkumulation von Salizylsäure (STICHER *et al.* 1997) sowie zur verstärkten Expression von PR-Genen (VAN LOON und VAN STRIEN 1999). Die Anreicherung von Salizylsäure ist dabei entscheidend für den Aufbau der induzierten Resistenz. So sind transgene *NahG*-Arabidopsispflanzen, in denen die Akkumulation von Salizylsäure durch Expression einer bakteriellen Salizylhydroxylase (*NahG*) verhindert wird, anfällig gegenüber einer sekundären Infektion, zeigen also keine SAR.

Neben biotischen Induktoren können auch natürlich vorkommende und synthetische Substanzen eine partielle Resistenz induzieren, wobei der erhaltene Resistenzphänotyp nicht auf eine toxische Wirkung des Induktors gegen das Pathogen zurückzuführen ist. Man spricht

in diesem Fall von chemisch induzierter Resistenz (cIR, GÖRLACH *et al.* 1996, STICHER *et al.* 1997). Als mögliche Induktoren sind hier z.B. die Salizylsäure und deren Funktionsanaloga DCINA (2,6-Dichlorisonicotinsäure) und BTH (Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester) zu nennen, wobei durch letztere eine stärkere und langfristige Resistenz auslösung erreicht wird.

Die durch wurzelbesiedelnde Rhizobakterien ausgelöste Resistenz wird als ISR (*induced systemic resistance*) bezeichnet. Sie unterscheidet sich von der SAR dadurch, dass sie unabhängig von SA-Akkumulation und Aktivierung von PR-Genen ist und durch die Signalmoleküle Ethylen und Jasmonat vermittelt wird (PIETERSE *et al.* 1998).

### **1.3 MECHANISMEN ZUR PATHOGENABWEHR**

#### **1.3.1 Passive Komponenten der Abwehr**

Passive Komponenten der Abwehr sind solche, die nicht induziert werden und bereits vor der Pathogenattacke in der Pflanze vorhanden sind. Sie sind zum einen physikalischer Natur, wie die epikutikuläre Wachsschicht, Kutikula und Zellwand von Epidermis und Rhizodermis oder das Fehlen struktureller Erkennungsfaktoren für das Pathogen (AGRIOS 1997; SCHLÖSSER 1997). Daneben gibt es eine Vielzahl konstitutiver biochemischer Substanzen, zu denen Metabolite des Sekundärstoffwechsels zählen, wie Senföle, Saponine und andere Phytotoxine, Stoffe mit enzyminhibierender Wirkung (Gerbstoffe, Phenole) aber auch komplexere Moleküle wie Proteinaseinhibitoren, Glukanasen, Chitinasen, RIPs (ribosomeninaktivierende Proteine) und Defensine, die direkt antimikrobiell wirken (STIRPE *et al.* 1992; AGRIOS 1997; SCHLÖSSER 1997; HEATH 2000).

#### **1.3.2 Aktivierte Komponenten der Abwehr**

Unter aktivierten Abwehrmechanismen versteht man physikalische oder biochemische Komponenten, die in der Pflanze erst durch den Kontakt mit einem Mikroorganismus induziert werden. Ausgelöst werden sie entweder durch vom Erreger abgegebene Substanzen (Glykoproteine, Kohlenhydrate, Fettsäuren, Peptide), so genannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), oder Abbauprodukte der Oberfläche des Erregers oder der Pflanze, die durch den Kontakt beider Interaktionspartner entstehen, so genannte Elicitoren. Diese Auslöser können sowohl rassenunspezifisch als auch rassenspezifisch sein. Die Erkennung des Elicitors erfolgt über membrangebundene oder cytosolische Rezeptoren der Pflanze und führt über verschiedene Signaltransduktionswege zu einer Vielzahl von

Abwehrmechanismen (SCHEEL 1998). Dieser Zustand der aktivierten Abwehr wird in Anlehnung an das menschliche und tierische Immunsystem auch als *innate immunity* (angeborene Immunität) bezeichnet. Obwohl es zwischen diesen beiden Abwehrsystemen tatsächlich auffallende Ähnlichkeiten gibt, kann man sie aber doch nicht direkt miteinander vergleichen. Zum Beispiel gibt es im Pflanzenreich nicht das anpassungsfähige System, welches bei Tieren durch die Bildung antigen-spezifischer Rezeptoren durch somatische Rekombination in reifenden Lymphozyten charakterisiert ist. Ebenso wenig gibt es spezialisierte Zelltypen wie z.B. Makrophagen, die als Teil des zirkulierenden Blutsystems eine Schlüsselrolle im tierischen Immunsystem spielen. Hingegen besitzt jede einzelne Pflanzenzelle die Voraussetzung, die Anwesenheit eines ihr fremden Moleküls/Pathogens zu erkennen und entsprechende Abwehrantworten einzuleiten (NÜRNBERGER *et al.* 2004).

Um die Wirtspflanze zu besiedeln, müssen die meisten Pathogene die pflanzliche Zellwand durchdringen, was die Pflanze zunächst durch Verstärkung der Zellwand an der Penetrationsstelle zu verhindern versucht. Dies geschieht durch Anlagerung, Polymerisierung oder Vernetzung von Kallose, Lignin, Suberin und hydroxiprolinreichen Glycoproteinen zu Zellwandappositionen, so genannten Papillen (THORDAL-CHRISTENSEN *et al.* 1999). Die im Bereich der Penetrationsstelle ausgeschütteten antimikrobiellen Substanzen wie z.B. Phytoalexine schwächen das Pathogen und unterstützen so die pflanzliche Abwehr (HAMMOND-KOSACK und JONES 1996; SCHEEL 1998).

Des Weiteren beginnt die Pflanzenzelle unmittelbar nach Perzeption eines Elicitors mit einem Prozess, der als *oxidative burst* bezeichnet wird. Er ist gekennzeichnet durch die massive Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI: *reactive oxygen intermediates*), wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Superoxidradikalanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ), Hydroperoxyl-Radikale ( $HO_2^{\cdot}$ ) und Hydroxyl-Radikale ( $HO^{\cdot}$ ). ROI sind wichtige Elemente der pflanzlichen Pathogenabwehr, da sie einerseits toxische Wirkungen auf eindringende Krankheitserreger haben (MEHDY 1994) und andererseits zur Vernetzung von Zellwandbestandteilen benötigt werden (BRISSON *et al.* 1994). Zudem werden ROI als Signaltransduktionskomponenten diskutiert, die für die Regulation der verschiedenen Resistenzmechanismen verantwortlich sind (SCHEEL 1998; HÜCKELHOVEN und KOGEL 2003).

Eine weitere Abwehrreaktion der Pflanze stellt das schnelle Absterben der angegriffenen Pflanzenzelle bzw. der unmittelbar angrenzenden Zellen dar. Dieser als Hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnete Mechanismus stoppt insbesondere biotrophe Organismen in ihrer Entwicklung. Doch auch nekrotrophe Pathogene, die sich von abgestorbenen Zellen ernähren, ziehen nicht unbedingt einen Vorteil aus dieser Reaktion, da durch die Dekompartimentierung

der Zelle Phytoalexine, PR-Proteine und Phenylpropanoide aus Vakuolen freigesetzt werden (HAMMOND-KOSACK und JONES 1996). Da die HR als aktiver Vorgang auf die Proteinbiosynthese angewiesen ist und sich somit von einer Nekrose unterscheidet (SCHULZE-LEFERT und VOGEL 2000), wird dieser Mechanismus auch als programmierter Zelltod (PCD: *programmed cell death*) bezeichnet (GREENBERG 1996). Die Auslösung des PCD erfolgt durch die synergistische Wirkung von NO (Stickstoffmonoxid) und ROI (NIMCHUK *et al.* 2003).

Nach Befall durch Mikroorganismen oder Applikation eines Elicitors kommt es zudem zur Akkumulation von Proteinen, die als PR-Proteine (*pathogenesis related proteins*) bezeichnet werden. Bis heute sind mindestens 17 verschiedene PR-Proteinfamilien bekannt (CHRISTENSEN *et al.* 2002; COLLINGE *et al.* 2002). Dazu gehören lytische Enzyme wie Glukanasen (PR-2), Chitinasen (PR-3, -8, 11) und Endoproteasen (PR-7) mit antimikrobieller Wirkung. Daneben gibt es Chitin-bindende Proteine (PR-4), Thaumatin-ähnliche Enzyme (PR-5), Proteaseinhibitoren (PR-6), Lignin-bildende Peroxidasen (PR-9), RIPs (*ribosome-inactivating proteins*, PR-10), Defensine (PR-12), Thionine (PR-13), LTPs (Lipid-Transfer-Proteine, PR-14, Oxalatoxidasen (PR-15), Oxalatoxidasen-ähnliche Proteine (PR-16) und Proteasen (PR-17). Die genaue Funktion von PR-1 ist bis heute nicht geklärt, jedoch zeigten Untersuchungen, dass die Unterdrückung der PR-1B Translation in Gerstenepidermiszellen durch RNA Interferenz (RNAi) zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz führt (SCHULTHEISS *et al.* 2001).

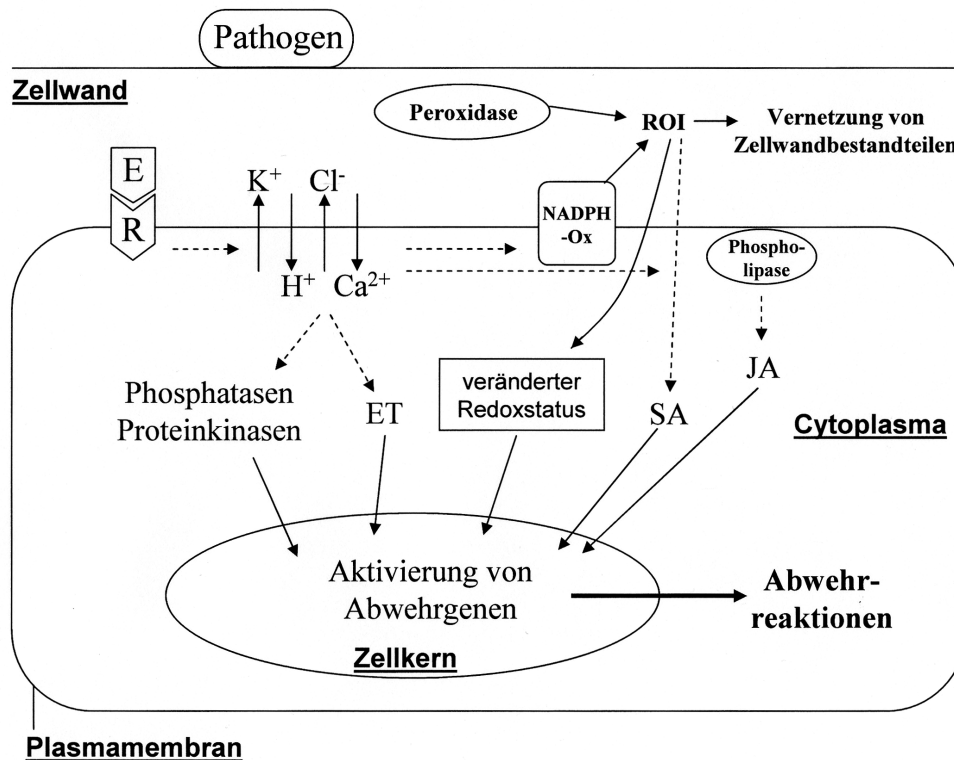
Des Weiteren spielen von der Pflanze gebildete Enzyme, die vom Pathogen freigesetzte Toxine abbauen können, eine wichtige Rolle für die Abwehr phytopathogener Organismen.

#### 1.4 SIGNALWEGE DER PFLANZLICHEN ABWEHR UND DEREN ELEMENTE

Die pflanzliche Abwehr gegen Pathogene und herbivore Insekten bildet ein ausgedehntes Netzwerk von miteinander interagierenden Signaltransduktionswegen (BECKERS und SPOEL 2006). Die angemessene Regulation der Abwehrantworten ist dabei sehr wichtig, da die Aktivierung der Abwehr viele Ressourcen aufbraucht und daher negative Effekte auf das Wachstum der Pflanze hat (GLAZEBROOK 2005). Startpunkt der Signaltransduktion ist die rassenspezifische oder -unspezifische Erkennung eines Elicitors durch Rezeptoren der Pflanze. Als schnelle Reaktion folgt darauf die Öffnung spezifischer Ionenkanäle, was zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{H}^+$ -Ionen aus dem Apoplasten ins Zytoplasma und zum Ausstrom von  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen in umgekehrter Richtung führt (LAMB 1997, HUTCHESON 1998). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom löst u.a. den *oxidative burst* aus, d.h. die Synthese reaktiver



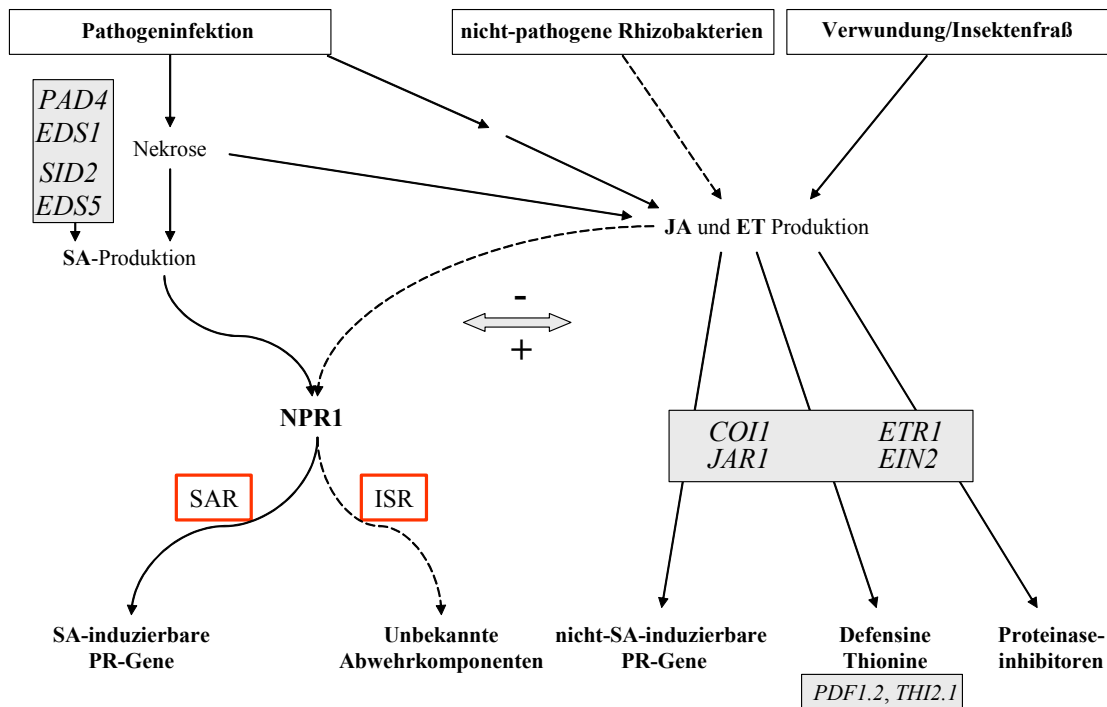
Sauerstoffintermediate (s. Kap. 1.3.2) durch zellwandgebundene Peroxidasen, membrangebundene NADPH-Oxidasen, Aminoxygenasen und Oxalatoxygenasen. Dies hat unter anderem die Auslösung von Signalkaskaden zur Folge, die zur HR, Phytoalexinsynthese und Aktivierung von Abwehrgenen und zur Vernetzung von Zellwandbestandteilen führen. Zudem sind auch G-Proteine (GTP-bindende Proteine), Proteinkinasen, Phosphatasen und Phospholipasen an den Kaskaden beteiligt (BLUMWALD *et al.* 1998, LUAN 1998).



**Abb. 1.1: Frühe Ereignisse der Wirt-Pathogen-Interaktion**  
 (verändert nach: HAMMOND-KOSACK und JONES 1996, SOMSSICH und HAHLBROCK 1998)  
 Zunächst werden nach Erkennung eines Elicitors (E) durch einen pflanzlichen Rezeptor (R) verschiedene Ionenströme durch die Plasmamembran sowie der *oxidative burst*, d.h. die Bildung der ROI, induziert. Letztere lösen zusammen mit Phosphatasen, Proteinkinasen (MAP-Kinasen), Salizylat (SA), Jasmonat (JA) und Ethylen (ET) die Transkription von Abwehrgenen aus, was zur Ausprägung verschiedener Abwehrreaktionen führt.  
 NADPH-Ox: NADPH-Oxidase  
 ROI: reaktive Sauerstoffintermediate

Insbesondere in *A. thaliana* wurden systemische Signalwege, an denen die Phytohormone Salizylsäure (SA), Jasmonat (JA) und Ethylen (ET) beteiligt sind, eingehend studiert. SA ist in dikotylen Pflanzen eine Schlüsselkomponente der SAR. Durch bestimmte (oft biotrophe) Pathogene, die eine HR auslösen, kommt es zur Erhöhung des endogenen Salizylsäurelevels, und als Folge davon zur Akkumulierung der SA-induzierbaren PR-Proteine (GLAZEBROOK 2005). Verschiedene Gene werden für einen funktionierenden SA-Signalweg benötigt: in

Arabidopsis aktivieren *PAD4* und *EDS1* die SA-Akkumulation (FALK *et al.* 1999, ZHOU *et al.* 1998), während *SID2* und *EDS5* zur SA-Biosynthese benötigt werden (GLAZEBROOK *et al.* 2003). Durch den Anstieg des SA-Levels dissoziiert die oligomere Form des NPR1-Proteins in Monomere, die in den Zellkern transloziert werden, dort mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagieren und so die Expression u.a. der PR-Proteine bewirken.



**Abb. 1.2: Systemisch induzierbare Signalwege in *Arabidopsis thaliana* (SA-, JA- und ET-abhängig)**

(verändert nach PIETERSE und VAN LOON 1996, THATCHER *et al.* 2005)

Pathogeninfektion, nicht-pathogene Rhizobakterien, Verwundung und Insektenfraß induzieren in Arabidopsis Salizylat (SA)-, Jasmonat (JA)- bzw. Ethylen (ET)-abhängige Signalwege, die sich an verschiedenen Stellen überschneiden und an deren Ende unterschiedliche Abwehrantworten stehen. Grau hinterlegt sind einige wichtige an der systemischen Abwehr beteiligten Gene. Der durch die nicht-pathogenen Rhizobakterien ausgelöste Signalweg der ISR ist durch gestrichelte Pfeile markiert.

ISR: induzierte systemische Resistenz

SAR: systemisch erworbene Resistenz

Der JA- und ET-abhängige Signalweg wird durch (oft nekrotrophe) Pathogene, Verwundung oder Insektenfraß induziert. Die in diese Wegen involvierten Gene sind teilweise nicht nur durch eines der beiden Phytohormone, sondern durch beide oder auch ausschließlich durch beide induzierbar (GLAZEBROOK 2005). Elemente dieser Signalkette sind in Arabidopsis z.B. *COI1*, *JAR1*, *ETR1* und *EIN2*. Die Ausbildung der Resistenz geht unter anderem mit der Akkumulation des Thionins THI2.1 und des Defensins PDF1.2 einher. Auch der durch nicht-pathogene Rhizobakterien ausgelöste Signalweg der ISR geht mit einer JA- und ET-Produktion einher. Zudem ist dieser aber auch durch NPR1 reguliert. Die Komponenten der

Abwehr sind in diesem Fall noch nicht bekannt (THATCHER *et al.* 2005). Die Untersuchungen zur Entschlüsselung dieser Signalwege wurden größtenteils mit Hilfe diverser Arabidopsis-Mutanten gemacht und sind noch längst nicht abgeschlossen. Die tatsächliche Situation dürfte allerdings weitaus komplexer sein als bisher bekannt, da die drei beschriebenen Signalwege an vielen Stellen interagieren (PIETERSE und VAN LOON 1999, GLAZEBROOK 2005, BECKERS und SPOEL 2006).

### **1.5 DIE GETREIDEPATHOGENE *FUSARIUM CULMORUM* UND *FUSARIUM GRAMINEARUM***

Pilze der Gattung *Fusarium*, die zur Abteilung der Ascomycota (Schlauchpilze) gehören, wurden in Bodenproben von jedem Kontinent, ausgenommen der Antarktis, isoliert und sind in vielen landwirtschaftlichen Kulturen von wirtschaftlicher Bedeutung. Sie kommen auf allen vegetativen und reproduktiven Organen der Pflanzen vor und verursachen dort Keimlings-, Halmbasis- und Fußfäulen sowie Ährenfusariose (FHB = *Fusarium head blight*) (PARRY *et al.* 1995, MIEDANER *et al.* 2001).

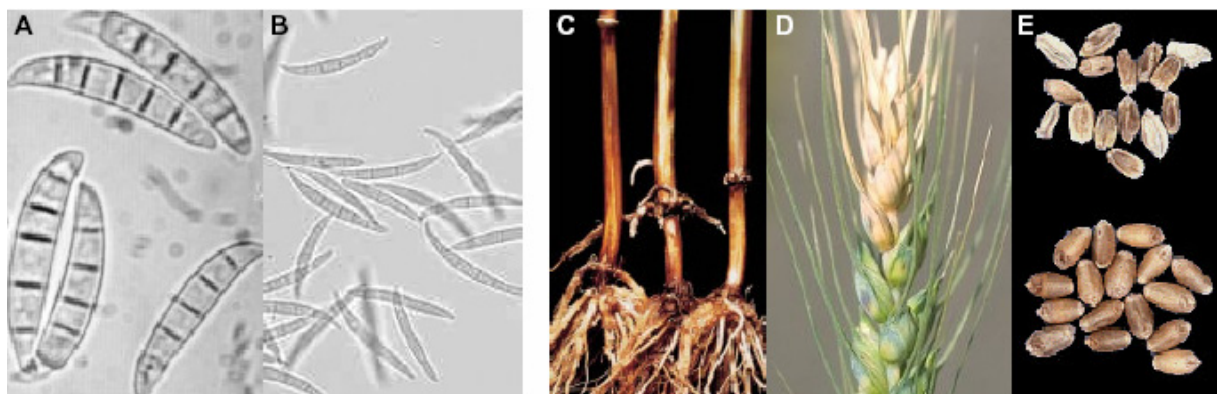
Zu den wichtigsten getreidepathogenen Arten zählen *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorph: *Gibberella zeae* [Schweinitz] Petsch) und *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc.. Insgesamt konnten etwa 20 *Fusarium*-Arten mit Ährenfusariosen in Zusammenhang gebracht werden. (PARRY *et al.* 1995, MIEDANER 1997). Das Wirtsspektrum umfasst alle Getreidepflanzen und auch verschiedene breitblättrige Kräuter. Von ökonomischer Bedeutung ist vor allem die in Weizen und Gerste hervorgerufene FHB sowie Kolbenfäule in Mais (PARRY *et al.* 1995, MIEDANER 1997, MIEDANER *et al.* 2001, CHANDLER *et al.* 2003). MIEDANER (1997) nennt *Fusarium*-bedingte Ertragsverluste von 7 bis 17 % durch Keimlingsfäule, 10 bis 30 % durch Stängelfäule und 30 bis 70 % durch FHB. Neben direkten Ertragsverlusten durch Unterbindung der Assimilatzufuhr zu den Kornanlagen und Zerstörung von Stärke, Speicherproteinen und Zellwänden (PARRY *et al.* 1995) beeinträchtigen *Fusarium* spp. den ernährungsphysiologischen Wert des Getreides vor allem durch die Bildung von Mykotoxinen. *F. graminearum* und *F. culmorum* synthetisieren hauptsächlich Typ B Trichothecene, d.h. Deoxynivalenol (DON) und seine acetylierten Derivate 3-Acetyl-DON und 15-Acetyl-DON, Nivalenol (NIV) und Fusarenon X (FX). Daneben sind beide Pilze in der Lage, Zearalenon (ZEA) zu synthetisieren. Die einzelnen Toxine können gleichzeitig und in verschiedenen Kompositionen und Mengen auftreten (MIEDANER 1997, D'MELLO *et al.* 1998, PLACINTA *et al.* 1999). DON und NIV inhibieren die Proteinsynthese und DNA-Synthese. Weiterhin bewirken sie bei Nutztieren verzögertes Wachstum, Nahrungsverweigerung und Erbrechen. ZEA ist neben seiner zyto- und genotoxischen

Aktivität in erster Linie wegen seiner östrogenen Wirkung bekannt. Es besitzt die Fähigkeit, an Östrogenrezeptoren zu binden und so die endokrine Regulation der reproduktiven Funktionen in weiblichen Tieren, v. a. Schweinen, zu unterbrechen. (WASOWICZ *et al.* 2005, KOUADIO *et al.* 2005, ROCHA *et al.* 2005). Untersuchungen zur Bedeutung der Trichothecene bei der Pathogenität der *Fusarium*-Arten haben ergeben, dass durch diese Toxine das Wachstum von Weizenkoleoptilgewebe und Keimlingen inhibiert wird und außerdem die Ausbreitung von *F. graminearum* in Weizenähren (*spreading*) gefördert wird (JANSEN *et al.* 2005). Es wurde aber auch verschiedentlich gezeigt, dass die Anwesenheit/Menge von DON nicht notwendigerweise mit der Ausbildung von Symptomen in Zusammenhang gebracht werden kann (MIEDANER 1997, BAI *et al.* 2001).

Die Infektion von Pflanzen mit Fusariumpilzen geht anfänglich von infizierten Pflanzenrückständen aus, auf denen die Pilze als saprophytisches Myzel oder in Form von Chlamydosporen den Winter überdauern. Im Fall von *F. culmorum* verbreiten sich die vegetativen Konidiosporen über Regenspritzer und den Wind (von Blattetage zu Blattetage) bis zu den Ähren, eine Hauptfruchtform ist hier nicht bekannt (SMITH 1988, MIEDANER *et al.* 2004). Bei *F. graminearum* erfolgt die primäre Verbreitung durch die Hauptfruchtform *Giberella zae*, die im Frühjahr Perithezien mit einer Vielzahl von Ascosporen ausbildet, die auf den abgestorbenen Pflanzenresten heranreifen. Unter günstigen Witterungsbedingungen (vorangegangene Niederschläge) werden die Sporen aktiv ausgeschleudert und über den Wind verbreitet. Die sekundäre Verbreitung erfolgt vegetativ über Konidiosporen, die durch Regenspritzer verbreitet werden (INCH and GILBERT 2003). Auf diese Art werden die Ähren entweder direkt oder nach vorherigem Befall der Blätter und Stängel infiziert (PARRY *et al.* 1995). Keimlingsfäule wird meist durch infiziertes Saatgut hervorgerufen und führt zu einer geringeren Anzahl von Pflanzen und Sekundärinfektionen. Wurzel- und Fußfäule werden durch im Boden befindliches Inokulum verursacht, das durch Wurzeln und Halmbasen in die Pflanze eindringt. Dies führt zu vorzeitigem Abreifen der Pflanze und somit zur Reduktion der Kornanzahl und/oder des Korngewichts. Stängelfäule wird durch Inokulum oberhalb des Bodens hervorgerufen. Der Pilz penetriert während der Wachstumsperiode nacheinander die Blattetagen und erreicht schließlich den Stängel. Die unteren Internodien, nicht aber der Übergang zwischen Stängel und Wurzeln und die Wurzeln an sich, weisen Nekrosen und leichte Fäule auf. Der Ertragsverlust ist durch eine verminderte Wasser- und Nährstoffaufnahme bedingt (MIEDANER 1997). Die größten Schäden entstehen jedoch durch einen Befall der Ähren. Nach der Keimung der Spore auf oder in einem Ährchen wachsen die Hyphen entlang des Epikarps zwischen Vor- und Deckspelze. Die Infektion des sich

entwickelnden Korn erfolgt über das Epikarp, wobei zunächst die Schichten der Fruchtschale und schließlich das stärke- und proteinspeichernde Endosperm zerstört werden. Erreicht der Pilz die Rachis, werden beim Weizen im Folgenden die oberhalb befindlichen Einzelährchen befallen. In der Gerste endet die Infektion meist an der Rachis. Nur unter bestimmten klimatischen Bedingungen breitet sich hier die Infektion über die Rachisoberfläche auf benachbarte Kornanlagen aus (JANSEN *et al.* 2005).

Die tatsächliche Befallssituation wird vor allem durch die Witterungsverhältnisse beeinflusst, da ungünstige Feuchte- und Temperaturbedingungen die Inokulumbildung bzw. dessen effektive Keimung verhindern. Prinzipiell tritt *F. graminearum* eher in wärmeren Gebieten auf, während sich *F. culmorum* auch bzw. eher unter kühleren Bedingungen verbreitet (PARRY *et al.* 1995, DOOHAN *et al.* 2003).



**Abb. 1.3:** Sporen von *F. culmorum* und *F. graminearum* und Symptome der von ihnen ausgelösten Krankheiten.

A und B zeigen die Konidien von *F. culmorum* bzw. *F. graminearum*. C: Symptome der Fußfäule an Mais, D: partielle Taubährigkeit an Weizen, E: Vergleich von gesunden Gerstenkörnern (unten) zu *Fusarium* bedingten Kümmerkkörnern (oben).

Quellen:

A: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/lord-fritz-2002-12-02/HTML/chapter3.html>

B: <http://www.agri.pref.hokkaido.jp/tokachi/byouchu/>

C: [http://www.bayercropscience.de/de/pf/diagnose\\_center/online\\_diagnose/index.asp?ID=0&detail=true&ID\\_DIAG=101](http://www.bayercropscience.de/de/pf/diagnose_center/online_diagnose/index.asp?ID=0&detail=true&ID_DIAG=101)

D: <http://www.brazeau.ab.ca/adeptagr.html>

E: <http://oak.ppws.vt.edu/stromberg/smallgrain/biology/wscab.html>

Um einer Infektion durch *Fusarien* entgegen zu wirken, gibt es verschiedene praktische Ansätze, z.B. pflanzenbauliche Maßnahmen. Zum einen ist die Art der Bodenbearbeitung ein wichtiger Faktor. Wird der Boden gepflügt, so wird ein Großteil der Pflanzenrückstände von der Bodenoberfläche entfernt und steht somit nicht mehr als Inokulumquelle zur Verfügung. Zudem ist Mais als Vorfrucht zu vermeiden, da insbesondere Maisstoppeln und –stroh optimale Überwinterungsbedingungen für *Fusarium* pilze bieten (PARRY *et al.* 1995, BAI & SHANER 2004). Untersuchungen haben gezeigt, dass der DON-Gehalt von Weizenkörnern mit

Soja als Vorfrucht um 50 % geringer war als mit Mais als Vorfrucht (DILL-MACKY and JONES 2000). Als weitere pflanzenbauliche Maßnahme ist die Sortenwahl zu nennen. Bis heute ist zwar keine vollständig resistente Getreidesorte bekannt (DIAMOND und COOKE 2002), jedoch sind genetische Ressourcen für die Resistenzzüchtung z.B. in einigen Sommerweizen-Sorten zu finden (MIEDANER *et al.* 2006). Auch spielt die Morphologie des Getreides eine Rolle bei der Infektion. So sind zwergwüchsige Typen anfälliger als hoch wachsende Kultivare mit längeren Internodien unterhalb der Ähren (MESTERHÁZY 2002). Eine Bekämpfung der *Fusarien* mit Fungiziden erfolgt meist während der Blüte (<http://www.bayercropscience.de>, <http://www.compo-profi.de>), ist aber eher kritisch zu sehen, da deren Anwendung die Mykotoxinbelastung des Ernteguts unter Umständen auch erhöhen kann (D'MELLO *et al.* 1998, SIMPSON *et al.* 2001).

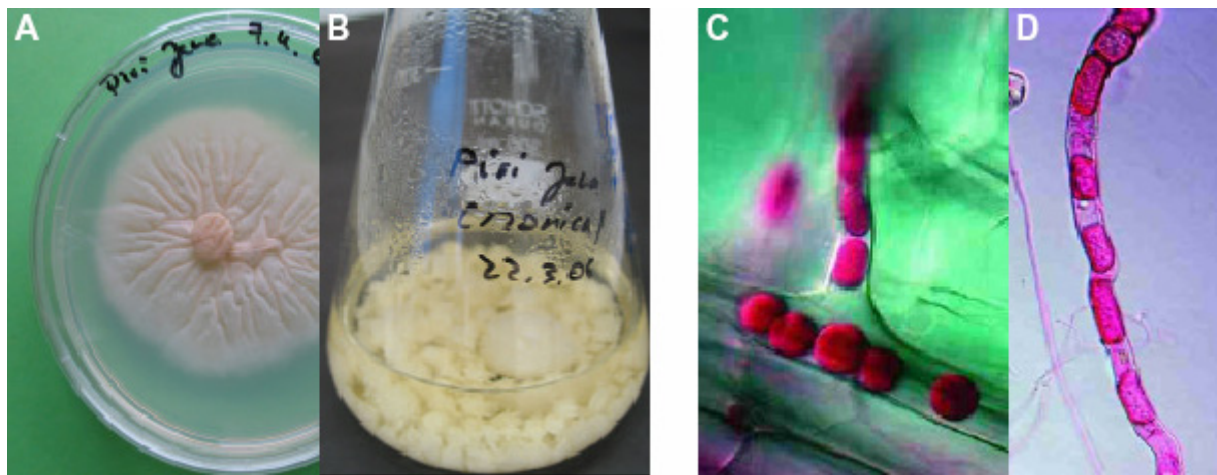
#### 1.6 DER MUTUALISTISCHE WURZELENDOPHYT *PIRIFORMOSPORA INDICA*

*Piriformospora indica* (Verma, Varma, Kost, Rexer & Franken) ist ein Pilz, der erst 1997 zufällig bei einer Analyse von Bodenproben aus der Thar Wüste (Rajasthan, Indien) von einer Spore eines arbuskulären Mykorrhizapilzes (AMP) isoliert wurde (VERMA *et al.* 1998). Es handelt sich bei hierbei um einen Wurzelendophyten, der kürzlich den *Sebacinales* [ordo nov.] (form genus *Rhizoctonia*, *Hymenomyces*, *Basidiomycota*) zugeordnet wurde (WEISS *et al.* 2004). Die Namensgebung bezieht sich auf die asexuell gebildeten birnenförmigen Chlamydosporen, ein sexuelles Stadium ist nicht bekannt (VERMA *et al.* 1998, VARMA *et al.* 1999). *P. indica* besiedelt als Organismus mit einem breiten Wirtsspektrum viele verschiedene mono- und dikotyle Pflanzen, wie Kräuter und Bäume, sowie verschiedene medizinisch interessante Pflanzen und ökonomisch wichtige Getreidepflanzen (SINGH *et al.* 2000, PHAM *et al.* 2004). Ähnlich wie bei den AMP hat eine Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* einen positiven Einfluss auf das Wachstum und die Gesundheit der Pflanzen (SINGH *et al.* 2000). Neben Wachstums- und Biomasseförderung, früherer Blüte und erhöhtem Ertrag (RAI *et al.* 2001, BARAZANI *et al.* 2005, WALLER *et al.* 2005), führt eine Besiedelung mit *P. indica* in Gerste auch zu erhöhter Toleranz gegenüber leichtem Salzstress und erhöhter Resistenz gegenüber Wurzel- und Blattpathogenen (WALLER *et al.* 2005).

Die Kolonisierung der Wurzeln erfolgt über die Rhizodermis oder die Wurzelhaare. Danach wächst der Pilz inter- und intrazellulär in der Wurzelrinde, wo er oft dichte Hyphenknoten oder verzweigte Strukturen bildet. Nach 10 Tagen können die ersten Chlamydosporen in den Wurzelhaaren und Zellen des Rindengewebes beobachtet werden. Im Zentralzylinder der Wurzel und in Stamm oder Blättern wurden bisher jedoch keine Hyphen detektiert (SINGH *et*

al. 2000, WALLER *et al.* 2005). Auf welche Weise *P. indica* das Wachstum stimuliert, ist zur Zeit noch nicht geklärt. Fest steht aber, dass eine direkte Besiedelung der Wurzeln dazu nicht notwendig ist, da auch das Kulturfiltrat mit pilzlichen Exudaten bzw. in direkter Nähe der Wurzeln wachsendes Pilzmyzel das Wachstum fördert (VARMA *et al.* 2000, PEŠKAN-BERGHÖFER *et al.* 2004, OELMÜLLER *et al.* 2005).

Ein großer Vorteil im Vergleich zu den obligat biotrophen AMP liegt darin, dass *P. indica* auf verschiedenen Komplex- und Minimalmedien kultivierbar ist. Dies ermöglicht die Inokulumproduktion ohne einen Wirt und eröffnet dadurch Möglichkeiten zur kommerziellen Nutzung und damit zur biologischen Resistenzerhöhung und Wachstumsförderung in der Agrarwirtschaft (VARMA *et al.* 1999/2000, SINGH *et al.* 2000).



**Abb. 1.4:** *Piriformospora indica*  
 A und B zeigen *P. indica* auf Festmedium bzw. in Flüssigkultur wachsend. Auf den Bildern C und D sind Chlamydosporen in Wurzelhaaren (C+D) bzw. Rhizodermiszelle (C) zu sehen.  
 Quellen:  
 C+D: <http://www.uni-giessen.de/uni/broschuere/sfb.html>

## 1.7 ZIELSETZUNG

Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem Pathosystem Gerste – *Fusarium*. In diesem System sollten Gene identifiziert werden, die in Blättern nach Infektion mit *F. culmorum* im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollpflanzen differentiell exprimiert waren. Dazu wurden *macroarray*-Analysen durchgeführt, bei denen die Expression von 1536 verschiedenen Genen untersucht wurde. Das Material für diese Analysen stammte aus zwei unabhängigen Versuchen, bei denen jeweils die Blätter der weniger anfälligen Gerstensorte Nickel und die der stark anfälligen Sorte Maresi mit *F. culmorum* inokuliert worden waren.

Von den differentiell exprimierten Genen aus dieser Analyse wurden solche mit interessanten Homologien als Kandidatengene ausgewählt. Die Expression dieser Kandidatengene wurde in



weiteren Blatt- bzw. Ähreninfektionsversuchen mit Gersten- und Weizenpflanzen mittels *two-step* Reverser Transkriptions-PCR charakterisiert.

Ein zentraler Teil dieser Arbeit bestand in der funktionellen Analyse der Kandidatengene, um ihre Beteiligung an der Resistenz gegenüber Fusariumpilzen zu überprüfen. Da das Generieren transgener Gerstenpflanzen für diese Arbeit zu zeitaufwändig gewesen wäre, wurde die funktionelle Analyse der Kandidatengene im System Arabidopsis – *F. culmorum* bzw. *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* durchgeführt. Da eine große Kollektion von T-DNA-Insertionslinien im *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) vorhanden war, konnten von dort verschiedene Linien bezogen werden, die in einem der Kandidatengene eine *knock-out* Mutation trugen. Neben dem Einfluss der Kandidatengene auf die Resistenz gegenüber *Fusarium* wurde zudem die Rolle verschiedener Signalwege (SA, JA und ET) für die Resistenzausprägung untersucht. Auch hier stand eine ganze Palette an Arabidopsismutanten, die in einem der Signalwege gestört waren, zur Verfügung.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* sowie des Pathogens *F. graminearum* bei Wurzelbefall auf den Ertrag der Gerste unter Freilandbedingungen. Dabei wurden nicht nur im Hinblick auf wachstums- und ertragsfördernden Effekte des Wurzelendophyten bzw. eine ertragsmindernde Wirkung des Pathogens untersucht, sondern auch eine möglicherweise induzierte Resistenz in den Pflanzen durch *P. indica*-Besiedelung gegenüber einer Infektion durch *F. graminearum*.



## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 PFLANZENMATERIAL UND ANZUCHTBEDINGUNGEN

#### 2.1.1 Gersten- und Weizenkultivare

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wintergerstensorten Jolante (H.-U. Hege, Waldenburg), Nickel (Borries-Eckendorf, W. von GmbH & Co., Leopoldshöhe) und Uschi (NORDSAAT, Saatucht GmbH, Böhnshausen) sowie die Sommergerstensorten Annabell (Saatucht Ackermann, Irlbach), Maresi (Lochow-Petkus, Wohlde) und Ingrid (James McKey, University of Uppsala, Schweden) verwendet.

Die Weizensorte Nandu stammte von Wilhelm Schäfer (Biozentrum Klein Flottbek, Abteilung für Molekulare Phytopathologie und Genetik, Uni Hamburg), Remus von Herrmann Bürstmayr (IFA-Tulln, Abt. Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Österreich). Die Weizensorte Sumai 3 wurde von Jerzy Chelkowski (Institute of Plant Genetics, Poznan, Polen) zur Verfügung gestellt.

Das Saatgut wurde zunächst für 48 h auf feuchtem Filterpapier im Dunkeln vorgekeimt, zu jeweils fünf Körnern pro 250 ml-Topf (für Blattinfektionen) und einzeln in 70 ml-Töpfe (für Ähreninfektionen) ausgelegt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Bei der verwendeten Erde handelte es sich um Einheitserde Typ ED 73 (Einheitserde- und Humuswerke Gebr. Patzer GmbH & Co KG, Sinntal-Jossa). Für Blattinokulationen wurden die Pflanzen bis zum voll ausgebildeten Primärblattstadium in Klimakammern oder Klimaschränken bei 18 – 22 °C, 60 % relativer Luftfeuchte und einer Lichtperiode von 16 h mit 50 – 60  $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$  kultiviert. Für Ähreninfektionen wurden die Pflanzen nach drei Wochen jeweils zu zweit in 5 l-Töpfe umgetopft (Fruhstorfer Erde Typ T, Industrie-Erdenwerk Archut GmbH u. Co. KG, Lauterbach-Wallenrod) und bei 18 °C und 65 % Luftfeuchte bis zur Blüte kultiviert.

#### 2.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Bei den verwendeten *Arabidopsis*-Ökotypen handelt es sich um Columbia, Landsberg erecta und Wasilewskija. Die Mutanten und Transgenen wurden mit zwei Ausnahmen (*mpk4* aus Landsberg erecta und *pad5* aus Glabra [bildet keine Trichome]) aus Columbia generiert. Alle verwendeten Mutanten und Transgene sind in folgender Tabelle 2.1 aufgelistet:

Tab. 2.1: Übersicht über verwendete Arabidopsis Mutanten und Transgene

GEN	BEZEICHNUNG	KURZBESCHREIBUNG	CODE (arabidopsis.org)	QUELLE	REFERENZ
<b>im SA-pathway gestört</b>					
<i>npr1-2</i>	<i>non expresser of PR genes</i>	SA/INA insensitive, keine SAR	CS3801	Nick Schlaich (RWTH, AC)	1
<i>npr1-3</i>	<i>non expresser of PR genes</i>	SA/INA insensitive, keine SAR	CS3802	Nick Schlaich (RWTH, AC)	1
<i>acd2</i>	<i>accelerated cell death</i>	erhöhte SA und PR-Gen Expression, spontane Läsionen	CS3734 (2-2) (N3734)	NASC	2
<i>pad1</i>	<i>phytoalexin deficient</i>	keine Phytoalexin-Akkumulation	CS3803	Nick Schlaich (RWTH, AC)	1
<i>pad2</i>	<i>phytoalexin deficient</i>	keine Phytoalexin-Akkumulation	CS3804	Nick Schlaich (RWTH, AC)	1
<i>pad4</i>	<i>phytoalexin deficient</i>	vermittelt TIR-NBS-LRR antworten	CS3806 (4-1) (N3806)	NASC	1
<i>pad5</i>	<i>phytoalexin deficient</i>	keine Phytoalexin-Akkumulation	CS3807 (5-1, Glabra) (N3807)	NASC	1
<i>eds4</i>	<i>enhanced disease susceptibility</i>	erhöhte Pathogenanfälligkeit (z.B. <i>P. syringae</i> )	CS3799 (4-1) (N3799)	NASC	3
<i>eds5</i>	<i>enhanced disease susceptibility</i>	erhöhte Pathogenanfälligkeit (z.B. <i>P. syringae</i> )	CS3735 (5-1) (N3735)	NASC	3
<i>edr1</i>	<i>enhanced disease resistance</i>	schnelle Aktivierung von Abwehrgenen	SALK_I19323 (N619323)	NASC	4
<b>im ET-pathway gestört</b>					
<i>etr1-1</i>	<i>ethylen resistant</i>	ET insensitive / keine ISR	CS3070 (1-3) (N3070)	Yves Marco (UTM, F)	5
<i>ein2-1</i>	<i>ethylen insensitive</i>	ET insensitive	CS3071	Nick Schlaich (RWTH, AC)	6
<i>eto3</i>	<i>ethylen over-producer</i>	erhöhte ET Produktion	CS3072	Yves Marco (UTM, F)	6
<b>im JA-pathway gestört</b>					
<i>jar1-1</i>	<i>jasmonate resistant</i>	verminderte JA-induzierte PR-Genexpression	CS8072 (1-1) (N8072)	Yves Marco (UTM, F)	7
<i>jin1</i>	<i>jasmonate insensitive</i>	JA insensitive	SALK_017005 (N517005)	NASC	8
<i>col1</i>	<i>coronatine insensitive</i>	blockiert JA-Signalweg	SALK_035548 (N535548)	NASC	9
<i>mpk4</i>	<i>MAPK4 mutant</i>	negativer Regulator der SAR	CS5205 (4-1, Ler) (N5205)	NASC	10
<i>cev1</i>	<i>constitutive expression of VSP1</i>	verstärkt JA-vermittelte PR-Genexpression	CS6201 (N6201)	NASC	11
<i>fad7-1</i>	<i>fatty acid desaturase mutant</i>	keine JA Synthese	CS209 (7-1) (N209)	NASC	12
<i>fad8-1</i>	<i>fatty acid desaturase mutant</i>	keine JA Synthese	CS8036 (7-1, 8-1) (N8036)	NASC	12
<i>atml</i>	<i>abnormal inflorescence meristem</i>	Störung der JA Synthese	SAIL_1303_D11 (N848762)	NASC	13

1: GLAZEBROOK et al. 1996; 2: GREENBERG et al. 1994; 3: ROGERS & AUSUBEL 1997; 4: FRYE et al. 1998; 5: BLEEKER et al. 1988; 6: GUZMAN & ECKER 1990; 7: BERGER et al. 1996; 8: STASWICK et al. 1992; 9: FEYS et al. 1994; 10: PETERSEN et al. 2000; 11: ELLIS & TURNER 2001; 12: MCCONN & BROWSE 1996; 13: RICHMOND & BLEEKER 1999

GEN	BEZEICHNUNG	KURZBESCHREIBUNG	CODE (arabidopsis.org)	QUELLE
<b>ROI-Produktion / -Abbau</b>				
<i>glp2A</i>	<i>germin like protein 2A</i>	Oxalat-Oxidase, Expression in unreifen Schoten	SALK_144510 (N644510)	NASC
<i>glp4</i>	<i>germin like protein 4</i>	Oxalat-oxidase, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion	SALK_099889 (N599889)	NASC
<i>glp6</i>	<i>germin like protein 6</i>	Oxalat-oxidase, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion	SALK_037795 (N537795)	NASC
<i>glp7</i>	<i>germin like protein 7</i>	Oxalat-oxidase, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion	SALK_012420 (N512420)	NASC
<i>glp8</i>	<i>germin like protein 8</i>	Oxalat-oxidase, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion	SALK_101386 (N601386)	ABRC
<i>glp10</i>	<i>germin like protein 10</i>	Oxalat-oxidase, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion	SALK_065289 (N565289)	NASC
<i>2og</i>	<i>2-oxoglutarate-dependent dioxygenase</i>	Beteiligung an <i>oxidative burst</i> / Zelltod?	SALK_050137 (N629938)	ABRC
<i>per1</i>	<i>peroxidase / rehydrin</i>	nur in Samen exprimiert, antioxidative Wirkung	SALK_133714 (N633714)	NASC
<i>pp1</i>	<i>peroxidase 23a</i>	Zellwandsynthese	SALK_053160 (N553160)	NASC
<i>per</i>	<i>peroxidase</i>	Detoxifizierung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	SALK_055496 (N555496)	NASC
<i>vitc1-1</i>	<i>vitamine C</i>	Vitamin C-defekt, Ozon sensitiv, pathogenresistent	CS8326 (N8326)	NASC
<b>Sonstige</b>				
<i>pdr12</i>	<i>pleiotropic drug resistance-transporter</i>	SA-, JA-, ET responsiv; Entgiftungsprozesse	SALK_116944 (N616944)	NASC
<i>chit1</i>	<i>acidic endochitinase</i>	Hydrolase, hydrolysiert O-Glycosyl-Verbindungen	SALK_095362 (N595362)	NASC
<i>clathrin</i>	<i>clathrin coat assembly protein</i>	Vesikelbildung, Endozytose	SALK_027224 (N527224)	NASC
<i>dad2</i>	<i>defender against cell death</i>	Zelltodinhibitor	SALK_124988 (N624988)	Yves Marco (UTM, F)
<i>mapk</i>	<i>MAPK1, put. MAPK2</i>	Auxin-induziert, Pathogen induziert	SALK_063847 (N563847)	NASC
<i>mdr4</i>	<i>multidrug resistant ABC-transporter</i>	Detoxifizierung	SALK_119210 (N619210)	NASC
<i>pdr12</i>	<i>pleiotropic drug resistance-transporter</i>	2,4-D induziert, Entgiftungsprozesse	SALK_050885 (N550885)	NASC
<i>rela</i>	<i>relA/sptT protein-like</i>	Synthese von pppGpp, Genexpressionsregulation	SALK_122124 (N622124)	NASC
<i>vSNARE13</i>	<i>vesicle-soluble NSF attachment receptor13</i>	Vesikel-Transport	SALK_075261 (N575261)	NASC
<i>vSNARE11</i>	<i>vesicle-soluble NSF attachment receptor11</i>	Vesikel-Transport	SALK_069041 (N569041)	NASC

Zur Vermehrung der Arabidopsis Linien wurden jeweils 5 – 20 Samen pro Linie auf einem Gemisch aus Erde und Sand (2 : 1) in 70 ml-Töpfen ausgesät und für zwei Tage im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Töpfe in Klimaschränke überführt und unter Langtag - Bedingungen (25 °C, 16 h Lichtperiode, 60 % RF) bis zum Abreifen kultiviert. Etwa zwei Wochen nach Aussaat wurden die Pflänzchen einzeln in 70 ml-Töpfe pikiert. Die zum *Screening* (Kap. 2.6) auf ½ MS-Agar wachsenden Pflanzen wurden nach zwei Tagen im Dunkeln bei 4 °C ebenfalls im Klimaschrank unter Kurztag-Bedingungen (24 °C, 8 h Lichtperiode, 70 % RF) kultiviert.

### ½ MS-Agar

2,2 g Murashige & Skoog (MS) Medium (Mikro- u. Makroelemente + Vitamine, Fa. Duchefa, Haarlem, Niederlande) + 10 g Agar-Agar (Roth, Karlsruhe) in 1 l aqua dest. kochen, autoklavieren

Es wurden verschiedene MS-Medien getestet. Nur bei der oben beschriebenen Version konnte der Pilz nicht auf dem Medium wachsen.

## **2.2 PATHOGENE**

### **2.2.1 *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc.**

Der hier verwendete *Fusarium culmorum* (Stamm KF 350) wurde von J. Chelkowski (Institute of Plant Genetics, Poznan, Polen) zur Verfügung gestellt. Bei Bedarf wurde ein infiziertes Korn der bei 4 °C gelagerten Körnerbrut auf ⅓ PDA (*potato dextrose agar*) gelegt und bei 25 °C im Dunkeln kultiviert. Nach 10 Tagen konnten die Konidien abgeschwemmt werden. Die kontinuierliche Kultivierung und Bereitstellung erfolgte durch Rebekka Fensch, IPAZ, Gießen.

### PDA

37,5 g *Potato-Dextrose-Agar* (Duchefa, Haarlem, Niederlande) in 1 l aqua dest. kochen, autoklavieren; für ⅓ PDA wurden entsprechend nur 12,5 g *Potato-Dextrose-Agar* verwendet

### **2.2.2 *Fusarium graminearum* Schwabe**

Der *Fusarium graminearum* Stamm 1003 wurde von Wilhelm Schäfer (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Zur Vermehrung wurden bei Bedarf fünf Tropfen einer Sporenlösung (50.000 Sporen/ml) auf SNA (*slight nutrient agar*) getropft und bei 18 °C und 12 h UV-Licht kultiviert. Neu gebildete Konidien konnten nach 5-7 Tagen abgeschwemmt und zur

Inokulation genutzt bzw. zur Erhaltung bei – 80 °C gelagert werden. Die Kultivierung und Bereitstellung dieses Pilzes erfolgten ebenfalls durch Rebekka Fensch, IPAZ, Gießen.

### SNA

1 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 g	KNO <sub>3</sub>
0,5 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
0,5 g	KCl
0,2 g	Glucose
0,2 g	Saccharose
14g	Agar-Agar

mit aqua dest. auf 1 l auffüllen, autoklavieren

### 2.2.3 *Fusarium oxysporum* Schlecht (verschiedene *formae specialae*)

Die vier verschiedenen *formae specialae* von *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum* (strain-Nr. CBS 100974)

*F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* (strain-Nr. CBS 247.61)

*F. oxysporum* f.sp. *raphani* (strain-Nr. CBS 488.76)

*F. oxysporum* f.sp. *nicotianae* (strain-Nr. 179.32)

wurden vom Centraalbureau voor Schimmelcultures (Fungal Biodiversity Centre, Institute for the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Utrecht, Niederlande) bezogen. Das von dort gelieferte gefriergetrocknete Material wurde zunächst für 5 h in sterilem Wasser geschüttelt und anschließend auf PDA (s. Kap. 2.2.1) getropft. Vermehrung und Erhaltung erfolgten durch Überimpfen kleiner Agarblöcke auf frischen PDA und Kultivierung bei 25 °C im Dunkeln. Die zur Inokulation verwendeten Sporensuspensionen wurden bei – 80 °C gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

## 2.3 BEHANDLUNGEN DES PFLANZENMATERIALS

### 2.3.1 Inokulation von Blättern

Zur Blattinfektion wurden 8 Tage alte Gersten- bzw. Weizenpflanzen liegend von zwei Seiten mit einer Sporensuspension (170.000 Sporen/ml 0,5 %ige Gelatinelösung) besprüht, wobei die Bildung größerer Tropfen vermieden wurde. Es wurde eine Gelatinelösung zur Inokulation verwendet, um eine bessere Haftung der Konidien an den Blättern zu erreichen. Anschließend wurden die Pflanzen in lichtdurchlässige, geschlossene Plastikboxen gestellt (100 % Luftfeuchte) und so bis zum Ende des Versuchs im Klimaschrank (20 °C, 16 h

Lichtperiode, 60 % RF) kultiviert. Die Kontrollpflanzen wurden mit 0,5 %iger Gelatinelösung besprüht und ansonsten analog zu den infizierten Pflanzen behandelt.

Sprühinokulationen zu mikroskopischen Auswertungen oder zum Arabidopsis-*Screening* erfolgten nach dem gleichen Verfahren, die Sporenmenge wurde den Anforderungen entsprechend variiert.

### 2.3.2 Inokulation von Ähren

Die Inokulation der Ähren erfolgte zum Zeitpunkt der Milchreife (BBCH 73 - 75). Bei Gerstenähren wurden 5 µl Sporensuspension (100.000 Sporen/ml Leitungswasser + 0,05 % Tween 20) mit einer Hamilton-Spritze in jedes zweite Ährchen zwischen Vor- und Deckspelze einer Blüte eines Ährchens appliziert. Beim Weizen wurden die 1. und 2. Blüte jedes zweiten Ährchens mit je 5 µl Sporensuspension inokuliert. Um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, wurden die Ähren mit einer angefeuchteten Papiertüte umhüllt. Kontroll-Ähren wurden mit Leitungswasser + 0,05 % Tween 20 inokuliert.

## 2.4 MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

### 2.4.1 Fixierung von Blättern

Zur Fixierung und Entfärbung wurden die inokulierten Blätter in Petrischalen auf Filterpapier gelegt, welches mit verschiedenen Flüssigkeiten getränkt und jeweils nach 24 h ausgetauscht wurde:

2 x	Ethanol/Eisessig (3:1)
2 – 3 x	H <sub>2</sub> O
1 x	50 % Glycerol

### 2.4.2 Färbung pilzlicher Strukturen mit essigsaurer Tinte

Die entfärbten Blätter wurden direkt vor der Mikroskopie mit essigsaurer Tinte (Blaue Tinte [Pelikan]/25 %ige Essigsäure 1:9 [v/v]) gefärbt. Dazu wurden sie für 60 – 90 s in eine mit essigsaurer Tinte gefüllte Petrischale gelegt, leicht darin geschwenkt und anschließend zur Entfernung der überschüssigen Tinte in Wasser geschwenkt.

### 2.4.3 Färbung pilzlicher Strukturen mit WGA Alexa Fluor<sup>®</sup> 488

WGA Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 bindet extra- und intrazellulär an das Chitin in pilzlichen Zellwänden. Die Färbung erfolgte in Anlehnung an DUNCAN & HOWARD (2000). Die entfärbten Blätter wurden zunächst 3 x 5 min in PBS-Puffer gewaschen und anschließend für 20 min in der Färbelösung Vakuumfiltriert.

### Färbelösung

4,9 ml	PBS Puffer (ph 7,4)
50 µl	WGA TMR (1 µg/µl)
50 µl	BSA in <i>aqua dest.</i> (1 µg/µl)

### **2.4.4 Mikroskopie**

Das mit essigsaurer Tinte gefärbte Pilzmyzel wurde mittels Durchlicht (Halogenlampe, 12 V, 100 W) untersucht. Bei dem verwendeten Mikroskop handelt es sich um ein Axioplan 2 imaging - Gerät der Firma Zeiss.

## **2.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN**

### **2.5.1 RNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung**

Zur Extraktion von Gesamt-RNA wurde das Pflanzenmaterial (pro Zeitpunkt und Variante entweder je 10 Blätter bzw. eine komplette Ähre) in einem Mörser in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das so entstandene feine Pulver wurde in Reaktionsgefäße überführt und bei minus 80 °C gelagert. Von diesem homogenisierten Material wurden je ca. 300 mg in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 1,5 ml RNA-Extraktionslösung versetzt und gut durchmischt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, wiederum gut gemischt und die Probe für 15 min unter gelegentlichem Vortexen auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein 15minütiger Zentrifugationsschritt bei 20.800 rcf und 4 °C, während dessen sich drei Phasen bildeten: eine untere Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase, welche Proteine und DNA enthielt und eine obere, wässrige Phase, in der sich die RNA befand. Die obere Phase wurde mit der Pipette abgezogen, in einem weiteren Reinigungsschritt mit 850 µl Chloroform vermischt und erneut zentrifugiert (5 min bei 20.800 rcf, 4 °C). Danach wurde 1 ml der oberen wässrigen Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit gleichem Volumen 5 M Lithiumchlorid versetzt und zur Fällung der RNA über Nacht bei 4 °C gelagert. Durch Zentrifugation für 20 min wurde die RNA pelletiert. Das Lithiumchlorid wurde dekantiert, das Pellet 2 x mit 900 µl 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 50 µl *aqua bidest.*<sub>DEPC</sub> gelöst. Diese RNA-Lösung wurde erneut für 10 min zentrifugiert, um noch vorhandene Polysaccharide abzutrennen, die sich als gelartiges Pellet am Boden des Gefäßes absetzten.

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm (Photometer DU 7400, Beckmann, München;  $OD_{260\text{ nm}} = 1$  bei 40 µg RNA/ml), indem 2 µl der RNA-Lösung mit *aqua bidest.*<sub>DEPC</sub> 1:250 verdünnt wurden.

RNA-Extraktionspuffer:

38,00 ml	Phenol in gesättigtem Puffer
11,82 g	Guanidin Thiocyanat
7,60 g	Ammonium Thiocyanat
3,34 ml	NaAc [3 M]
5,00 ml	Glycerol

---

ad 100 ml mit *aqua bidest.*<sub>DEPC</sub>

*aqua bidest.*<sub>DEPC</sub>:

*aqua bidest.* + 0,1 % [w/v] DEPC (Diethylpyrocarbonat, Fluka Chemie GmbH)

2 h rühren, über Nacht bei 37 °C inkubieren, autoklavieren

**2.5.2 cDNA-Synthese**

Zur Transkription von mRNA in cDNA (s. Tab. 2.2) wurde die RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase von Fermentas Life Sciences, Leon-Rot gemäß dem dazu gehörenden Protokoll verwendet. Pro Reaktion wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA und sowohl ein Oligo dT- als auch ein Random Hexamer-Primer eingesetzt.

**Tab. 2.2: Liste der erstellten cDNA-Banken**

PFLANZENART	PFLANZENTEIL	HERKUNFT DES MATERIALS	NR.	ZEITPUNKTE
Gerste	Blatt	selbst erstellt	GB 1	6, 24, 48 hpi
		selbst erstellt	GB 2	6, 24, 48 hpi
		selbst erstellt	GB 3	6, 24, 48 hpi
	Ähre	selbst erstellt	GÄ 1	0, 24, 48 hpi
		Hamburg (AG Schäfer)	GÄ HH	0, 24, 72 hpi
Weizen	Blatt	selbst erstellt	WB 1	24, 48, 72 hpi
	Ähre	selbst erstellt	WÄ 2	24, 48, 72 hpi

hpi: Stunden nach Inokulation

**2.5.3 Standard-PCR (Polymerasekettenreaktion)**

Die PCR-Reaktionen wurden nach Standardprotokollen (SAMBROOK *et al.* 1989) durchgeführt. Falls nicht gesondert angegeben, wurde als DNA-Polymerase die SupraTherm von GENE CRAFT, Münster, verwendet. Das PCR-Programm war abhängig von den verwendeten Primern und der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Verändert wurden dementsprechend Dauer und Temperatur der einzelnen Schritte sowie die Anzahl der Zyklen des Standardprogramms (Primerliste s. Tab. 6.1).



Standard-Reaktionsansatz:

1–1000ng	DNA
2,5 µl	10 x PCR-Puffer (inklusive 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
2,5 µl	dNTPs (2 mM)
1 µl	<i>Primer fwd</i> (10 pmol/µl)
1 µl	<i>Primer rev</i> (10 pmol/µl)
0,5 u	Taq-DNA-Polymerase
<hr/>	
ad 25 µl	aqua dest.

Standardprogramm:

3 min	94 °C	
<hr/>		
30 s	94 °C	
30 s	55 – 68 °C	25 – 35 Zyklen
1 min	72 °C	
<hr/>		
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

Die verwendeten *Thermocycler* waren entweder von der Firma PerkinElmer, Wellesley, USA (GeneAmp PCR System 2400 bzw. 9700) oder von der MWG-Biotech AG, Ebersberg (Primus 25). Grundsätzlich wurde der Block des *Cyclers* zunächst auf die Denaturierungstemperatur gebracht, bevor die Proben geladen wurden, um unspezifische Amplifikation fehlgebundener Oligonukleotide zu verhindern.

**2.5.4 semi-quantitative *two-step* RT-PCR**

Um die Expression der Kandidatengene zu analysieren, wurde cDNA (s. Kap 1.5.1) in eine Standard-PCR eingesetzt. Die verwendeten Primer sind der Tabelle A1 im Anhang zu entnehmen. Zum Nachweis gleicher Transkriptausgangsmengen wurde die gleichmäßige Expression eines konstitutiven Ubiquitin-Gens (TIGR Acc. No.: TC145698) überprüft.

**2.5.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Bei der Agarose-Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung von DNA-Fragmenten, z.B. PCR-Produkten, über die Siebstruktur der Agarose, d.h. kleineren Fragmenten steht ein geringerer Widerstand gegenüber, sie durchlaufen das Gel im elektrischen Feld dementsprechend schneller. Die Porengröße wird durch die Agarose-Konzentration bestimmt; üblicherweise

wurden 1,5 %ige Gele verwendet, welche eine gute Trennung im Bereich von ca. 0,2 – 3 kb erreichen.

Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TBE verwendet, zum Färben der DNA wurden die Gele mit 0,1 Vol% Ethidiumbromid (Stammlösung, 10 mg/ml) versetzt. Die DNA wurde vor dem Beladen des Gels mit 5 x DNA-Ladepuffer gemischt. Nach der Auftrennung wurde die DNA auf einem UV-Transluminator (Fröbel-Labortechnik, Lindau) bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und mittels einer Videodokumentationsanlage (digitStore, INTAS, Göttingen) auf Thermopapier bildlich festgehalten.

#### 10 x TBE

900 mM	Tris
900 mM	Borsäure
25 mM	EDTA
<hr/>	
in 1 l aqua dest., pH 8,0 mit HCl	

#### 10 x Farbmarker

0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
40 % (w/v)	Saccharose

Der 5 x DNA-Ladepuffer setzt sich aus einem Vol 10 x Farbmarker und einem Vol 10 x TBE zusammen.

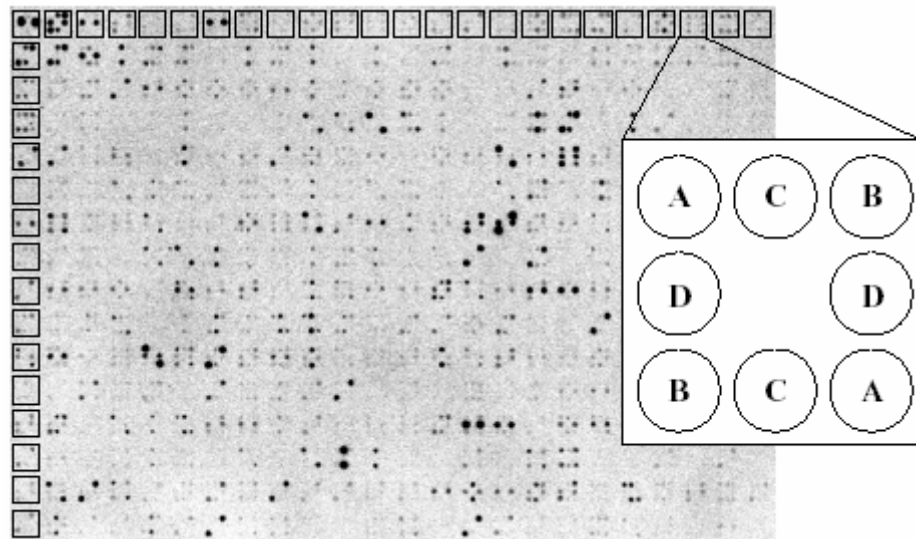
### **2.5.6 GenBank-Sequenzvergleich**

Die Sequenzierung der auf den *macroarrays* befindlichen Genfragmente (s. Kap. 2.5.8) wurde von der Qiagen GmbH, Hilden, und teilweise von der BASF Plant Science GmbH, Ludwigshafen, durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden zunächst mit Hilfe des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, USA)-BLAST Special: *Screen for vector contamination* (VecScreen) von Vektorsequenzen bereinigt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)-Algorithmus gegen die TIGR (*The Institute for Genomic Research*, USA)- bzw. NCBI-Datenbank, wobei nach Übereinstimmungen mit Sequenzen anderer Gene oder ESTs (*expressed sequence tags*) gesucht wurde (ALTSCHUL *et al.* 1997). Der Vergleich mehrerer Sequenzen miteinander erfolgte durch *alignments*, die mit Hilfe von *ClustalW* (*European Molecular Biology Laboratory [EMBL] outstation – European Bioinformatics Institute [EBI]*, HIGGINS *et al.* 1994) bzw. NCBI-BLAST Special: *Align two Sequences* (bl2seq) erstellt wurden.

### 2.5.7 Radioaktiver reverser *Northern*

Bei reversen *Northern*-Analysen sind im Vergleich zu *Northern*-Analysen mobiler und fixierter Hybridisierungspartner vertauscht: Es werden bekannte cDNAs und nicht die zu untersuchende RNA auf eine Membran gebracht. Hybridisiert werden die cDNAs mit komplexen cDNA-Sonden, die aus der Poly-A<sup>+</sup>-RNA des zu untersuchenden Materials generiert wurden.

Die hier verwendeten *macroarrays* wurden vom IPK Gatersleben (Uwe Sonnwald) zur Verfügung gestellt. Die 1536 auf die Membranen gedoteten Genfragmente wurden von Patrick Schäfer (IPAZ, Gießen) in Zusammenarbeit mit dem IPK aus epidermalem Blattgewebe der Sorte Ingrid WT, welches mit Kulturfiltrat von *Bipolaris sorokiniana* behandelt wurde, isoliert. Die Organisation der cDNA-*spots* auf dem Filter ist in Abb. 2.1 dargestellt:



**Abb. 2.1 Organisation der cDNA-Spots auf den *macroarrays***  
Auf die Filter wurden 1536 verschiedene cDNAs mit je zwei Replikaten gespottet. Die cDNA-Fragmente sind in 16 x 24 Gruppen von jeweils neun Spots aufgeteilt. Jede Gruppe enthält zwei Replikate von 4 cDNAs (A-D) sowie einen freien neunten ‚Spot‘ als Hintergrundkontrolle in der Mitte.

#### 2.5.7.1 Herstellung komplexer cDNA-Sonden

Zur Isolierung von mRNA wurden ca. 300 mg in flüssigem Stickstoff gemörserteres Blattmaterial in 1,5 ml Lysis-Puffer homogenisiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Probe beim Auftauen vollständig mit dem Puffer bedeckt war. Diese Suspension wurde zweimal bei 20.800 rcf und 4 °C zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde, welches nach dem zweiten Zentrifugationsschritt in Lysis-Puffer äquilibrierte Dynabeads<sup>®</sup> (Invitrogen, Karlsruhe) enthielt. Durch langsames

Schwenken über Kopf für 5 min erfolgte die Isolierung der mRNA über die Bindung des polyA-Endes der RNA an den Oligo(dT)<sub>25</sub>-Schwanz der Dynabeads<sup>®</sup>. Nach anschließender magnetischer Trennung wurde der Überstand verworfen und die Dynabeads<sup>®</sup> dreimal mit jeweils 500 µl Wasch-Puffer und danach mit 250 µl RT-Puffer gewaschen. Für die darauf folgende Erststrangsynthese wurde die AMV Reverse Transcriptase von Promega, Madison, USA verwendet:

10,0 µl	5x AMV RT-Puffer
0,5 µl	DTT (100 mM)
12,5 µl	dNTP-Mix (2mM)
1,5 µl	RNase-Inhibitor (30 u/µl, MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
3,0 µl	AMV Reverse Transcriptase (10 u/µl)

ad 50,0 µl *aqua bidest*

Dieser Ansatz wurde zu den Dynabeads<sup>®</sup> pipettiert und für eine Stunde bei 42 °C inkubiert, wobei das Reaktionsgefäß alle zehn Minuten zur Vermischung des Inhalts kurz geschüttelt wurde. Nach magnetischer Trennung wurden die Dynabeads<sup>®</sup> mit 250 µl RT-Puffer gewaschen und danach zur Elution der RNA/cDNA-Hybride zweimal mit 50 µl Elutions-Puffer für zwei Minuten bei 95 °C inkubiert. Der Überstand wurde bei diesem Elutionsschritt jeweils ohne Verzögerung abgenommen und verworfen. Die Dynabeads<sup>®</sup> mit dem Erststrang wurden anschließend zweimal mit 250 µl *aqua bidest*. gewaschen. Zur Herstellung der Sonde wurde nun folgender Ansatz zu den Dynabeads<sup>®</sup> pipettiert:

35 µl	<i>aqua bidest</i> .
5 µl	Primerlösung (dN)6-Random Primer *
<hr/>	
3 Minuten bei 95 °C inkubieren	
<hr/>	
10 µl	Labelling Puffer *
5 µl	α-33P-dCTP (10 µCi/µl) **
1 µl	Klenow-Polymerase (10 u/µl) ***

\* Megaprime DNA Labeling Kit, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

\*\* Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

\*\*\* USB, Cleveland, USA

Nach Inkubation für eine Stunde bei 37 °C, wobei die Reaktionsgefäße zur Vermischung des Inhalts alle 10 min geschüttelt wurden, wurde der Überstand nach magnetischer Trennung entfernt und die Dynabeads mit 150 µl Elutionspuffer gewaschen. Die Elution der Sonde erfolgte durch zweimalige Inkubation der Dynabeads mit 150 µl Elutionspuffer bei 95 °C und anschließendem sofortigen Abnehmen des Überstands. Die vereinigten Überstände wurden über 0,2 µm Anopore<sup>™</sup>-Säulchen (Whatman, Maidstone, England) aufgereinigt. Die

Aktivität der Sonde wurde mit dem *Multi-Purpose Scintillation Counter* (Beckmann Coulter, Krefeld) bestimmt, um gleiche Aktivitäten der zu vergleichenden Sonden einsetzen zu können. Sonden mit 150.000 – 200.000 cpm wurden als optimal angesehen, diejenigen mit weniger als 100.000 cpm wurden nicht verwendet.

#### Lysis-Puffer

100 mM	Tris
500 mM	LiCl
10 mM	EDTA
1 %	LiDS
5 mM	DTT

pH 8,0 mit HCl; DTT wurde erst nach dem Autoklavieren am Tag der Sondensynthese zugesetzt.

#### Wasch-Puffer

10 mM	Tris
150 mM	LiCl
1 mM	EDTA
0,1 %	LiDS

pH 8,0 mit HCl; LiDS wurde erst nach dem Autoklavieren am Tag der Sondensynthese zugesetzt.

#### RT-Puffer

50 mM	Tris
50 mM	KCl
10 mM	MgCl x 6 H <sub>2</sub> O

pH 8,3 mit HCl; die angesetzte fünffach konzentrierte Stammlösung wurde kurz vor der Sondensynthese entsprechend verdünnt.

#### Elutionspuffer

2 mM	EDTA
------	------

Alle hier verwendeten Puffer wurden mit *aqua bidest.*<sub>DEPC</sub> angesetzt und nach dem Ansetzen autoklaviert.

#### **2.5.7.2 Hybridisierung mit komplexen cDNA-Sonden**

Die zu hybridisierenden Filter wurden mit 6 x SSC angefeuchtet und dann in Hybridisierungsröhren bei 65 °C in 15 ml Hyb-Lösung, die Lachssperm enthielt, für zwei

Stunden prähybridisiert. Anschließend wurde diese Lösung entfernt und durch 10 ml frische Hyb-Lösung ersetzt, der außerdem die für 10 min bei 95 °C denaturierte Sonde zugegeben wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht ebenfalls bei 65 °C.

Am folgenden Tag wurden die Filter nach Entfernen der Sonde für 15 min in 0,2 x SSC / 0,1 % SDS und für weitere 15 min in 0,1 x SSC / 0,1 % SDS gewaschen. Anschließend wurden die Filter auf mit 0,2 x SSC / 0,2 mM NaN<sub>3</sub> angefeuchtete Whatman-Papiere gelegt und luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die Exposition der Filter erfolgte für ein bis drei Tage auf Fuji BAS-MS 2025 *screens*. Diese wurden mit einem *Molecular Imager FX phosphoimager* (BIO-RAD, München) ausgelesen.

#### Hyb-Lösung

20,0 ml	100 x Denhardt's (1g Ficoll, 1g Polyvinylpyrolidone, 1g BSA auf 50 ml <i>aqua bidest.</i> )
133,2 ml	20 x SSC
20,0 ml	10 % SDS
<hr/>	
ad 400 ml mit <i>aqua bidest.</i> + 500 µl Lachssperm (10 mg/l) / 50 ml	

#### **2.5.7.3 Auswertung der Filterscans**

Zur Auswertung der Signale auf den Filtern wurde das Programm Array Vision 7.0 bzw. 8.0 (Imaging Research Inc., St. Catharines, Kanada) verwendet. Dieses Programm ermittelt die Intensitäten der einzelnen Signale sowie die des Hintergrunds um die Signalgruppen. Diese Rohdaten wurden mit dem Statistikprogramm R 2.0.1 (<http://www.r-project.org>) weiter ausgewertet. Dabei wurden die Signalstärken über den Median der Signalstärken der verschiedenen Filter normalisiert. Anschließend wurden die Signale ausgeschlossen, die nicht mindestens fünffach über dem lokalen Hintergrund lagen oder deren Replikate sich um mehr als den Faktor 1,5 voneinander unterscheiden. Aus den verbleibenden Signalen wurden letztlich diejenigen ausgewählt, die eine Veränderung in der Signalintensität um mehr als den Faktor 2,5 zeigten.

#### **2.5.7.4 Entfernen der Sonden von den Filtern**

Die Filter wurden zunächst mit kochendem 0,1 x SSC / 0,1 % SDS bedeckt, für 20 min bei 65 °C und danach für 15 min in 0,4 M NaOH / 0,1 % SDS bei RT geschüttelt. Anschließend wurden sie 2 x für mindestens 15 min bei RT in 0,2 M TrisHCl (pH 7,4) / 0,1 x SSC / 0,1 % SDS gewaschen. Danach wurden die Filter wie in Kap. 2.5.8.2 beschrieben in Folie eingewickelt und die vollständige Entfernung der Sonde vor einer erneuten Benutzung überprüft. Ggf. wurde der gesamte Vorgang wiederholt.

## 2.6 ARABIDOPSIS-SCREENING

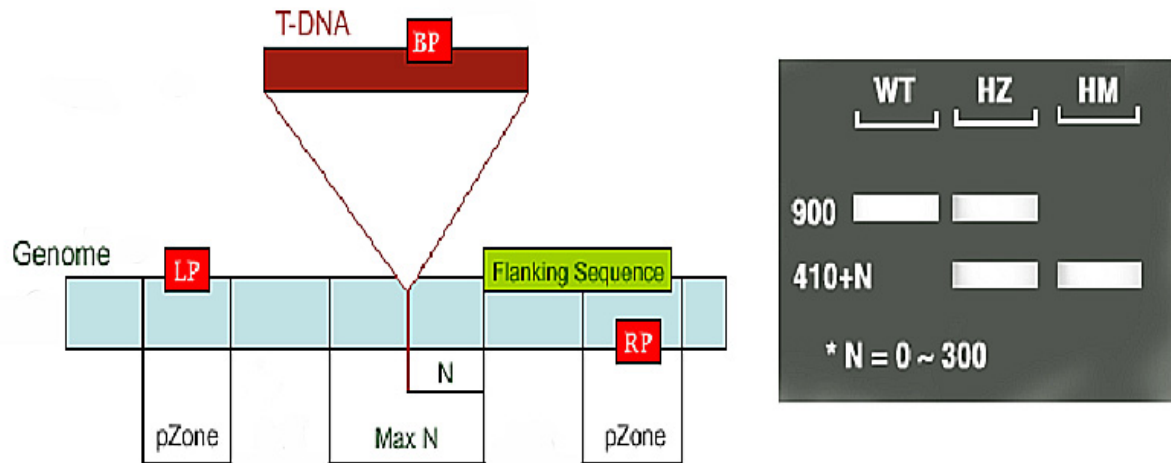
Das *screening* der verschiedenen Arabidopsis Mutanten und Transgenen diente zum einen der funktionellen Analyse verschiedener Kandidatengene (teilweise aus den *macroarray*-Analysen erhalten [Kap. 2.5.8]) im Pathosystem Arabidopsis – *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* bzw. *F. culmorum*. Zum anderen sollte eine mögliche Beteiligung verschiedener Signalwege untersucht werden, indem Mutanten gescreent wurden, die in diesen Signalwegen gestört sind (s. Tab. 2.1).

### 2.6.1 Nachzucht homozygoter T-DNA-Insertionslinien

Die potentiell T-DNA tragenden Arabidopsis-Pflanzen wurden wie in Kap. 2.1.2 beschrieben angezogen. Zur Unterscheidung der nicht-transgenen Pflanzen von heterozygot bzw. homozygot Transgenen wurde DNA mittels des REExtract-N-Amp<sup>TM</sup> Plant PCR Kits (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) extrahiert und analysiert. Dazu wurde von zwei – drei Wochen alten Pflanzen je eine kleine Blattprobe genommen (ca. 2 – 3 mm Ø), in 60 µl *Elution-Buffer* für 10 min bei 95 °C inkubiert und danach mit 60 µl *Dilution-Buffer* versetzt. Dieses Blattextrakt wurde in folgendem Ansatz für eine 3-Primer-PCR verwendet:

3,1 µl	<i>aqua dest.</i>
4,5 µl	REExtract-N-Amp PCR ReadyMix
0,7 µl	Primer-Mix LP + RP (10 pmol/µl) des jeweiligen Kandidatengens
0,7 µl	BP (10 pmol/µl)
3,0 µl	Blattextrakt

Das verwendete PCR-Programm entsprach dem einer normalen PCR, als *annealing*-Temperatur für die Primer wurden 57 °C gewählt, die Elongationszeit betrug jeweils eine Minute, da das größte erwartete Fragment eine Länge von ca. 1 kb besaß. Das Prinzip zur Unterscheidung der drei verschiedenen genetischen Hintergründe der Arabidopsis-Pflanzen mit Hilfe dieser PCR ist in Abb. 2.2 erklärt. Die Primer wurden mit Hilfe des *T-DNA-Primer Design Tools* (Genome Express Browser Server, <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html>) ermittelt. Durch diese Software erhält man nach Angabe der jeweiligen Linie nicht nur die zu verwendenden Primer und deren *annealing*-Temperaturen, sondern auch die Größe des bei vorhandener T-DNA erwarteten PCR-Produkts.



**Abb. 2.2:** Das Prinzip der 3-Primer-PCR:

Es werden jeweils zwei genspezifische Primer verwendet, die rechts (RP = *right primer*) bzw. links (LP = *left primer*) von der T-DNA liegen sowie ein T-DNA-spezifischer Primer BP (*border primer*), welcher auf der T-DNA liegt und in Richtung des linken Endes der T-DNA verlängert wird. Die Lage der Primer RP und LP ist so gewählt, dass sie bei nicht-transgenen Pflanzen ein PCR-Produkt von ca. 900 – 1100 bp ergeben. Im Fall einer T-DNA-Insertion ergeben BP und RP ein Produkt von 410 – 710 bp. Bei WT-Pflanzen (WT) findet man also ein ~ 1 kb großes Produkt, für heterozygote Pflanzen (HZ) findet man zusätzlich zu dem 1 kb-Produkt noch ein kleineres. Bei homozygot (HM) Transgenen ergibt sich nur das kleinere Produkt, da mit den RP/LP-Primern aufgrund der Größe der T-DNA (ca. 4 kb) keine Amplifikation erreicht wird.

Auf homozygote Pflanzen wurde zu Beginn der Blütenbildung eine Plastikröhre (Arasystem 360 Kit, Gent, Belgien) gesteckt, um Fremdbestäubung zu vermeiden.

### 2.6.2 Das Screening auf Resistenz gegenüber *Fusarium*

Pro Experiment wurden von jeder Arabidopsis Mutationslinie drei Petrischalen (Ø 8,5 cm) mit je ca. 50-100 Pflanzen/Schale auf ½ MS-Agar ca. drei Wochen wie in Kap. 2.1.2 beschrieben kultiviert. Anschließend wurden diese Pflanzen sprühinokuliert (ca. 1 ml/Schale): eine Petrischale diente als Kontrolle und wurde mit Wasser + 0,05 % Tween besprüht, eine Schale mit *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* (200.000 Sporen/ml) und die dritte mit *F. culmorum* (100.000 Sporen/ml). Fünf bis acht Tage nach Inokulation erfolgte die Auswertung durch Fotografieren der einzelnen Schalen und Vergleich der Befallstärke im Vergleich zum Wildtyp.



## 2.7 ERTRAGSVERSUCH

Die Besiedelung von Pflanzen mit dem Wurzelendophyten *Piriformospora indica* führt bei zahlreichen mono- und dikotylen Pflanzenarten zu deutlichen Wachstumsverbesserungen. Auch für Gerste konnte in Gefäßversuchen bereits gezeigt werden, dass die Anwesenheit von *P. indica* zu einer Erhöhung der Biomasse und zur Steigerung des Kornertrags führt. Neben diesem Wachstumseffekt konnte ebenfalls eine induzierte Resistenz gegenüber dem echten Gerstenmehltaupilz *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* beobachtet werden. (WALLER *et al.* 2005). Diese Ergebnisse sollen in dieser Arbeit zum Teil wiederholt und um einen weiteren Parameter, das Pathogen *Fusarium graminearum*, erweitert werden.

### 2.7.1 Kultivierung von *Piriformospora indica*

Um genügend Myzel bzw. Sporenmasse von *P. indica* für diesen Versuch zu erhalten, wurde CM (*complex medium*) auf 300 ml-Erlenmeyerkolben verteilt (je 150 ml/Kolben) und mit einem mit *P. indica* bewachsenen CM-Agarblöckchen angeimpft. Die Kolben wurden so für drei Wochen bei 25 °C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Zur Inokulation wurde das Medium abgeschüttet und die in den Kolben gebildeten Hyphen/Sporenbällchen zusammenschüttet, geschräddert und direkt zur Inokulation benutzt (s. Kap. 2.7.2).

#### CM (*complex medium*):

10 g	20 x Salzlösung*
20 g	Glucose
2 g	Pepton
1 g	Hefeextrakt
1 g	Casaminosäuren
1 ml	Mikroelemente

mit *aqua dest.* auf 1 l auffüllen, autoklavieren

#### \* 20 x Salzlösung:

120 g	NaNO <sub>3</sub>
10,4 g	KCl
10,4 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
30,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

mit *aqua dest.* auf 1 l auffüllen, autoklavieren

**2.7.2 Versuchsaufbau & Anzuchtbedingungen**

Die drei Gerstenkultivare Annabell, Ingrid und Maresi wurden in Gefäßversuchen unter Freiland-Bedingungen systematisch untersucht. Zur Anzucht wurden die zwei bis drei Tage alten Keimlinge jeweils zu zweit in einen 200 ml-Topf mit einem Gemisch aus Seramis und Oildri (2 : 1) getopft. Die Hälfte der Keimlinge wurde dabei direkt durch Gießen eines Sporen-/Hyphen-Gemisches (2 g/Topf) in das Pflanzloch mit *P. indica* inokuliert. Anschließend wurden die Pflanzen für vier Wochen im Gewächshaus kultiviert (16 h Lichtperiode [30 klux], 60 % RF, 18 °C und in der Dunkelperiode 14 °C). Nach dieser Zeit wurden die Pflanzen in Mitscherlich Töpfe in überführt (6 Pflanzen/Topf = 1 Wiederholung) und am Standort Rauischholzhausen (Marburg) unter Freilandbedingungen weiter kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte auch die Inokulation mit *F. graminearum* durch Pipettieren einer Makrokonidienlösung an die Wurzeln der Pflanzen (10<sup>6</sup> Konidien/Pflanze). Das in diesen Töpfen befindliche Substrat war ein Gemisch aus Sand und Ackerboden der Vorfrucht Kartoffel (2 : 1), dem zusätzlich als Nährstoffe 0,25 g N, 0,4 g P, 1,6 g K, 0,2 g Mg sowie 1,5 g CaCO<sub>3</sub> zugefügt wurden. Eine zweite Stickstoffgabe mit 0,25 g N pro Topf erfolgte zum Beginn des Schossens (BBCH 31). Insgesamt gab es pro Variante und Kultivar sechs Wiederholungen sowie ein bis zwei Zusatzgefäße für Wurzelbohrungen, um die Besiedelung mit *P. indica* bzw. *F. graminearum* zu kontrollieren. Der genaue Versuchsaufbau ist in Abb. 2.3 dargestellt.

		cv. Maresi	cv. Annabell	cv. Ingrid	cv. Maresi	cv. Annabell	cv. Ingrid
<b>Kontrolle</b>	<b>Kontrolle</b>	6 Wdh.	6 Wdh.	6 Wdh.			
	<b><i>F. graminearum</i></b>				6 Wdh.	6 Wdh.	6 Wdh.
	<b>Anzahl Pflanzen</b>	36	36	36	36	36	36
	<b>Anzuchttopfe</b>	18	18	18	18	18	18
Gewächshaus Freiland	<b>M.-Gefäße</b>	6	6	6	6	6	6
<b><i>P. indica</i></b>	<b>Kontrolle</b>	6 Wdh.	6 Wdh.	6 Wdh.			
	<b><i>F. graminearum</i></b>				6 Wdh.	6 Wdh.	6 Wdh.
	<b>Anzahl Pflanzen</b>	36	36	36	36	36	36
	<b>Anzuchttopfe</b>	18	18	18	18	18	18
Gewächshaus Freiland	<b>M.-Gefäße</b>	6	6	6	6	6	6

**Abb. 2.3 Übersicht über den Aufbau des Ertragsversuchs unter Freilandbedingungen.**

Es wurden die drei Gerstenkultivare Annabell, Maresi und Ingrid untersucht. Verglichen wurden jeweils vier verschiedene Behandlungen: unbehandelt (grüner Rahmen), *F. graminearum*-Infektion (blauer Rahmen), *P. indica*-Besiedelung (gelber Rahmen) und der Einfluss der Simultaninokulation mit beiden Pilzen (roter Rahmen). Pro Kultivar und Variante wurden sechsunddreißig Pflanzen untersucht. Für die Anzucht im Gewächshaus wurden je zwei Pflanzen in 200 ml-Töpfen angezogen. Nach Überführung in Freiland-Bedingungen wurden je sechs Pflanzen in ein Mitscherlich-Gefäß (= 1 Wiederholung [Wdh.]) getopft.

Gegen den unerwünschten Befall mit Pathogenen, welche Einfluss auf den Ertrag haben könnten, wurden das Blattfungizid Opus Top (250 g l<sup>-1</sup> Fenpropimorph, 84 g l<sup>-1</sup> Epoxiconazol, BASF, Ludwigshafen) bzw. das Insektizid Karate (100 g l<sup>-1</sup> lambda-Cyhalothrin, Syngenta Agro, Maintal) eingesetzt.

### **2.7.3 Untersuchung der Parameter Wachstum, Chlorophyll, Entwicklung und Ertrag**

#### Wachstum




Um den Einfluss der beiden Pilze auf das Wachstum der Gerstenkultivare zu untersuchen, wurden an vier Zeitpunkten die Wuchshöhen der Pflanzen bestimmt. Gemessen wurde dabei je Wiederholung die größte Pflanze: nach 7 und 9 Wochen bis zum Fahnenblatt, nach 12 und 14 Wochen bis zur Grannenspitze. Zur Auswertung wurden von den sechs gemessenen Wiederholungen die Mittelwerte gebildet und die vier verschiedenen Behandlungen im Zeitverlauf mittels Liniendiagramm miteinander verglichen. Die Signifikanzen wurden mittels ungepaarten Student's t-Tests ermittelt.

#### Chlorophyllgehalt der Blätter

Die Messung des Chlorophyllgehalts erfolgt mit Hilfe des Gerätes CCM-200 (Opti-Sciences Inc., Tyngsboro, MA, USA). Dieses Gerät ermöglicht die Messung des relativen Chlorophyllgehalts ohne die Pflanzen zu beschädigen. Das CCM-200 nutzt zwei Wellenlängen für die Absorptionsmessung. Eine Wellenlänge fällt in den Bereich der Chlorophyllabsorption (~ 600 – 700 nm, Rotspektralbereich), die andere dient dazu, physische Unterschiede wie z.B. die Gewebedicke einzubeziehen (~ 850 – 1000 nm, Infrarotbereich). Aus den Messungen dieser beiden Wellenlängen wird der Chlorophyll-Gehalt-Index (*chlorophyll content index* = cci) errechnet und ausgegeben. Die Chlorophyllmessungen wurden 7 und 9 wpi immer in der gleichen Blattetage im Bereich der jüngsten vollentwickelten Blätter bzw. des Fahnenblattes durchgeführt.

#### Entwicklung

Dieser Parameter wurde durch Beobachtung der Ährenentwicklung untersucht. 10, 11 und 12 Wochen nach *P. indica*-Inokulierung wurde das Entwicklungsstadium aller Ähren pro Wiederholung nach dem in Abb. 2.4 dargestellten Kriterien festgehalten. Zur Auswertung wurden die Entwicklungsstadien aller Behandlungen der drei Kultivare in einem Säulendiagramm dargestellt, wobei die drei Klassen in gestapelten Säulen zusammengefasst wurden. Die Signifikanzen wurden mittels ungepaarten Student's t-Tests ermittelt.

	Klasse 1	Klasse 2	Klasse3
Erscheinungsbild:			
Beschreibung:	nur Grannen sichtbar	Grannen und Teile der Ähre sichtbar	Ähre voll entwickelt und keine Teile mehr vom Fahnenblatt umschlossen

**Abb. 2.4:** Klassifizierung der Ähren-Entwicklungsstadien

Zur Bestimmung der Ährenentwicklung wurden drei Klassen unterschieden: Zur Klasse 1 wurden diejenigen Ähren gezählt, bei denen die gesamte Ähre noch vom Fahnenblatt umschlossen, die Grannen aber schon sichtbar waren. Der Klasse 2 wurden die Ähren zugeordnet, die teilweise vom Fahnenblatt umschlossen waren. Ähren der Klasse 3 waren vollständig entwickelt und aus dem Fahnenblatt heraus geschoben.

### Ertrag

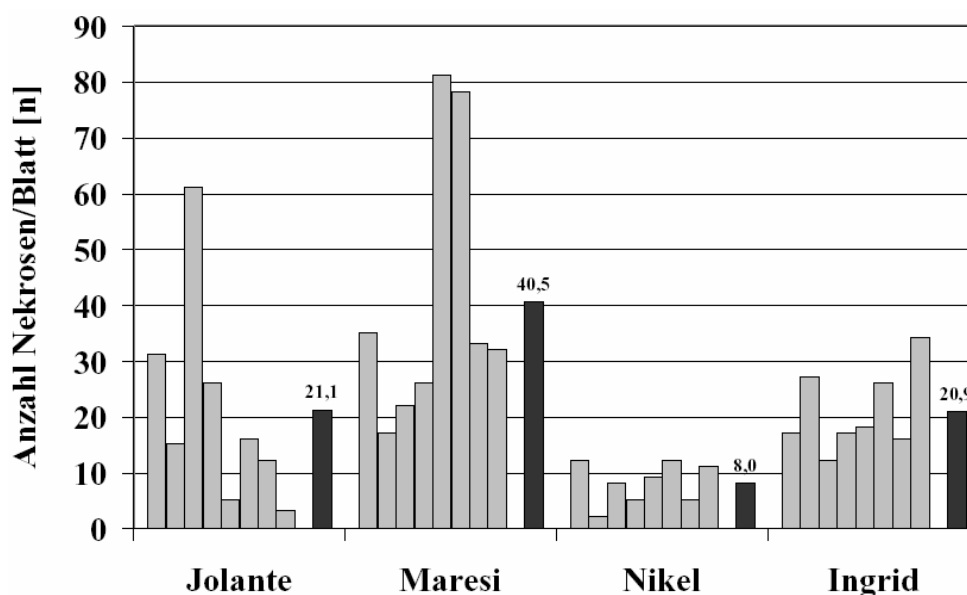
Um den Ertrag zu ermitteln, wurden nach Abreife der Pflanzen alle Ähren eines Mitscherlich-Gefäßes geerntet und die Menge an Ähren pro Gefäß, Kornertrag und Strohertrag pro Gefäß sowie der Ernteindex (Verhältnis Korn:Stroh) bestimmt. Von den erhaltenen Ähren wurden pro Gefäß jeweils zehn für die Ährenanalyse verwendet. Anhand dieser Ähren wurde die Menge an Körnern pro Ähre sowie Tausendkorngewicht (TKG) bestimmt. Die übrigen Ähren eines Gefäßes wurden gedroschen und der Ertrag in Frischgewicht ermittelt. Von diesen Körnern wurden nun fünf Gramm genommen, um durch Trocknung bei 105 °C den Feuchtegehalt zu bestimmen. Für die Endauswertung wurden alle Gewichtsdaten auf eine relative Feuchte im Korn von 14 % umgerechnet. Das Stroh/Gefäß wurde bei 65 °C getrocknet und die Trockenmasse bestimmt. Zur Bestimmung des TKG wurden pro Gefäß 4 x 100 Körner gewogen und der Mittelwert auf 1000 Körner hochgerechnet und dann wiederum auf 86 % Trockenmasse umgerechnet.

Zur Auswertung wurde der Ertrag der drei Kultivare unter den vier verschiedenen Bedingungen nebeneinander in absoluten Werten als Säulendiagramm sowie als relativer Vergleich dargestellt. Die Signifikanzen wurden mittels ungepaarten Student's t-Tests ermittelt.

### 3 ERGEBNISSE

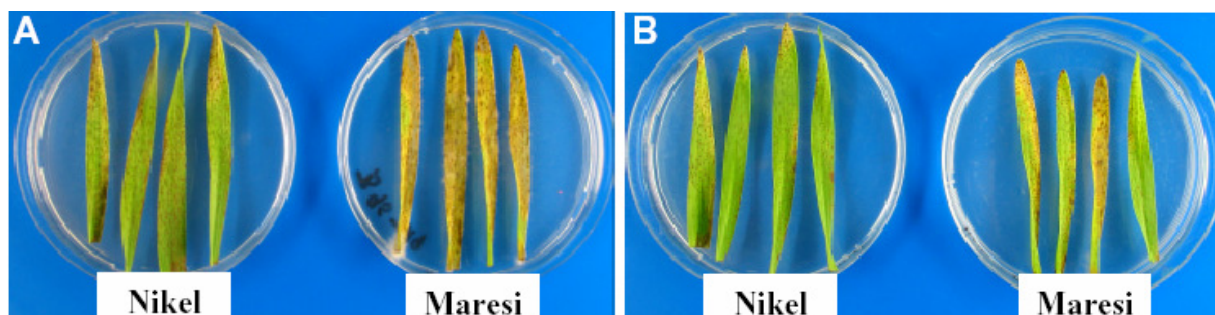
#### 3.1 ANFÄLLIGKEIT VERSCHIEDENER GERSTENSORTEN BEI EINER BLATTINFEKTION MIT *FUSARIUM CULMORUM*

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Gerstengene mittels cDNA-macroarray Analysen identifiziert werden, deren Expression bei einer Blattinfektion mit *Fusarium culmorum* (*Fc*) verändert ist. Um Resistenz- bzw. Suszeptibilitätsfaktoren in dieser Gerste-*Fusarium* Interaktion auffinden zu können, sollten die Expressionsmuster einer anfälligen und einer weniger stark anfälligen Gerstensorte vergleichend untersucht werden. Da keine gesicherten Daten über die Anfälligkeit von Gerstenkultivaren bei einer Blattinfektion mit *Fc* existierten, wurden zunächst verschiedene Gerstensorten im Hinblick auf diese Eigenschaft untersucht. Dazu wurden die Primärblätter acht Tage alter Gerstenpflanzen wie in Kap. 2.3.1 beschrieben mit *Fc* inokuliert. Die Auswertung erfolgte nach fünf bis acht Tagen visuell, u.a. durch die Bestimmung der Anzahl der Blattnekrosen und der Bonitur der Gelbfärbung der Blätter. Die Unterschiede bzgl. der Anzahl der Nekrosen war zu früheren Zeitpunkten (ca. 5 Tage nach Infektion, dai) deutlicher, die bzgl. der Gelbfärbung dagegen zu späteren Zeitpunkten (ca. 8 dai).



**Abb. 3.1:** Anzahl der durch *F. culmorum* hervorgerufenen Blattnekrosen pro Blatt. Die Primärblätter 8 Tage alter Gerstenpflanzen der Sorten Jolante, Maresi, Nickel und Ingrid wurden mit einer Sporensuspension von *Fc* (150.000 Sporen/ml) inokuliert. Fünf Tage später wurde die Anzahl der Nekrosen pro Blatt gezählt, wobei jeweils acht Blattsegmente pro Sorte analysiert wurden. Dargestellt ist neben der Anzahl der Nekrosen pro Blatt (grau) auch der Mittelwert für die jeweilige Gerstensorte (schwarz).

Untersucht wurden die Gerstenkultivare Nickel, Ingrid, Jolante und Maresi. Innerhalb dieser Auswahl zeigte das Kultivar Nickel immer die geringste Ausprägung der Symptome, d.h. die geringste Anzahl an Nekrosen sowie die schwächste Gelbfärbung der untersuchten ganzen Pflanzen bzw. Blattsegmente. Pflanzen der Sorte Maresi dagegen wiesen meist die größte Anzahl an Nekrosen auf sowie immer eine starke Gelbfärbung der Blattspitzen oder Blattsegmente. Bei einer Auszählung der Nekrosen fanden sich im Mittel acht Nekrosen pro Blatt für die Sorte Nickel, für Jolante und Ingrid ca. 21 und für Maresi etwa 40 (s. Abb. 3.1). Zur Bestätigung wurden nur noch Tests mit den beiden Kultivaren Nickel und Maresi durchgeführt und zur Dokumentation fotografiert (s. Abb. 3.2).



**Abb. 3.2:** Aufnahme der durch *F. culmorum* hervorgerufenen Gelbfärbung der Blattsegmente. Die Primärblätter acht Tage alter Gerstenpflanzen der Sorten Nickel und Maresi wurden mit einer Sporensuspension von *Fc* (150.000 Sporen/ml) inokuliert; die fotografische Auswertung erfolgte hier acht (A) bzw. sieben (B) Tage nach Inokulation.

### 3.2 IDENTIFIZIERUNG *FUSARIUM*-RESPONSIVER GENE DER GERSTE

Um Gerstengene zu identifizieren, die gegenüber einer Blatinfektion mit *Fusarium* responsiv sind, wurde die weniger *Fc*-anfällige Sorte Nickel vergleichend mit der *Fc*-anfälligeren Sorte Maresi untersucht. Als Methode wurde der radioaktive reverse *Northern* gewählt, für den vom IPK Gatersleben zur Verfügung gestellte *macroarrays* verwendet wurden. Auf diese Weise konnte die Expression von 1536 verschiedenen Gerstengenen, deren Fragmente auf die *macroarray*-Membranen gespottet waren (s. Kap. 2.5.8.), gleichzeitig untersucht werden. Die komplexen cDNA-Sonden zur Hybridisierung der *macroarrays* wurden aus dem Blattmaterial 10 Tage alter Gerstenpflanzen generiert, die 24 h zuvor mit *Fc* inokuliert worden waren (GB 1 + GB 2, s. Tab. 2.2). Dabei wurden für die Sorte Nickel zwei biologische Wiederholungen gemacht, für Maresi eine. Es wurde nur das Blattmaterial verwendet, bei dem im Vergleich von inokuliertem zu nicht-inokuliertem Material eine Induktion des Pathogenese-abhängigen Proteins PR1 über RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Bei jeder *macroarray* Hybridisierung wurde eine technische Wiederholung durchgeführt, d.h. dass zwei Filter mit

derselben Sonde hybridisiert wurden. Insgesamt ergaben sich somit pro biologischem Experiment durch die technische Wiederholung jeweils vier Vergleichsmöglichkeiten zwischen zwei Kontrollfiltern und zwei *Fc*-Filtern, die jeweils getrennt ausgewertet wurden. Die Auswertung erfolgte mittels Array Vision 7.0 bzw. 8.0 (Imaging Research Inc., St. Catharines, Kanada) am MPI für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg bzw. am Institut für Medizinische Mikrobiologie in Gießen. Das Programm bestimmte die Intensitäten der verschiedenen Signale und des lokalen Hintergrunds um die jeweiligen *spotting groups* (s. Kap. 2.5.8), der Hintergrund wurde anschließend von der Signalstärke der Genfragmente subtrahiert. Mit Hilfe des Programms R 2.0.1 wurden die aus Array Vision erhaltenen Werte nach vom Nutzer ausgewählten Bedingungen (s. Kap. 2.5.8.3) selektiert. Die Signale der so ausgewählten Klone wurden mit Microsoft Excel weiterbearbeitet, indem die Signalstärke eines cDNA-Fragments auf dem *Fusarium*-Filter durch die Signalstärke im Kontrollfilter dividiert wurde. Der erhaltene Wert gab die Induktion des Gens durch die Inokulation mit *Fc* an. Die Repression eines Gens wurde durch den Kehrwert dieses Quotients ausgedrückt. In Tabelle 3.1 sind die Gene aufgeführt, die in den *macroarray*-Analysen nach Inokulation mit *Fc* um mehr als das 2,5fache differentiell exprimiert waren. Der *Blast* dieser Sequenzen erfolgte mit Hilfe des TIGR-*Blast* (<http://www.tigr.org/tdb/>, s. Kap. 2.5.6).

Die bei den *macroarray*-Analysen als differentiell ermittelten Klone sind in Tab. 3.1 getrennt nach Kultivar und Versuch aufgeführt. Die in den Spalten angegebenen Zahlen von 1 – 4 geben an, in wie vielen der 4 Filtervergleiche eine differentielle Expression ermittelt werden konnte. Die genauen Expressionsdaten sind im Anhang in Tab. A2 zu finden.

In den drei durchgeführten biologischen Experimenten wurden insgesamt 112 Klone als differentiell exprimiert ermittelt. 37 davon nur im Kultivar Nickel (in mindestens einer von beiden biologischen Wiederholungen), 38 nur im Kultivar Maresi und 37 in beiden Kultivaren. Betrachtet man zunächst nur das Ergebnis der beiden Experimente für das Kultivar Nickel, so wurden hier insgesamt 75 Klone als differentiell exprimiert gefunden, 39 davon nur in einem der beiden Experimente, 36 in beiden. Von diesen 36 stimmt die Richtung der differentiellen Expression, d.h. die Induktion bzw. Repression, für 9 Klone in beiden Versuchen überein, für die anderen 27 gab es Widersprüche entweder in der biologischen oder in der technischen Wiederholung. Es war also nur für 9 der 75 Klone (= 12 %, in der Tabelle gelb hinterlegt) eine relativ klare Aussage zu machen: drei waren induziert, sechs waren reprimiert. Da die Aussagekraft dieser beiden *macroarray*-Analysen wesentlich geringer war als erwartet, wurde beschlossen, für das Kultivar Maresi nur ein Experiment durchzuführen. In diesem Experiment wurden ebenfalls 75 Klone als differentiell exprimiert



gefunden, zwei davon reprimiert, 69 induziert und 4 mit widersprüchlichem Ergebnis zwischen den technischen Wiederholungen. Die Kandidatengene für die folgenden Expressions- bzw. Funktionsanalysen wurden daher diesen drei Experimenten vorrangig nach interessanten Homologien ausgesucht. Die mittels TIGR-blast ermittelten Homologien zu den einzelnen Klonen sind in Tab. 3.2 ebenfalls nach Kultivar getrennt aufgeführt.

**Tab. 3.1: Expressionsdaten der *macroarray*-Analyse.**

Aufgeführt ist die Induktion (↑) bzw. Repression (↓, grau hinterlegt) von Klonen des cDNA-*macroarrays* in Gerstenprimärblättern der Kultivare Nickel und Maresi nach Inokulation mit *Fc*. Die Bestimmung der Signalintensitäten erfolgte mittels ArrayVision, die Normalisierung mittels R 2.0.1. Pro Experiment, d.h. pro Kultivar und Versuch, wurden je vier Auswertungen vorgenommen, da je zwei Kontrollfilter und zwei ‚*Fc*-Filter‘ vorhanden waren, die miteinander verglichen wurden. Die in den Spalten angegebenen Zahlen von 1 – 4 geben an, in wie vielen der vier Vergleiche eine differentielle Expression ermittelt werden konnte. Gelb hinterlegt sind die neun klaren Übereinstimmungen der beiden biologischen Wiederholungen für das Kultivar Nickel. Die Expression der in roter Schrift markierten Klone wurde im Folgenden mittels RT-PCR untersucht. Die genauen Expressionsdaten sind im Anhang in Tab. A2 zu finden.

**Tab. 3.2: Homologien der differentiell exprimierten Klone auf Nukleotidebene.**

Aufgeführt sind die im TIGR-blastn ermittelten höchsten Homologien auf Nukleotidebene und die dazugehörigen Parameter der mittels cDNA-*macroarray*-Analysen als differentiell identifizierten Klone. Grau hinterlegt sind die Klone, deren Expression im Folgenden mittels RT-PCR näher analysiert wurde.

Tab. 3.1: Expressionsdaten der *macroarray*-Analyse

Klon	Nikel				Klon	Maresi			Klon	Nikel				Maresi	
	kin 3		kin 4			kin 3	kin 3	kin 4		kin 3	kin 3	kin 4	kin 3		
	↑	↓	↑	↓		↑	↓		↑	↓	↑	↓	↑	↓	
GBN001A01	1	2			GBN001A23	2			GBN001D12		2	2			4
GBN001C09				2	GBN001D13	3			<b>GBN001G02*</b>	1		2			3
GBN001C13*			2		GBN001E18	4			GBN001H06	2				2	1
<b>GBN001D10*</b>		1			GBN001F16	4			GBN002A02	1	4			2	1
GBN001E16		2	2	2	GBN001N10	4			GBN002B02		2			1	1
GBN001F24			2		GBN001N18	2			<b>GBN002C04*</b>	2		2			2
GBN001G10				2	GBN001O20	2			<b>GBN002D18</b>		4			4	
<b>GBN001J10</b>			2		GBN002B01	2			GBN002E18	2	1			4	
GBN001J24			4		GBN002B05	3			GBN002G15	2	2			4	
GBN001K24		2	4		GBN002E01	4			GBN002H15	2	2	1		4	
GBN001L08			2		GBN002E02*	1			GBN002H17*	2				2	
GBN001O02				3	GBN002E09	2			GBN002H21	2	4			2	
GBN002A01		4	4		GBN002E21	2			GBN002H23	2				3	
GBN002A18*			2		GBN002E22*	3			GBN002J19	2	3			4	
GBN002B18			2		GBN002F17	4			GBN002P07	1			3	2	
GBN002I14			2		GBN002G23	3			GBN003B04		2			2	
GBN002K07		1	1	2	GBN002H20	3			GBN003B06		4				2
GBN002L11*			3		GBN002L07	3			GBN003D17		2			4	
GBN002P15	1	1	1	1	GBN002L11	1			GBN003D18*	2				2	
GBN003A21			2		GBN002O18	4			<b>GBN003D20*</b>	3	2			3	
GBN003B02*			2		GBN003A02	3			GBN003E22	2	3			4	
GBN003B12			4		<b>GBN003B03</b>	2			GBN003F19	3	2			1	
GBN003C07			4		<b>GBN003B08</b>	2			<b>GBN003H07</b>	2		2		4	
<b>GBN003E06</b>	2		4		GBN003C01	2			<b>GBN003I10</b>	2		2		4	
GBN003J11			2		GBN003J07	3			GBN003J09	1		2	1	1	
GBN003K05			2		GBN003C06	2			GBN003J10*	1		1	1	4	
GBN003N11		2			GBN003L06		2		GBN003K10	1	1		2	2	
GBN003N12	1	1	3		GBN003M02	2			GBN003K14*		2	2		4	
GBN003O15		2	2		GBN003M06	1			GBN003O20	1	2	3		2	
<b>GBN004A01*</b>			2		<b>GBN003O17</b>	4			GBN003P02	1	2			3	
GBN004A03		3	2		GBN004C18	2			GBN004A02			2	1	2	
GBN004B19			2		GBN004E18	4			<b>GBN004A07*</b>	4		2		2	
<b>GBN004C05</b>		1		3	GBN004G01	3			<b>GBN004B03</b>	4		4		3	1
GBN004I14			2		GBN004I02	3			GBN004G16*		1	2		4	
GBN004M07			2		GBN004I06	3			GBN004I17		3	3		4	
GBN004M18			3		GBN004K02	3			GBN004I18		4	2	2	4	
GBN004N06*			2		GBN004M15	1			<b>GBN004M16</b>	1		2		3	
					GBN004M19	2									

\* chimärer Klon, der 2 – 3 verschiedene Sequenzen enthält; in Tab. 3.2 durch *\_a/\_b/\_c* gekennzeichnet

**Tab. 3.2: Homologien der differentiell exprimierten Klone auf Nukleotidebene**

im TIGR-blastn höchste Homologie zu					
Klon	TC	mögliche Funktion	Score	Expect	Identities
<b>Klone, die nur in cv. Nikel differentiell exprimiert waren</b>					
GBN001A01	wheat TC262462	Non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins-like	285	2.3e-14	83/108 (76%)
GBN001C09	wheat TC267018	alpha 2C4 adrenoceptor subtype - mouse {Mus musculus}	204	0.18	68/96 (70%)
GBN001C13_a	barley AV834161	expressed protein {Arabidopsis thaliana}	1902	1.2e-80	398/413 (96%)
_b	barley TC149098	Gamma-glutamyl hydrolase precursor (Gamma-Glu-X carboxypeptidase)	1783	1.8e-75	363/368 (98%)
GBN001D10_a	barley TC133256	Plastid (P)ppGpp synthase (=RelA Protein) [RelA]	1658	4.7e-70	338/349 (96%)
_b	barley TC142448	F12K21.21 {Arabidopsis thaliana}	1775	6.2e-75	355/355 (100%)
_c	wheat CA745703		291	1.3e-07	103/141 (73%)
GBN001E16	barley TC146788	Oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplast precursor (OEE3)	992	1.3e-39	204/208 (98%)
GBN001F24	barley TC133989		1876	1.7e-79	398/415 (95%)
GBN001G10	barley TC131364	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor (Carbonate dehydratase)	1468	1.8e-61	302/311 (97%)
GBN001J10	barley TC132933	Glycine-rich cell wall structural protein 1.0 precursor (GRP 1.0) [GRP]	1797	5.1e-76	365/369 (98%)
GBN001J24	barley TC131485	Hydroxyproline-rich glycoprotein DZ-HRGP precursor	841	6.3e-33	189/236 (80%)
GBN001K24	barley TC139737		1518	2.7e-63	318/327 (97%)
GBN001L08	barley TC148359	ATPase-like protein	1707	2.8e-72	351/359 (97%)
GBN001O02	barley TC148643	PPF-1 protein {Pisum sativum}	1369	1.4e-56	279/284 (98%)
GBN002A01	barley TC149273		1429	1.4e-59	291/296 (98%)
GBN002A18_a	barley TC145210		1572	1.8e-65	322/327 (98%)
_b	wheat CA629464		297	1.8e-07	71/84 (84%)
GBN002B18	barley CA000160		1750	1.4e-73	350/350 (100%)
GBN002I14	barley TC133731	Glycine-rich protein precursor	1201	6.1e-49	241/242 (99%)
GBN002K07	barley TC139473	H+-transporting ATP synthase chain 9-like protein	746	1.6e-28	154/160 (96%)
GBN002L11_a	barley TC147600	50S ribosomal protein L6 (BL10)	1656	1.2e-69	332/333 (99%)
_b	barley TC135092	Atherin	840	8.6e-33	168/168 (100%)
GBN002P15	barley TC131485	Hydroxyproline-rich glycoprotein DZ-HRGP precursor	616	9.3e-23	150/208 (72%)
GBN003A21	barley TC142873	Receptor-like protein kinase	1212	1.8e-49	244/246 (99%)
GBN003B02_a	barley TC139231	Dehydrin 9	960	3.8e-38	192/192 (100%)
_b	barley TC147589	Fiber protein Fb14	1321	2.3e-54	265/266 (99%)
GBN003B12	barley TC132933	Glycine-rich cell wall structural protein 1.0 precursor (GRP 1.0)	248	3.8e-05	52/55 (94%)
GBN003C07		nicht sequenziert			
GBN003E06	barley TC130960	Dormancy-associated protein (auxin-repressed protein) [ARP]	1757	3.3e-74	353/355 (99%)
GBN003J11	wheat CA738616		342	9.6e-10	124/177 (70%)
GBN003K05	barley TC134825	coiled-coil domain containing 8 {Homo sapiens}	2226	1.1e-95	450/456 (98%)
GBN003N11	barley TC130722	Chlorophyll a/b-binding protein precursor	1366	1.4e-56	274/275 (99%)
GBN003N12	barley TC150126	Chloroplast import-associated channel protein homolog	943	8.3e-61	193/197 (97%)
GBN003O15		nicht sequenziert			
GBN004A01_a	barley TC139620	Clathrin coat assembly protein AP47 [Clathrin]	1060	5.2e-43	228/239 (95%)
_b	barley TC130722	Chlorophyll a/b-binding protein precursor	911	4.9e-36	191/196 (97%)
GBN004A03	barley TC139357	Protoporphyrin IX Mg-chelatase subunit precursor	1468	5.7e-61	324/341 (95%)
GBN004B19_a	barley TC134065	AF-17 protein	455	7.5e-15	139/187 (74%)
_b	barley TC131841	At5g64750 {Arabidopsis thaliana}	144	2.6	48/67 (71%)
GBN004C05	barley TC139355	Protoporphyrin IX Mg-chelatase subunit precursor	1760	1.1e-73	352/352 (100%)
GBN004I14	barley TC132933	Glycine-rich cell wall structural protein 1.0 precursor (GRP 1.0)	1165	1.8e-47	243/248 (97%)
GBN004M07	barley TC133690	At1g22700/T22J18_13	1626	2.9e-68	338/347 (97%)
GBN004M18	barley TC132933	Glycine-rich cell wall structural protein 1.0 precursor (GRP 1.0)	1167	1.5e-47	243/249 (97%)
GBN004N06_a	wheat TC245096		283	6.2e-07	71/89 (79%)
_b	barley TC137615		128	5.6	54/83 (65%)

im TIGR-blastn höchste Homologie zu					
Gen-Nr.	TC	mögliche Funktion	Score	Expect	Identities
<b>Klone, die nur in cv. Maresi differentiell exprimiert waren</b>					
GBN001A23	barley TC138855	Elongation factor 1-beta' (EF-1-beta')	1714	1.6e-72	352/359 (98%)
GBN001D13	barley TC139755		1704	8.1e-72	372/391 (95%)
GBN001E18	barley TC146692	Eukaryotic translation initiation factor 1A (EIF-1A) (EIF-4C)	1380	7.4e-57	282/285 (98%)
GBN001F16	barley TC147142	Bundle sheath cell specific protein 1	1433	1.3e-59	297/306 (97%)
GBN001H06	barley TC131364	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor (Carbonate dehydratase)	1468	1.8e-61	302/311 (97%)
GBN001N10	barley TC132900		1169	1.4e-62	281/311 (90%)
GBN001N18	barley TC131287	Sperm histone P2 precursor (Protamine MP2)	1928	4.8e-82	402/413 (97%)
GBN001O20	barley TC140550	Methionine sulfoxide reductase A	946	1.2e-37	208/222 (93%)
GBN002B01	arab NP307634	kinesin-like protein; 73641-79546	170	0.21	72/106 (67%)
GBN002B05	barley TC152570		1299	1.7e-53	263/267 (98%)
GBN002E01	barley TC139735		1165	1.7e-47	233/233 (100%)
GBN002E02_a	barley TC153740		1213	2.5e-49	247/251 (98%)
_b	barley CB860426		855	8.4e-45	175/177 (98%)
GBN002E09	barley TC140550	Methionine sulfoxide reductase A	1076	1.6e-43	248/280 (88%)
GBN002E21_a	barley TC131304	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	1092	2.9e-44	220/222 (99%)
_b	wheat TC250625	O-methyltransferase	1438	4.7e-60	310/335 (92%)
GBN002E22_a	barley BG309672	chitinase (EC 3.2.1.14) precursor - beet	140	3.6	72/115 (62%)
_b		keine Homologie			
GBN002F17	barley TC140064		1807	1.4e-76	365/368 (99%)
GBN002G23		keine Homologie			
GBN002H20	barley TC139190	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa (Ubiquitin-protein ligase)	1127	1.0e-45	231/235 (98%)
GBN002L07	barley TC132091	Glycine decarboxylase complex H-protein (At2g35120/T4C15.21)	1571	8.9e-66	315/316 (99%)
	barley BQ660616		1555	7.4e-65	311/311 (100%)
GBN002L11_a	barley TC147600	50S ribosomal protein L6 (BL10)	1656	1.2e-69	332/333 (99%)
_b	barley TC135092	Atherin	840	8.6e-33	168/168 (100%)
GBN002O18		nicht sequenziert			
GBN003A02	barley TC139625		1721	4.5e-73	345/346 (99%)
GBN003B03	barley TC140839	Vesicle transport v-SNARE 11 (AtVTI11) [ <b>vSNARE11</b> ]	2584	1.3e-111	530/560 (94%)
GBN003B08	barley TC139556	Dim1 homolog [ <b>Dim1</b> ]	1625	3.9e-68	325/325 (100%)
GBN003C01	barley TC131125	eukaryotic translation initiation factor 5 {Zea mays}	1680	1.2e-70	336/336 (100%)
GBN003C06	wheat TC265967		280	2.7e-14	100/143 (69%)
GBN003L06	barley TC141091		1428	1.3e-59	286/287 (99%)
GBN003M02	wheat CA721767		404	1.2e-12	150/220 (68%)
GBN003M06	barley TC146289	Malate dehydrogenase, glyoxysomal precursor	925	1.5e-36	189/191 (98%)
GBN003O17	wheat TC238809	myb-related transcription factor MYB59 - Arabidopsis thaliana [ <b>mr-TF</b> ]	1033	1.6e-41	237/266 (89%)
GBN004C18		nicht sequenziert			
GBN004E18	barley TC146692	Eukaryotic translation initiation factor 1A (EIF-1A) (EIF-4C)	1380	7.4e-57	282/285 (98%)
GBN004G01_a	barley TC146331	Vacuolar ATPase subunit G	1306	9.1e-54	268/272 (98%)
_b	wheat BE403105		157	0.19	65/91 (71%)
GBN004I02_a	barley TC139159	transcriptional coactivator-like protein {Arabidopsis thaliana}	901	1.7e-35	197/206 (95%)
_b	barley TC152769		1241	7.0e-51	261/271 (96%)
GBN004I06	barley TC130762	Ubiquitin-conjugating enzyme UBC2	972	7.4e-39	204/217 (94%)
GBN004K02	barley TC132555	Leucine-rich repeat-like protein	1099	9.3e-45	245/266 (92%)
GBN004M15	barley TC146334	Glutathione-S-transferase 2	1448	2.2e-60	302/311 (97%)
GBN004M19	barley TC140207	Peptide transporter	1546	4.8e-65	350/383 (91%)

im TIGR-blastn höchste Homologie zu					
Gen-Nr.	TC	mögliche Funktion	Score	Expect	Identities
<b>Klone, die in cv. Maresi und cv. Nickel differentiell exprimiert waren</b>					
GBN001D12	barley TC138716	ADP-ribosylation factor-like protein (AT3g62290/T17J13_250)	2157	2.7e-92	441/449 (98%)
GBN001G02_a	wheat TC274498		179	0.057	59/78 (75%)
_b	barley TC146862	Ankyrin-repeat protein HBP1 [ <b>Ankyrin</b> ]	1786	1.0e-75	360/362 (99%)
GBN002A02	keine Homologie				
GBN002B02	barley TC136274		292	2.1e-07	60/62 (96%)
GBN002C04_a	wheat CA742320	embryogenesis transmembrane protein - maize	730	1.4e-27	176/215 (81%)
_b	wheat CV759875		429	4.0e-14	123/165 (74%)
_c	barley TC133572	MutT-like protein	907	7.8e-36	183/185 (98%)
GBN002D18	barley TC131592	Calreticulin 3 precursor [ <b>CRT3</b> ]	2484	2.7e-107	500/504 (99%)
GBN002E18	barley BE421590	B12D protein - barley	1262	4.8e-52	254/256 (99%)
GBN002G15	nicht sequenziert				
GBN002H15	arab TC254909		379	4.3e-11	203/326 (62%)
GBN002H17_a	barley TC151488		1962	4.2e-83	394/396 (99%)
_b	barley TC136681		1216	9.6e-50	244/245 (99%)
GBN002H21	barley TC134446	Ferredoxin-thioredoxin reductase, variable chain (FTR-V)	1370	1.0e-56	290/312 (92%)
GBN002H23	barley TC142661		1381	4.1e-57	277/278 (99%)
GBN002J19	barley TC139728	NifU-like protein (AT4g22220/T10I14_50)	1506	7.3e-63	302/303 (99%)
GBN002P07	barley TC147234	DNA-directed RNA polymerase II subunit-like protein {Arabidopsis thaliana}	1978	4.2e-84	398/401 (99%)
GBN003B04	barley TC142879		1948	1.2e-82	392/395 (99%)
GBN003B06	barley TC131616	ferritin	1005	2.4e-40	201/201 (100%)
GBN003D17	barley TC146675	Lipid transfer protein 7a2b	1321	1.5e-54	265/266 (99%)
GBN003D18_a	barley TC139359	Zeaxanthin epoxidase	1211	2.9e-49	247/255 (96%)
_b	wheat TC238782		834	2.9e-32	198/225 (88%)
GBN003D20_a	barley TC148824	MAP kinase MAPK2 [ <b>MAPK2</b> ]	1358	2.5e-56	274/277 (98%)
_b	barley BE422359		931	6.5e-37	187/188 (99%)
GBN003E22	barley TC138582	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast precursor	1223	2.7e-50	267/317 (84%)
GBN003F19	barley TC133800	Phytoene synthase	1760	2.7e-74	352/352 (100%)
GBN003H07	barley TC132357	Chlorophyll b synthase	2329	6.1e-100	469/473 (99%)
GBN003I10	barley TC148878	Spore coat protein SP96	930	8.7e-37	186/186 (100%)
GBN003J07	barley TC147354	Chaperone protein dnaJ-like	1521	9.7e-64	305/306 (99%)
GBN003J09	barley CB876700		1029	1.1e-40	211/216 (97%)
GBN003J10_a	wheat CK210383		979	3.8e-39	289/398 (72%)
_b	wheat TC269070	Kinesin-like	997	6.8e-40	213/230 (92%)
GBN003K10	barley TC131417	Actin	1315	1.8e-54	263/263 (100%)
GBN003K14_a	barley TC139677	Ser/Arg-related nuclear matrix protein	1067	6.9e-43	219/223 (98%)
_b	barley TC139635	Acrosin precursor	1516	9.0e-64	304/305 (99%)
GBN003O20	barley TC131099	Glb 1 1-3,1-4-beta-D-glucanase precursor (Lichenase precursor)	1217	4.4e-50	245/247 (99%)
GBN003P02	barley TC131587	Immunophilin	1216	9.5e-50	252/260 (96%)
GBN004A02	keine Homologie				
GBN004A07_a	barley TC140306	Senescence-associated protein [ <b>SAP</b> ]	2240	4.3e-96	466/479 (97%)
_b	wheat CA746313		351	2.7e-10	117/168 (69%)
GBN004B03	barley TC138639	23 kDa jasmonate-induced protein [ <b>JIP</b> ]	330	7.2e-16	74/83 (89%)
GBN004G16_a	barley TC133870	RING finger-like protein - Arabidopsis thaliana	1331	3.8e-55	277/283 (97%)
_b	wheat CK165903		1118	2.2e-45	296/379 (78%)
GBN004I17	barley TC148473		1541	1.4e-64	327/337 (97%)
GBN004I18	wheat TC240552		1147	2.5e-46	339/428 (79%)
GBN004M16	barley TC142705		810	2.7e-31	168/171 (98%)

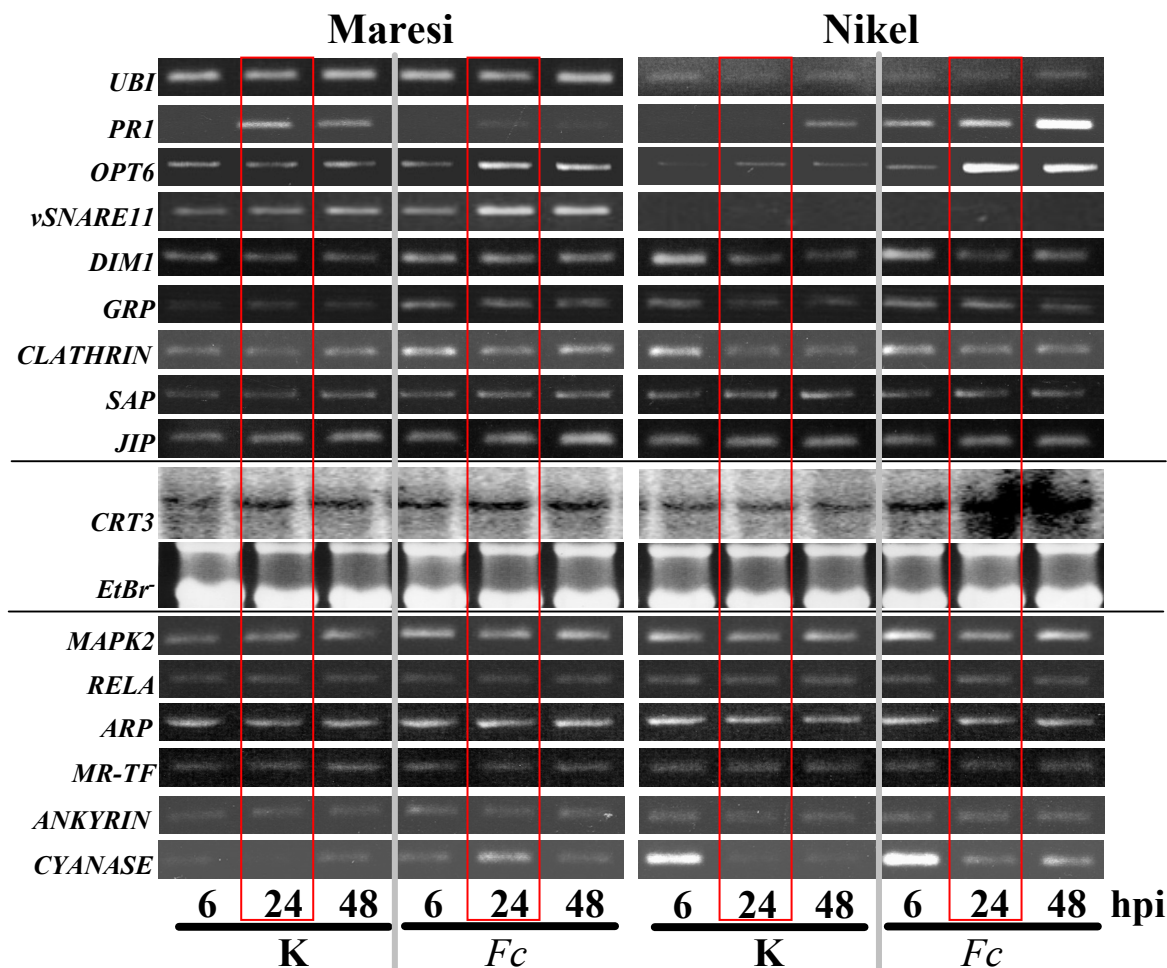
### 3.3 EXPRESSIONSANALYSE DER KANDIDATENGENE IN VERSCHIEDENEN PFLANZENORGANEN

Die Expression der in Tab 3.2 grau hinterlegten Kandidatengene in der Gerste – *Fusarium culmorum* (*Fc*) – Interaktion wurde zunächst zur Bestätigung in einem unabhängigen Blattversuch überprüft. Des Weiteren wurde die Expression dieser Gene zusätzlich in Gerstenähren sowie in Blättern und Ähren von Weizenpflanzen untersucht. Als Methode wurde aufgrund der Menge der zu untersuchenden Proben und Gene die semi-quantitative *two-step* RT-PCR gewählt (s. Kap. 2.5.4). Die Kandidatengene wurden hauptsächlich aufgrund ihrer interessanten Homologie ausgesucht. Vier dieser Gene waren bei den *macroarray*-Analysen nur in dem resistenteren Kultivar Nickel differentiell exprimiert (ein RelA-Homolog [*RELA*], die Vorstufe eines Glycin-reichen Zellwandproteins [*GRP*], ein *clathrin coat assembly*-Protein [*CLATHRIN*] und ein durch Auxin reprimiertes Protein [*ARP*]). Bei den nur im anfälligeren Kultivar Maresi differentiell exprimierten Genen wurde ein Vesikel-Transportprotein (*vSNARE11*), ein *DIMI*-Homolog (*DIMI*) und ein *myb-related* Transkriptionsfaktor (*MR-TF*) ausgewählt. Fünf der ausgewählten Gene waren in beiden Kultivaren differentiell exprimiert: ein *ankyrin-repeat* Protein (*ANKYRIN*), ein Seneszenz - assoziiertes Protein (*SAP*), ein durch Jasmonat induziertes Protein (*JIP*), eine MAP-Kinase (*MAPK2*) und das Calreticulin 3 (*CRT3*). *ARP*, *SAP* und *JIP* wurden u.a. deshalb ausgewählt, weil sie in den Array-Analysen im Kultivar Nickel in beiden durchgeführten Versuche deutlich in die gleiche Richtung differentiell exprimiert waren. Eine putative *CYANASE* wurde unabhängig von den *macroarray*-Analysen untersucht, da in Weizen gezeigt wurde, dass sie in dem *Bipolaris sorokiniana* (*Bs*)-resistenteren Kultivar Yangmai 6 nach *Bs*-Inokulation induziert, in dem hochanfälligen Sonalika jedoch nicht differentiell exprimiert ist (JAIN 2004). Die Amplifikation eines konstitutiv exprimierten *UBIQUITIN*-Gens (TIGR Acc. No.: TC145698) sollte bestätigen, dass bei der *two-step* RT-PCR gleiche Konzentrationen der einzelnen cDNA-Proben verwendet wurden. Als Marker für eine erfolgreiche Infektion der Pflanzen durch den Pilz diente sowohl eine Vorstufe des PR1-Proteins (*PR1*), als auch der Nitrattransporter *OPT6*, der sich im Lauf der Zeit als der zuverlässigere Marker für eine *Fc*-Infektion herausgestellt hat. Zur Bestätigung der Expressionsmuster wurden alle *two-step* RT-PCRs mindestens zwei Mal wiederholt.

#### 3.3.1 Bestätigung der Array-Analysen in einem unabhängigen Gerstenblatt-Versuch

Für diesen Versuch wurden 7 Tage alte Primärblätter der Gerstenkultivare Maresi und Nickel mit *Fc* inokuliert (GB 3, s. Tab. 2.2). Die Erntezeitpunkte lagen bei 6, 24 und 48 Stunden

nach Inokulation (hpi). Die Produkte der *two-step* RT-PCR wurden in Agarosegelen aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Für *CRT3* wurde in diesem Versuch eine radioaktive *Northern*-Analyse durchgeführt. Die Beladung des Gels mit RNA ist mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht worden. Abb. 3.3 zeigt die Ergebnisse der *two-step* RT-PCRs für die einzelnen Gene.



**Abb. 3.3** Expressionsmuster der Kandidatene im unabhängigen Gerstenblatt-Versuch. Sieben Tage alte Gerstenpflanzen der Kultivare Maresi und Nickel wurden mit einer Sporensuspension von *Fc* inokuliert, Kontrollpflanzen mit Tween-Wasser besprüht. Geerntet wurden die Blätter 6, 24 und 48 Stunden nach Inokulation (hpi). Die aus den Blättern extrahierte Gesamt-RNA wurde zum einen für eine radioaktive *Northern*-Analyse verwendet (*CRT3*), zum anderen in cDNA umgeschrieben und die Expression der übrigen Gene mittels semi-quantitativer *two-step* RT-PCR untersucht. Die gleichmäßige Einstellung der Konzentration der einzelnen cDNA-Proben wurde durch die Amplifikation eines konstitutiv exprimierten Ubiquitins überprüft (TIGR Acc. No.: TC145698). Als Marker für eine erfolgreiche Infektion der Pflanzen durch den Pilz diente eine Vorstufe des PR1-Proteins sowie der Nitrattransporter *OPT6*. Rot umrahmt sind die Zeitpunkte, die in den cDNA-microarray-Analysen untersucht worden waren. Ubi: Ubiquitin; *PR1*: *PR1*-Precursor; *OPT6*: Nitrattransporter; *vSNARE11*: Vesikeltransport-Protein; *DIMI*: *DIMI*-Homolog; *GRP*: Glycin-reiches Zellwandprotein; *CLATHRIN*: *clathrin coat assembly*-Protein; *SAP*: Seneszenz-assoziiertes Protein; *JIP*: durch Jasmonat-induziertes Protein; *CRT3*: Calreticulin 3; *MAPK2*: MAP Kinase 2; *RELA*: *RELA*-Homolog; *ARP*: durch Auxin reprimiertes Protein; *MR-TF*: *myb-related* Transkriptionsfaktor; *ANKYRIN*: *Ankyrin-repeat* Protein; hpi: Stunden nach Inokulation.

Das Gen der PR1-Vorstufe wies in diesem Versuch nur in cv. Nickel die erwartete Induktion auf. Da der zweite Marker, der Nitrattransporter *OPT6*, aber wie erwartet in beiden Kultivaren induziert war, galt die Infektion der Pflanzen durch den Pilz als erfolgreich. Exakt konnte das Ergebnis der *macroarray*-Analysen nur für zwei Gene bestätigt werden, *vSNARE11* und *DIMI*. Beide waren im Array und im unabhängigen Versuch nur in cv. Maresi induziert. In der RT-PCR war *DIMI* auch in cv. Nickel 48 hpi leicht induziert, was den Array-Ergebnissen aber nicht widerspricht, da diese nur mit 24 hpi-Material durchgeführt worden waren. *vSNARE11* war in cv. Nickel überhaupt nicht exprimiert, was durch eine Wiederholung der PCR mit 40 Zyklen bestätigt wurde (nicht gezeigt).

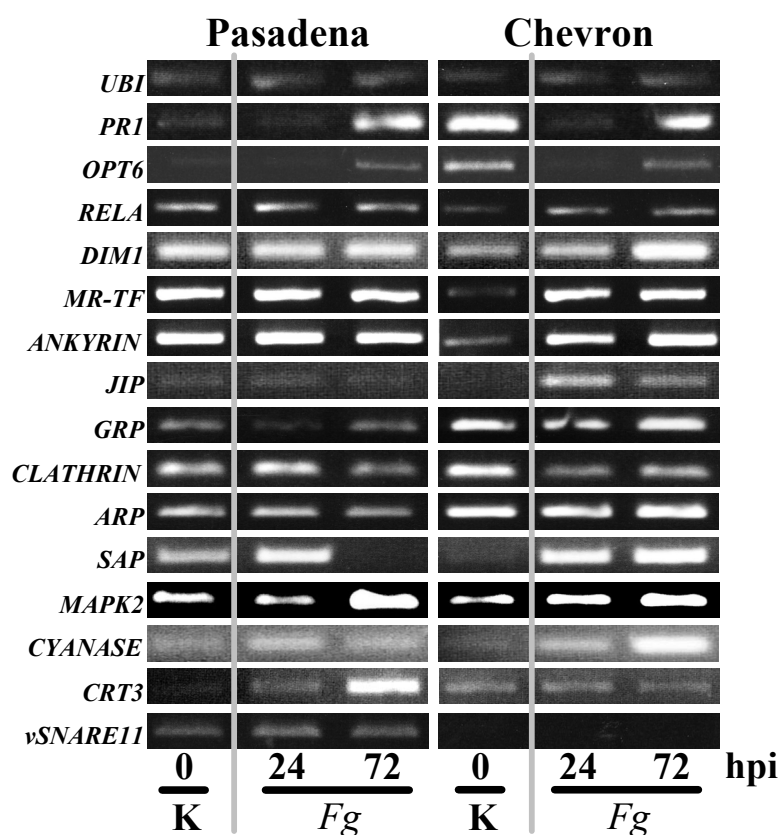
Die Ergebnisse der *macroarray*-Analysen konnten teilweise für die Gene *GRP* (*glycine rich protein*), *CLATHRIN*, *SAP* (*senescence associated protein*), *JIP*, *CRT3* und *MAPK2* bestätigt werden. Das *GRP*, im Array nur in cv. Nickel induziert, war nach der RT-PCR in beiden Kultivaren induziert, in cv. Maresi sogar deutlicher. *CLATHRIN* war im Array nur in cv. Nickel induziert. Im unabhängigen Versuch war es in cv. Nickel ausschließlich 24 hpi induziert, in cv. Maresi hingegen zu allen drei untersuchten Zeitpunkten (6 – 48 hpi). *SAP*, im Array für cv. Nickel deutlich reprimiert und in cv. Maresi induziert, war in der RT-PCR in cv. Nickel nicht differentiell exprimiert, in cv. Maresi 24 hpi schwach induziert. Das *JIP*, im Array in cv. Maresi mehrheitlich induziert und in beiden cv. Nickel-Versuchen deutlich reprimiert, zeigte sich bei der *two-step* RT-PCR in cv. Maresi induziert (besonders deutlich 48 hpi), in cv. Nickel war es dagegen nicht differentiell exprimiert. *CRT3* war im Array in beiden Kultivaren induziert. Mit dem Material des unabhängigen Versuchs konnte dies für cv. Nickel in der radioaktiven *Northern*-Analyse bestätigt werden, in cv. Maresi dagegen zeigte sich in diesem *Northern*, wenn überhaupt, nur eine sehr schwache Induktion. Die *MAPK2* war in der semi-quantitativen *two-step* RT-PCR in beiden Kultivaren durch die Pilzinfektion leicht induziert, die Ergebnisse der RT-PCR stimmen also für cv. Nickel mit denen des Versuchs GB 2 überein. Die Gene *RELA*, *ARP*, *MR-TF* und *ANKYRIN* zeigten im unabhängigen Inokulationsversuch keine differentielle Expression. Die vom Array unabhängige *CYANASE* war in beiden Kultivaren induziert, in cv. Maresi vor allem 24 hpi, in cv. Nickel zu allen untersuchten Zeitpunkten.

### 3.3.2 Expressionsmuster der Kandidatengene in Gerstenähren

Die Expression der nach den *macroarray*-Analysen ausgewählten Kandidatengene wurde in zwei unabhängigen Versuchen auch in Gerstenähren untersucht. In beiden Experimenten wurden ebenfalls je eine *Fc*-anfälligerer mit einer *Fc*-resistenteren Sorte verglichen. Im ersten



Versuch wurde Material der Kultivare Pasadena (anfälliger) und Chevron (weniger anfällig) in Hamburg erstellt. Untersuchte Zeitpunkte waren hierbei 0 h als Kontrolle und 24 bzw. 72 Stunden nach Inokulation (hpi) als Behandlung (GÄ HH, s. Tab. 2.2). Der zweite Versuch wurde mit den für die cDNA-*macroarrays* verwendeten cv. Maresi und cv. Nickel durchgeführt. Die Erntezeitpunkte waren 0, 24 und 48 Stunden nach Inokulation (Versuch GÄ 1, s. Tab. 2.2). Während bei GÄ HH jedoch mit *Fusarium graminearum* (*Fg*) inokuliert wurde, wurden die Ähren bei Versuch GÄ 1 mit *Fc* infiziert. Abb. 3.4 zeigt das Ergebnis der *two-step* RT-PCR für die einzelnen Gene, die mit Material des Versuchs GÄ HH erhalten wurden, Abb. 3.5 zeigt dasjenige des Versuchs GÄ 1.



**Abb. 3.4** Expressionsmuster der Kandidatengene im Gerstenähren-Versuch HH.

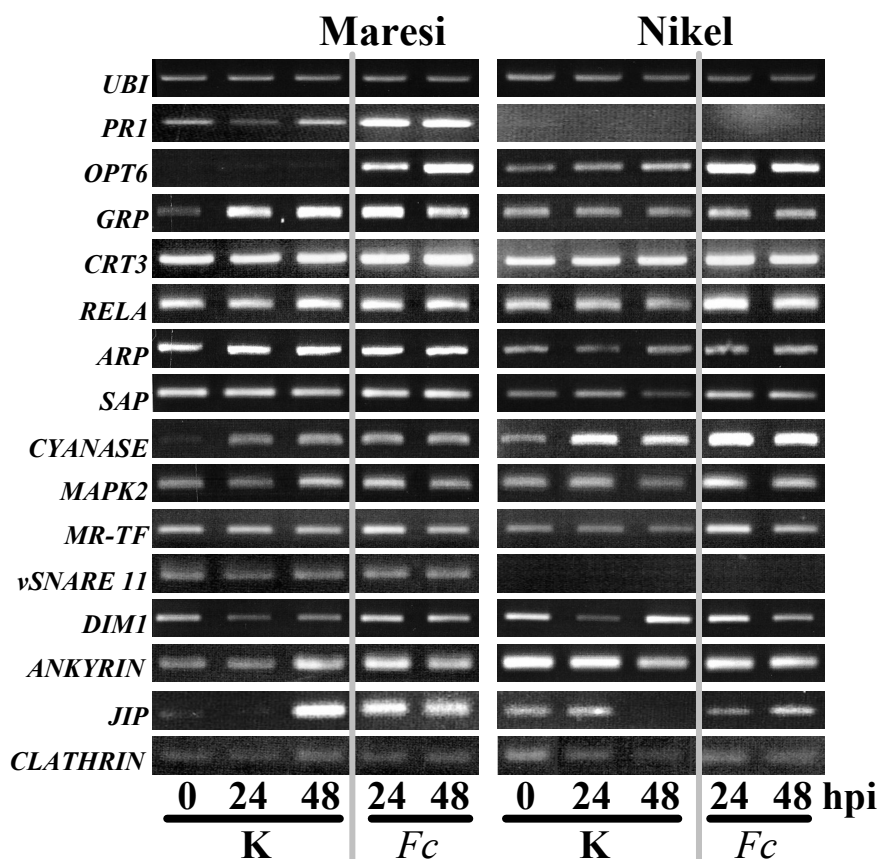
Die Ähren von Gerstenpflanzen der Sorten Pasadena und Chevron wurden zum Zeitpunkt der Milchreife mit *Fg* inokuliert, Kontrollpflanzen entsprechend mit Tween-Wasser. Geerntet wurden die Ähren 0, 24 und 72 Stunden nach Inokulation (hpi). Die aus den Ähren extrahierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Expression der Kandidatengene mittels semi-quantitativer *two-step* RT-PCR untersucht. Die gleichmäßige Einstellung der Konzentration der einzelnen cDNA-Proben wurde durch Amplifikation eines konstitutiv exprimierten Ubiquitings (TIGR Acc. No.: TC145698) überprüft. Als Marker für eine erfolgreiche Infektion der Pflanzen durch den Pilz diente eine Vorstufe des *PRI*-Proteins sowie der Nitrattransporter *OPT6*. *UBI*: Ubiquitin; *PRI*: *PRI*-Precursor; *OPT6*: Nitrattransporter; *RELA*: *RelA*-Homolog; *DIM1*: *Dim1*-Homolog; *MR-TF*: *myb-related* Transkriptionsfaktor; *ANKYRIN*: Ankyrin-repeat Protein; *JIP*: durch Jasmonat-induziertes Protein; *GRP*: Glycin-reiches Zellwandprotein; *CLATHRIN*: *clathrin coat assembly*-Protein; *ARP*: durch Auxin reprimiertes Protein; *SAP*: Seneszenz-assoziiertes Protein; *MAPK2*: MAP Kinase 2; *CRT3*: Calreticulin 3; *vSNARE11*: Vesikeltransport-Protein; hpi: Stunden nach Inokulation.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass bei GÄ HH die Kontrollpflanzen des cv. Chevron in irgendeiner Form gestresst waren, da sowohl die *PRI*-Vorstufe als auch der *OPT6* hier induziert waren. Bei cv. Pasadena zeigten beide Marker eine Induktion 72 hpi.

Bei GÄ HH waren in dem *Fusarium*-anfälligeren cv. Pasadena fünf der untersuchten Gene (*RELA*, *DIMI*, *MR-TF*, *ANKYRIN* und *JIP*) nicht differentiell exprimiert. Diese Gene waren dagegen in der resistenteren Chevron schwach (*RELA*) bis deutlich (*DIMI*, *MR-TF*, *ANKYRIN*, *JIP*) induziert. *GRP* war in cv. Pasadena 24 hpi reprimiert und in cv. Chevron nicht differentiell exprimiert. Ebenfalls reprimiert war bei GÄ HH das *CLATHRIN*, in cv. Pasadena erst 72 hpi, in cv. Chevron bereits 24 hpi. Das *ARP* war in cv. Chevron nicht differentiell, in Pasadena eher schwach reprimiert. Das *SAP* war im Kultivar Pasadena 24 hpi zunächst induziert, 72 hpi dagegen überhaupt nicht mehr exprimiert. In cv. Chevron war es sowohl 24 als auch 72 hpi stark induziert. Mit der *MAPK2* und der *CYANASE* verhielt es sich wie im Blattversuch, beide waren in beiden Kultivaren induziert. *CRT3* war in der anfälligeren Sorte Pasadena 72 dpi deutlich induziert, in dem resistenteren cv. Chevron nicht differentiell exprimiert. Ähnlich zum Blattversuch verhielt sich das Expressionsmuster von *vSNARE11*: es war nur im anfälligeren Kultivar exprimiert, wenn auch kaum induziert.

Im Versuch GÄ 1 zeigte das Gen der *PRI*-Vorstufe nur in cv. Maresi die erwartete Induktion, während in cv. Nickel überhaupt keine Expression zu beobachten war. *OPT6* zeigte die Induktion in beiden Kultivaren, die Infektion galt daher als erfolgreich.

*GRP* und *CRT3* waren in cv. Nickel auch schon 24 und 48 hpi schwach induziert, während *GRP* in cv. Maresi 48 hpi reprimiert schien. *RELA*, *ARP*, *SAP*, die *CYANASE* und die *MAPK2* waren in cv. Nickel bereits 24 hpi induziert, *MR-TF* erst 48 hpi. *vSNARE11*, *DIMI*, *ANKYRIN* und *JIP* waren in cv. Maresi zu allen Zeitpunkten induziert, in cv. Nickel war *JIP* nur 48 hpi, *ANKYRIN* 48 hpi und *Dim1* 24 hpi, während 48 hpi reprimiert war. *CLATHRIN* war in diesem Versuch nicht differentiell exprimiert.

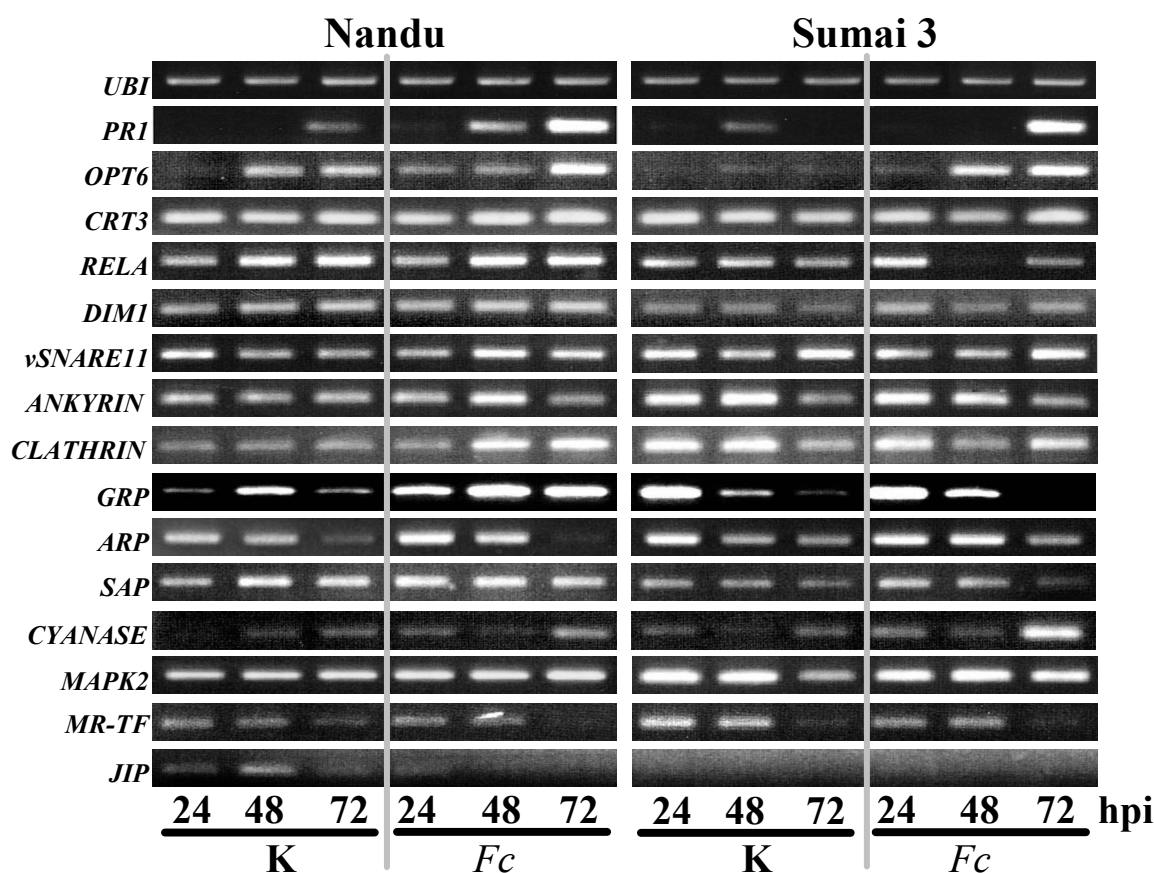


**Abb. 3.5** Expressionsmuster der Kandidatengene im Gerstenähren-Versuch GÄ 1. Die Ähren der Gerstenpflanzen der Kultivare Maresi und Nickel wurden zum Zeitpunkt der Milchreife mit *Fc* inokuliert, Kontrollpflanzen mit Tween-Wasser besprüht. Geerntet wurden die Ähren 0, 24 und 48 Stunden nach Inokulation (hpi). Die aus den Ähren extrahierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Expression der Kandidatengene mittels semi-quantitativer *two-step* RT-PCR untersucht. Die gleichmäßige Einstellung der Konzentration der einzelnen cDNA-Proben wurde durch Amplifikation eines konstitutiv exprimierten Ubiquitins (TIGR Acc. No.: TC145698) überprüft. Als Marker für eine erfolgreiche Infektion der Pflanzen durch den Pilz diente eine Vorstufe des PR1-Proteins sowie der Nitratttransporter *OPT6*. *UBI*: Ubiquitin; *PR1*: *PR1*-Precursor; *OPT6*: Nitratttransporter; *GRP*: Glycin-reiches Zellwandprotein; *CRT3*: Calreticulin 3; *RELA*: *RELA*-Homolog; *ARP*: durch Auxin reprimiertes Protein; *SAP*: Seneszenz-assoziiertes Protein; *MAPK2*: MAP Kinase 2; *MR-TF*: *myb-related* Transkriptionsfaktor; *vSNARE11*: Vesikeltransport-Protein; *DIM1*: *DIM1*-Homolog; *ANKYRIN*: *Ankyrin-repeat* Protein; *JIP*: durch Jasmonat-induziertes Protein; *CLATHRIN*: *clathrin coat assembly*-Protein; hpi: Stunden nach Inokulation.

### 3.3.3 Expressionsmuster der Kandidatengene in Weizenblättern

Die Analyse der Expression der Kandidatengene in Weizenblättern erfolgte in der gegenüber *Fusarium* stark anfälligen Sorte Nandu und in der resistenteren Sorte Sumai3. Es wurden sieben Tage alte Weizenpflanzen mit einer Sporensuspension von *Fc* inokuliert, die Erntezeitpunkte lagen bei 24, 48 und 72 Stunden nach Inokulation (hpi). In Abb. 3.6 sind die Ergebnisse der semi-quantitativen *two-step* RT-PCR dargestellt.

Beide Markergene (*PR-1* und *OPT6*) zeigten in diesem Versuch eine Induktion nach Inokulation mit dem Pilz.



**Abb. 3.6** Expressionsmuster der Kandidatengene in Weizenblättern (WB 1)

Sieben Tage alte Weizenpflanzen der Kultivare Nandu und Sumai3 wurden mit einer Sporensuspension von *Fc* inokuliert, Kontrollpflanzen entsprechend mit Tween-Wasser besprüht. Geerntet wurden die Blätter 24, 48 und 72 Stunden nach Inokulation (hpi). Die aus den Blättern extrahierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Expression der Kandidatengene mittels semi-quantitativer *two-step* RT-PCR untersucht. Die gleichmäßige Einstellung der Konzentration der einzelnen cDNA-Proben wurde durch Amplifikation eines konstitutiv exprimierten Ubiquitings (TIGR Acc. No.: TC145698) überprüft. Als Marker für eine erfolgreiche Infektion der Pflanzen durch den Pilz diente eine Vorstufe des PR1-Proteins sowie der Nitrattransporter *OPT6*. *UBI*: Ubiquitin; *PR1*: *PR1*-Precursor; *OPT6*: Nitrattransporter; *CRT3*: Calreticulin 3; *RELA*: *RELA*-Homolog; *DIMI*: *DIMI*-Homolog; *vSNARE11*: Vesikeltransport-Protein; *ANKYRIN*: *Ankyrin-repeat* Protein; *CLATHRIN*: *clathrin coat assembly*-Protein; *GRP*: Glycin-reiches Zellwandprotein; *ARP*: durch Auxin reprimiertes Protein; *SAP*: Seneszenz-assoziiertes Protein; *MAPK2*: MAP Kinase 2; *MR-TF*: *myb-related* Transkriptionsfaktor; *JIP*: durch Jasmonat-induziertes Protein; hpi: Stunden nach Inokulation.

Insgesamt waren nur schwache Effekte zu sehen. *CRT3* war in beiden Kultivaren nicht differentiell exprimiert. *RELA* und *DIMI* zeigten in cv. Nandu überhaupt keine veränderte Expression, in Sumai3 war *RELA* 24 hpi induziert, 48 hpi reprimiert, *DIMI* war in diesem Kultivar 24 und 72 hpi induziert. *vSNARE11* und *ANKYRIN* waren in Sumai3 nicht differentiell exprimiert, in cv. Nandu dagegen war *vSNARE11* 24 hpi reprimiert, 48 und 72

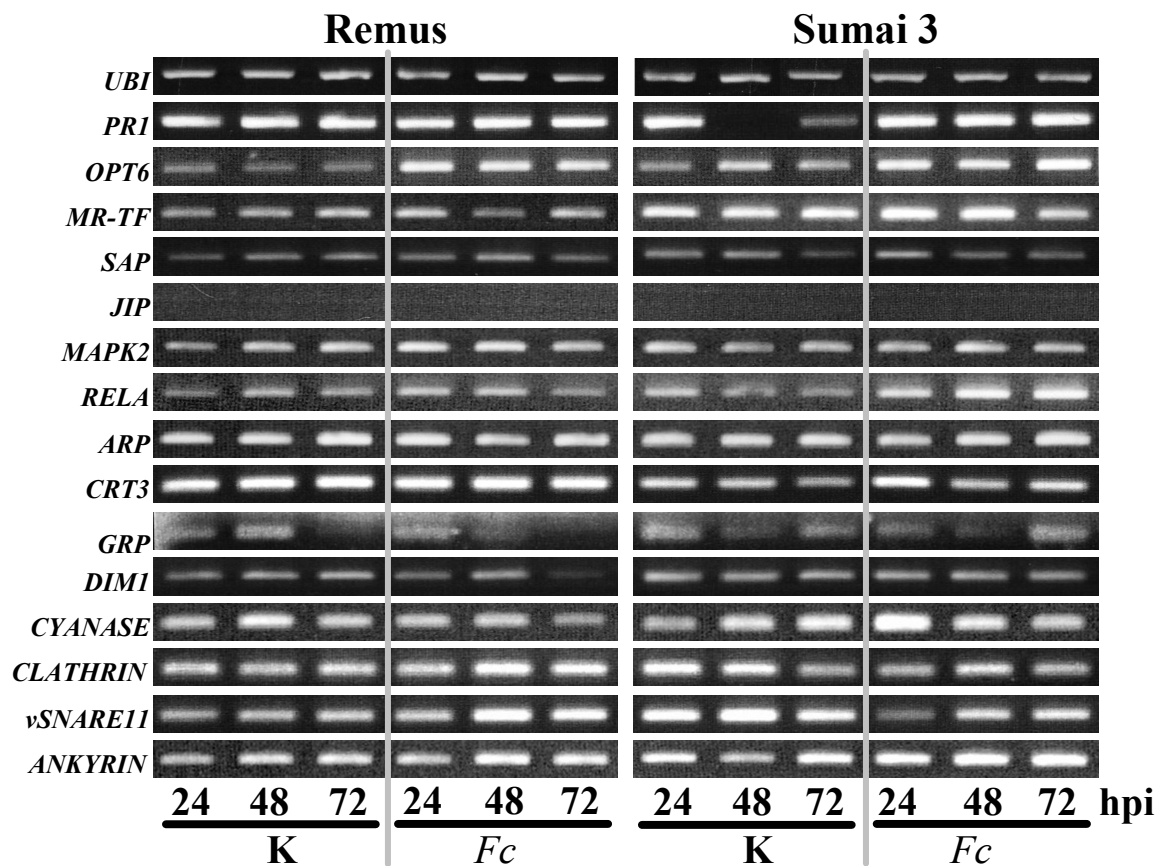
hpi induziert und *ANKYRIN* 48 hpi induziert. *CLATHRIN* und *GRP* waren in cv. Nandu beide deutlich induziert, *CLATHRIN* war in Sumai3 24 hpi induziert, 48 hpi reprimiert und 72 hpi wieder induziert. *ARP*, *SAP*, die *CYANASE* und die *MAPK2* waren in beiden Kultivaren schwach (*MAPK2*: Nandu kontinuierlich, Sumai3 72 hpi; *SAP*: Nandu 24 hpi, Sumai 3 24 + 48 hpi) bis deutlich (*ARP*: cv. Nandu 24 + 48 hpi; Sumai3 48 hpi; *CYANASE*: 24-72 hpi) induziert. *MR-TF* und *JIP* zeigten eher eine Repression (*MR-TF*: cv. Nandu 72 hpi, Sumai3 24 + 48 hpi; *JIP* cv. Nandu 48 hpi) bzw. waren überhaupt nicht exprimiert (*JIP*: cv. Sumai3).

### 3.3.4 Expressionsmuster der Kandidatengene in Weizenähren

Für die Expressionsanalyse der Kandidatengene in Weizenähren wurde ein Versuch mit dem *Fc*-anfälligeren Kultivar Remus und der im Blattversuch bereits untersuchten weniger *Fc*-anfälligen Sorte Sumai3 durchgeführt, da die Infektion des cv. Nandu nicht erfolgreich war. Auch im Weizen wurden die Ähren zum Zeitpunkt der Milchreife mit *Fc* inokuliert und 24, 48 und 72 Stunden nach Inokulation (hpi) geerntet. Die Einstellung der Konzentration der einzelnen cDNA-Proben erfolgte durch die Amplifikation des konstitutiv exprimierten Ubiquitin-Gens, als Marker für eine erfolgreiche Infektion der Pflanzen durch den Pilz wurde die Expression der Vorstufe des *PRI*-Proteins und des *OPT6* untersucht. Abb. 3.6 zeigt die Ergebnisse der *two-step* RT-PCRs.

Auch in diesem Versuch stellte sich *OPT6* als der zuverlässigere Marker für die Pilzinfektion heraus, da er in beiden Kultivaren induziert war, die *PRI*-Vorstufe zeigte nur in cv. Sumai3 eine verstärkte Expression.

Die Kandidatengene zeigten in Weizenähren, verglichen mit allen anderen untersuchten Organen, die geringsten Unterschiede in der Expression nach der Inokulation mit *Fc*. Für die Gene *MR-TF*, *SAP*, *JIP* und die *MAPK2* konnte keine differentielle Expression nachgewiesen werden. *RELA*, *ARP* und *CRT3* waren in cv. Remus nicht differentiell exprimiert, in Sumai 3 war *RELA* dagegen recht deutlich, *ARP* 72 hpi schwach und *CRT3* 24 und 72 hpi induziert. *GRP*, *DIMI* und die *CYANASE* waren in Remus jeweils leicht (*DIMI*, 72 hpi; *CYANASE*, 48 + 72 hpi) bis deutlich (*GRP*, 48 hpi) reprimiert, in Sumai3 war das *GRP* 72 hpi im Vergleich zur Kontrolle leicht induziert, *DIMI* nicht differentiell exprimiert und die *CYANASE* 24 hpi schwach induziert, 72 hpi schwach reprimiert. *CLATHRIN* war in cv. Remus schwach induziert, in cv. Sumai 3 zu den Zeitpunkten 24 und 48 hpi im Vergleich zur Kontrolle leicht schwächer exprimiert. *vSNARE11* war im anfälligeren cv. Remus induziert, im resistenteren cv. Sumai 3 vor allem 24 und 48 hpi reprimiert. Für *ANKYRIN* konnte in beiden Kultivaren eine schwache Induktion beobachtet werden.



**Abb. 3.7** Expressionsmuster der Kandidatengene in Weizenähren (WÄ 1).

Die Ähren von Weizenpflanzen der Kultivare Remus und Sumai3 wurden zum Zeitpunkt der Milchreife mit *Fc* inokuliert, Kontrollpflanzen entsprechend mit Tween-Wasser besprüht. Geerntet wurden die Ähren 24, 48 und 72 Stunden nach Inokulation (hpi). Die aus den Ähren extrahierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Expression der Kandidatengene mittels semi-quantitativer *two-step* RT-PCR untersucht. Die gleichmäßige Einstellung der Konzentration der einzelnen cDNA-Proben wurde durch Amplifikation eines konstitutiv exprimierten Ubiquitings (TIGR Acc. No.: TC145698) überprüft. Als Marker für eine erfolgreiche Infektion der Pflanzen durch den Pilz diente eine Vorstufe des PR1-Proteins sowie der Nitrattransporter *OPT6*. *UBI*: Ubiquitin; *PRI*: *PRI*-Precursor; *OPT6*: Nitrattransporter; *MR-TF*: *myb-related* Transkriptionsfaktor; *SAP*: Seneszenz-assoziiertes Protein; *JIP*: durch Jasmonat-induziertes Protein; *MAPK2*: MAP Kinase 2; *RELA*: *RELA*-Homolog; *ARP*: durch Auxin reprimiertes Protein; *CRT3*: Calreticulin 3; *GRP*: Glycin-reiches Zellwandprotein; *DIMI*: *DIMI*-Homolog; *CLATHRIN*: *clathrin coat assembly*-Protein; *vSNARE11*: Vesikel-transport-Protein; *ANKYRIN*: *Ankyrin-repeat* Protein; hpi: Stunden nach Inokulation.

### 3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der semi-quantitativen *two-step* RT-PCRs

Fasst man die Ergebnisse der RT-PCRs für die 13 untersuchten Gene in den fünf Versuchen mit den Gersten- und Weizenkultivaren zusammen, so lässt sich für drei dieser Gene eine Regelmäßigkeit in den Expressionsmustern abhängig vom Grad der Anfälligkeit gegenüber *Fc* feststellen. Das *RELA* war in Gersten- und Weizenblättern im *Fc*-anfälligen Kultivar nicht differentiell exprimiert, im weniger anfälligen Kultivar zunächst induziert, anschließend

reprimiert und zum letzten Zeitpunkt wiederum nicht differentiell exprimiert. In den Ähren sowohl der Gerste als auch des Weizens dagegen zeigte der Vergleich der Expressionsmuster in allen drei Versuchen eine deutliche Induktion von *RELA* im weniger anfälligen Kultivar. Für die *CYANASE* konnte in vier der fünf Versuche, unabhängig von Gerste oder Weizen oder untersuchtem Organ beobachtet werden, dass sie im jeweils weniger anfälligen Kultivar stärker induziert war als im anfälligen Kultivar (Ausnahme Weizenblätter: Induktion in beiden Kultivaren gleich). Das *vSNARE11* dagegen war in allen fünf Versuchen im jeweils anfälligen Kultivar induziert, während es im weniger anfälligen nicht exprimiert bzw. reprimiert war.

Ein Überblick über die Ergebnisse der semi-quantitativen *two-step* RT-PCRs ist in Tab. 3.3 dargestellt.

**Tab. 3.3: Überblick Ergebnisse semi-quantitative *two-step* RT-PCRs**

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der RT-PCRs der einzelnen Gene (1. Spalte) in den einzelnen Versuchen, Kultivaren und Zeitpunkten (4. Zeile, jeweils in Stunden nach Inokulation angegeben). ↑: induziert, ↓: reprimiert, -: nicht differentiell exprimiert, n.e.: nicht exprimiert, schwache Induktion bzw. Repression ist in ( ) dargestellt. Pasad.: cv. Pasadena, Chevr.: cv. Chevron. Gene, die eine Regelmäßigkeit in den Expressionsmustern aufzeigten, sind grau hinterlegt.

GEN	Gerste Blatt						Gerste Ähre						Weizen Blatt				Weizenähre												
	GB 3			Nikel			GÄ HH		GÄ 1				WB 1		Sumai 3		WÄ 1		Sumai 3										
	Maresi	Pasad.	Chevr.	Maresi	Nikel	Pasad.	Chevr.	Maresi	Nikel	Maresi	Nikel	Nandu	Sumai 3	Remus	Sumai 3	Remus	Sumai 3												
	6	24	48	6	24	48	24	72	24	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72				
<i>PRI</i>	-	↓	↓	↑	↑	↑	-	↑	-	↑	↑	↑	↑	n.e.	(↑)	↑	↑	-	↓	↑	-	-	-	-	↑	↑			
<i>OPT6</i>	-	↑	↑	(↑)	↑	↑	-	↑	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	(↑)	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑				
<i>RELA</i>	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	(↑)	(↓)	↑	↑	↑	↑	-	-	-	↑	↓	-	↑	-	-	↑	↑	↑		
<i>GRP</i>	↑	↑	↑	↑	↑	(↑)	↓	-	-	(↑)	↑	↓	↑	(↑)	(↑)	↑	↑	↑	↑	-	↑	↓	(↑)	↓	-	↓	-	-	
<i>CLATHRIN</i>	(↑)	(↑)	(↑)	-	(↑)	(↑)	-	↓	↓	↓	-	(↓)	↑	(↑)	(↑)	(↑)	-	↑	↑	-	↓	↑	-	↑	↑	↓	(↓)	-	
<i>ARP</i>	(↑)	(↑)	(↑)	-	-	-	-	(↓)	-	-	-	(↓)	-	↑	↑	↑	↑	↑	↓	-	↑	-	(↑)	(↓)	-	↓	-	(↑)	
<i>vSNARE11</i>	(↑)	↑	↑	n.e.			(↑)	(↑)	n.e.			↑	↑	↑	n.e.			↓	↑	↑	(↓)	-	-	(↑)	↑	↑	↓	↓	(↓)
<i>DIM1</i>	↑	↑	↑	-	-	(↑)	-	-	(↑)	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	-	-	-	↑	-	(↑)	-	(↑)	↓	-	-	-	
<i>MR-TF</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	-	↑	↑	↑	↑	-	-	(↓)	(↓)	(↓)	(↓)	↑	(↓)	-	(↑)	(↑)	(↓)	
<i>ANKYRIN</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	-	↑	-	-	↑	(↑)	↑	(↓)	-	(↓)	-	(↑)	↑	↑	(↑)	↑	(↑)	
<i>SAP</i>	-	(↑)	(↑)	-	-	-	↑	↓	↑	↑	-	(↑)	↑	(↑)	(↑)	(↑)	↑	-	-	↑	(↑)	(↓)	-	-	-	(↑)	-	-	
<i>JIP</i>	-	(↑)	↑	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	(↓)	↑	↓	↑	(↑)	(↓)	↓	-	n.e.			n.e.			n.e.			
<i>CYANASE</i>	(↑)	↑	-	-	↑	↑	↑	(↑)	↑	↑	(↑)	-	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑	↑	-	↑	-	(↓)	(↓)	↑	-	(↓)	
<i>MAPK2</i>	↑	↑	↑	↑	-	(↑)	(↓)	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	(↓)	-	↑	↑	↑	-	(↓)	(↑)	-	
<i>CRT3</i>	-	(↑)	(↑)	↑	↑	↑	(↑)	↑	-	-	↑	↑	↑	↑	(↑)	↑	-	(↑)	-	-	(↓)	(↑)	(↑)	(↑)	-	↑	-	↑	

### 3.4 DAS ARABIDOPSIS-SCREENING

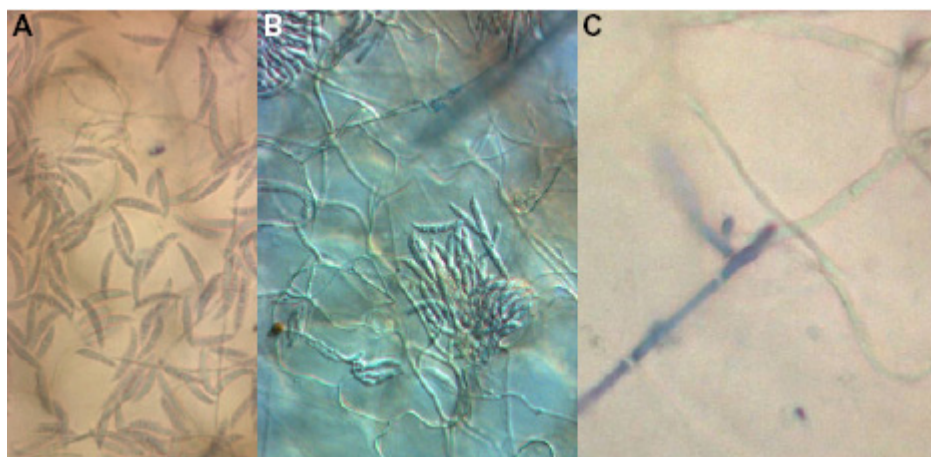
Die im Gerste/Weizen-*Fusarium* Pathosystem differentiell exprimierten Gene sollten im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls funktionell analysiert werden. Da die Erstellung stabil transgener Getreidepflanzen sehr zeitaufwändig ist und kein System zur transienten Überexpression bzw. zum transienten *knock-down* von Genen für die Getreide-*Fusarium*-Interaktion existiert, wurde alternativ ein Arabidopsis-*Fusarium* System entwickelt. In diesem

System wurden nicht nur einige Kandidatengene funktionell überprüft, sondern auch die Beteiligung bekannter systemischer Signaltransduktionswege (Salizylsäure-, Jasmonat- bzw. Ethylen-abhängiger Signalweg) an der Resistenz/Abwehr gegen *Fusarium* in *Arabidopsis* untersucht.

Vorraussetzung für das *Arabidopsis*-screening war die Bestätigung, dass das Getreidepathogen *Fc* in der Lage ist, *Arabidopsis thaliana* erfolgreich zu infizieren. Um diese Frage zu beantworten wurden zunächst verschiedene *Arabidopsis*-Ökotypen mit *Fc* inokuliert und die Interaktion acht Tage nach Infektionsbeginn mikroskopisch untersucht. Vergleichend wurden diese Untersuchungen auch mit dem Pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthiolae* (*Fom*) durchgeführt, das als *Arabidopsis* Pathogen bereits beschrieben worden war (EPPLÉ *et al.* 1997).

### 3.4.1 Die Etablierung des *Arabidopsis* – *Fusarium* Screenings

Um zu untersuchen, ob *Arabidopsis thaliana* ein möglicher Wirt für *Fc* ist, wurden drei Wochen alte *Arabidopsis*pflanzen (Ökotypen: Columbia [Col-0], *Landsberg erecta* [Ler], Wasilewskija [Ws-0]) mit dem Pilz inokuliert. Acht Tage später wurde die Infektion der Blätter mikroskopisch im Durchlicht untersucht. Hierzu wurden die Blätter zunächst entfärbt, anschließend wurde der Pilz mit essigsaurer Tinte angefärbt.



**Abb. 3.9:** **Infektion von *Arabidopsis thaliana* Blättern (Col-0) durch *Fc*.**  
 A zeigt einen Ausschnitt einer Blattfläche, auf der großflächig Konidiosporen verteilt sind. In B ist ein Konidienträger mit Konidiosporen zu sehen. C: Eine *Fc*-Hyphe penetriert eine Epidermiszelle direkt durch die Zellwand. Der äußere Teil der Hyphe ist mit essigsaurer Tinte blau gefärbt, der Teil innerhalb der Zelle wurde von dem Farbstoff nicht erreicht und erschien farblos.

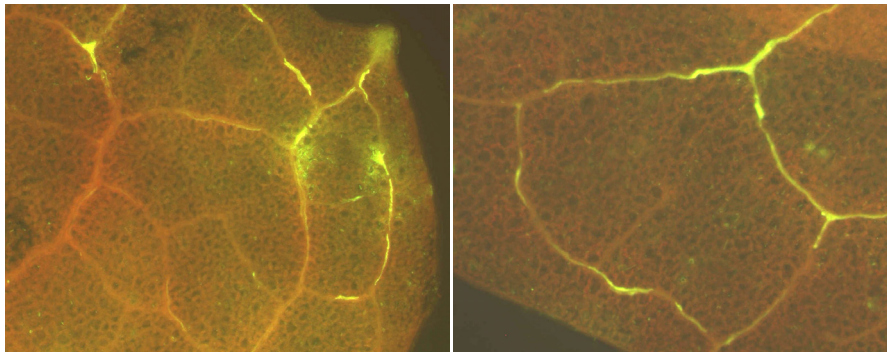
Von den drei untersuchten *Arabidopsis*-Ökotypen war Ler nahezu resistent gegenüber *Fc*, Ws-0 und besonders Col-0 zeigten sich anfällig gegenüber diesem Pathogen. Wie in Abb. 3.9 zu sehen, erfolgte die Penetration direkt durch die Zellwände der Epidermiszellen. Der Pilz



wuchs großflächig auf den Blättern und zum untersuchten Zeitpunkt hatte die Bildung vegetativer Konidiosporen bereits stattgefunden. Das Pathosystem war somit für eine funktionelle Untersuchung von Kandidatengen und der Aufklärung der Beteiligung von Signalwegen an der Abwehr/Resistenz von *Arabidopsis* gegenüber *Fc* geeignet.

Pilze der Art *Fusarium oxysporum* haben eine völlig andere Infektionsstrategie als die hier untersuchten Getreidepathogene. Sie dringen über die Wurzeln in das Vaskulargewebe der Pflanzen ein (DI PIETRO *et al.* 2001). In befallenen Pflanzen verursachen sie Welkesymptome in Teilen der Pflanzen bzw. führen zum Verwelken der gesamten Pflanze. Hervorgerufen wird die Welke entweder durch eine Blockade des Xylems und die damit verbundene mangelnde Wasserversorgung der Pflanze bzw. durch die vom Pilz produzierten Toxine (DE CAL *et al.* 1999, PSIBYTKO *et al.* 2006, <http://www.bayercropscience.de/>).

Um zu überprüfen, ob die im *screening* beobachtete Welke tatsächlich durch die *Fom*-Infektion hervorgerufen wurde, wurden inokulierte Blätter zunächst mit WGA Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 angefärbt und anschließend mikroskopiert. WGA bindet an Chitin und macht sowohl extra- als auch intrazelluläre pilzliche Strukturen sichtbar. Die Abb. 3.10 zeigt deutlich, dass *Fom* sich in den Leitgefäßen der Pflanze ausgebreitet hat. Die Infektion mit *Fom* war also erfolgreich.



**Abb. 3.10** Infektion von *Arabidopsis*-Blättern durch *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*.

Beide Bilder zeigen Ausschnitte von *Arabidopsis*-Blättern. Die Leitgefäße sind jeweils als orangefarbene Bahnen zu erkennen, in diesen Leitgefäßen befindlicher *Fom* ist durch die Färbung mit WGA Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 gelb gefärbt.

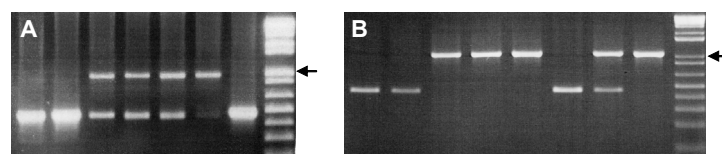
### 3.4.2 Auswahl der Gene für das *Arabidopsis*-Screening

Potentielle Kandidatengene für das *screening* waren zunächst die 13 nach den *macroarray*-Analysen ausgewählten Gene. Da über TIGR-BLAST Analysen nur für vier dieser Kandidatengene Homologe in *Arabidopsis* identifiziert werden konnten (s. Tab. 3.3), wurde zusätzlich nach weiteren interessanten Kandidaten gesucht. Ausgewählt wurden schließlich zwei Zelltodinhibitoren, da sich verminderter Zelltod möglicherweise negativ auf das *Fusarium*-Wachstum auswirken könnte, die Pflanze dadurch also resistenter werden könnte.

Bei den Zelltodinhibitoren handelt es sich um den Caspaseinhibitor *DAD2* (*Defender against Apoptotic Death*, DANON *et al.* 2004) und den sowohl in Pflanzen als auch in Tieren beschriebenen Zelltodinhibitor BAX-Inhibitor-1 (*BI-1*). Die Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase (*2OG*) ist ein Gen, das sich *downstream* von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in dem zu programmiertem Zelltod führenden Signalweg befindet (GECHEV *et al.* 2005). Weitere Gene stammen aus einer Affymetrix *Microarray*-Analyse, wobei Material aus völlig unbehandelten Gerstenähren (cv. Rika), mit Material aus Ähren, die mit *Fg* WT 1003 inokuliert wurden, verglichen wurde. Dabei handelte es sich um ein Germin-like Protein (*GLP7*), eine Peroxidasen (*PPI*), ein Peroxiredoxin (*PER1*) und eine saure Endochitinase (*CHIB1*). Da für einige der Gene mehr als ein Homolog in *Arabidopsis* identifiziert werden konnte, wurden z.T. mehr als eine T-DNA-Insertionslinie pro Kandidatengen im *screening* untersucht. Für die verschiedenen Signalwege wurden EMS-Mutanten von verschiedenen Anbietern bzw. von anderen Instituten bezogen. Die EMS-Mutanten wurden direkt vermehrt, bei den T-DNA-Insertionslinien wurde nach homozygoten Pflanzen gesucht und diese dann vermehrt. Bei den anschließenden Infektionsversuchen wurden die verschiedenen transgenen und mutierten Linien sowohl mit *Fc* als auch mit *Fom* inokuliert.

### 3.4.3 Vermehrung der homozygot transgenen T-DNA-Insertionslinien

Die Unterscheidung der homozygoten von den heterozygoten T-DNA-Insertionslinien bzw. nicht-mutierten Wildtyp-Pflanzen geschah nach dem in Kap. 2.6.1 beschriebenen System mittels 3-Primer-PCR. Laut Angaben der *Arabidopsis* Stock Center sollte ca. ein Drittel der von dort erhaltenen Samen homozygot sein. In dieser Arbeit wurde allerdings festgestellt, dass nur etwa 10 % der untersuchten Pflanzen homozygot waren. Abb. 3.11 zeigt exemplarisch für zwei Insertionslinien die Ergebnisse der 3-Primer-PCR.



**Abb. 3.11: Ergebnisse der 3-Primer-PCR für die Linien *coil* und *v-snare11*.**

Die obigen Gelbilder (A: *coil*, B: *v-snare11*) sind exemplarisch ausgewählt. Die Pfeile zeigen auf die 1 kb-Bande des verwendeten DNA-Größenmarkers, in dessen Höhe sich auch das Amplifikat aus den nicht-transgenen Wildtyppflanzen für alle T-DNA-Linien befand. Die kleinere Bande unterhalb der größeren ergab sich bei einer T-DNA-Insertion im Kandidatengen, bei fehlender oberer Bande in einer PCR lag eine homozygot transgene Pflanze vor.

In Tab. 3.4 sind die untersuchten T-DNA-Insertionslinien aufgelistet, und diejenigen, für die homozygote Pflanzen zur Vermehrung identifiziert werden konnten, grau hinterlegt. In der Tabelle sind jeweils in der ersten und vierten Spalte die Gene aufgelistet, die durch die eingebrachte T-DNA unterbrochen sind. Die ersten sechs Gene der Kandidatengen-Tabelle stammen aus dem *macroarray* (s. Kap. 3.2). *bi-1*, *W2* und *Bin8* wurden von der AG Hückelhoven zur Verfügung gestellt. *W2* und *Bin8* exprimieren ein GFP:BI-1-Fusionsprotein (*W2*) bzw. nur GFP (*Bin8*). Die Expression der Proteine wurde mikroskopisch untersucht. Die übrigen Kandidatengene stammten aus einer Affymetrix-*microarray* Analyse und zeigten in Gerstenähren bei Infektion mit *Fg* eine deutlich höhere Expression (C. Jansen, persönliche Mitteilung). Im zweiten Teil der Tabelle sind T-DNA-Insertionslinien aufgelistet, die in einem systemischen Signalweg verändert sind.

**Tab. 3.4: Liste der auf Homozygotie untersuchten Arabidopsis T-DNA Linien**

Kandidatengene					
Gen	Herkunft	n	Gen	Herkunft	n
<i>relA</i>	Array, diese Arbeit	2/17	<i>glp6</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	-/20
<i>vsnare11</i>	Array, diese Arbeit	3/8	<i>glp7</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	3/20
<i>vsnare13</i>	Array, diese Arbeit	2/7	<i>glp8</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	-/21
<i>mapk</i>	Array, diese Arbeit	-/18	<i>glp10</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	-/28
<i>clathrin</i>	Array, diese Arbeit	7/18	<i>pdr12</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	-/26
<i>2og</i>	GECHÉV <i>et al.</i> 2005	3/16	<i>pp1</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	4/7
<i>dad2</i>	DANON <i>et al.</i> 2004	1/42	<i>pp2</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	2/21
<i>bi-1 (knock-out)</i>	AG Hückelhoven	1/4	<i>per1</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	8/8
<i>W2*</i> <i>B11 Ü-Expr.</i>	AG Hückelhoven	4/4	<i>chib1</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	5/16
<i>Bin8*</i>	Kontrolle zu <i>W2</i>	3/3	<i>abc-tfp</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	-/33
<i>glp2A</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	3/18	<i>mdr4</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	-/41
<i>glp4</i>	Affymetrix-Array, C. Jansen	-/13			

verändert in einem systemischen Signalweg					
Gen	Effekt	n	Gen	Effekt	n
<i>edr1</i>	<i>Enhanced disease resist.</i>	-/39	<i>coi1</i>	JA-insensitiv	3/13
<i>jin1</i>	JA-insensitiv	4/17	<i>aim1</i>	keine JA-Synthese	-/31

n: Anzahl homozygot transgener Pflanzen / Anzahl aller getesteten Pflanzen

grau hinterlegt: Linien, bei denen homozygote Pflanzen zur Vermehrung vorhanden waren

\*: Expression des *GFP:BI-1*-Fusionsproteins (*W2*) bzw. des *GFP* alleine (*Bin8*) wurde unter dem Mikroskop untersucht.

### 3.4.4 Das Screening

Für das eigentliche *screening* nach Unterschieden in der Resistenz von Arabidopsis gegenüber den Pathogenen *Fc* bzw. *Fom* wurden ca. 100 sterilisierte Samen der zu untersuchenden Linie auf Petrischalen mit ½ MS-Agar (3 Platten pro Arabidopsislinie) ausgesät und für drei Wochen im Klimaschrank angezogen. Anschließend wurde je eine Petrischale als Kontrolle mit 0,05 % Tweenwasser besprüht, die anderen beiden Schalen wurden mit der

Sporensuspension eines der beiden Pilze inokuliert. Verglichen wurden die mutierten Linien jeweils mit dem Wildtyp Columbia, die *BI-1*-überexprimierende Transgene wurde mit der mit dem leeren Vektor transformierten spezifischen Kontrolle verglichen. Nach ca. acht Tagen wurde die Stärke der Infektion makroskopisch ermittelt, indem der Grad der Nekrotisierung der Pflanzen und der Menge an Pilzmyzel bonitiert wurden. Die Ergebnisse des *screenings*, das in dreifacher Wiederholung durchgeführt wurde, sind in Tabelle 3.5 sowohl für die drei durchgeführten Wiederholungen (Wdh.) als auch als Durchschnitt (Ø) dargestellt. Beispiele einzelner Experimente sind zur Veranschaulichung in Abb. 3.12 gezeigt.

**Tab. 3.5: Ergebnisse des Arabidopsis-Screenings**

Dargestellt sind die Ergebnisse der durchgeführten Wiederholungen (Wdh.) 1-3. S: höhere Anfälligkeit; R: höhere Resistenz; -: kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; schwache Unterschiede sind in ( ) gesetzt, ein vorgesetzter Pfeil weist auf eine Tendenz hin. Grau hinterlegte Ergebnisse waren höher zu bewerten, da sie auf Agar durchgeführt wurden, auf dem die Pilze nicht ohne Pflanzen wachsen konnten.

	Variante	1. Wdh.		2. Wdh.		3. Wdh.		Ø	
		Fom	Fc	Fom	Fc	Fom	Fc	Fom	Fc
Array	<i>v-snare11</i>	S	-	-	-			→ S	-
	<i>v-snare13</i>	(S)	-	-	-	-	S	-	→ S
	<i>clathrin</i>	-	R	(R)	-		S	-	-
	<i>relA</i>	-	-	R	S		S	→ R	S
Zelltodregulatoren	<i>glp7</i>	(S)	-	-	-	-	R	-	→ R
	<i>pp1</i>	(S)	(S)	-	-	-	-	-	-
	<i>per1</i>	S	S	-	-	S	S	S	S
	<i>dad2</i>	(S)	-	-	-	-	S	-	→ S
	<i>bi-1</i>	S	S	S	S			S	S
	<i>W2</i>	-	R	(S)	(S)		R	-	→ R
	<i>vtcl-1</i>	S	S	-	-			→ S	→ S
	<i>2og</i>	S	S	R	R		R	-	→ R
	<i>chib1</i>	(R)	R		S			-	-
	SA-Mutanten	<i>npr1-2</i>	-	R		S			-
<i>npr1-3</i>		S	S		S			S	S
<i>acd2</i>		-	-	-	(S)			-	-
<i>eds4</i>		-	-	S	S	(S)		→ S	→ S
<i>eds5</i>		-	-	-	-	-	(R)	-	-
<i>pad1</i>		(S)	(S)		(R)	-	(R)	-	-
<i>pad2</i>		S	(S)	S	(S)	-	(S)	S	S
<i>pad4</i>		S	S	(S)	-			→ S	→ S
<i>pad5</i>		-	S	S	-	-	→ S	→ S	
JA-Mutanten	<i>jar1-1</i>	-	-	(R)	(R)	(S)	S	-	→ S
	<i>coil</i>	-	S	-	-			-	→ S
	<i>jin1</i>	S	S	-	(R)	(S)	S	→ S	S
	<i>mpk4</i>	S	(S)	-	(R)			→ S	-
	<i>cev1</i>	(S)	-	(R)	-	S	S	→ S	→ S
	<i>fad7-1</i>	(S)	-	(R)	-	(S)	S	→ S	→ S
	<i>fad8-1</i>	(S)	-	-	(R)	(S)	S	→ S	→ S
	<i>aim1</i>	-	S	-	(R)		S	-	S
ET-Mut.	<i>ein2-1</i>	(R)	R		R			R	R
	<i>eto3</i>	-	-	-	-	-	(R)	-	-
	<i>etr1-1</i>	-	-	(S)	-		(S)	-	-

Fc: *Fusarium culmorum*, Fom: *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthiolae*

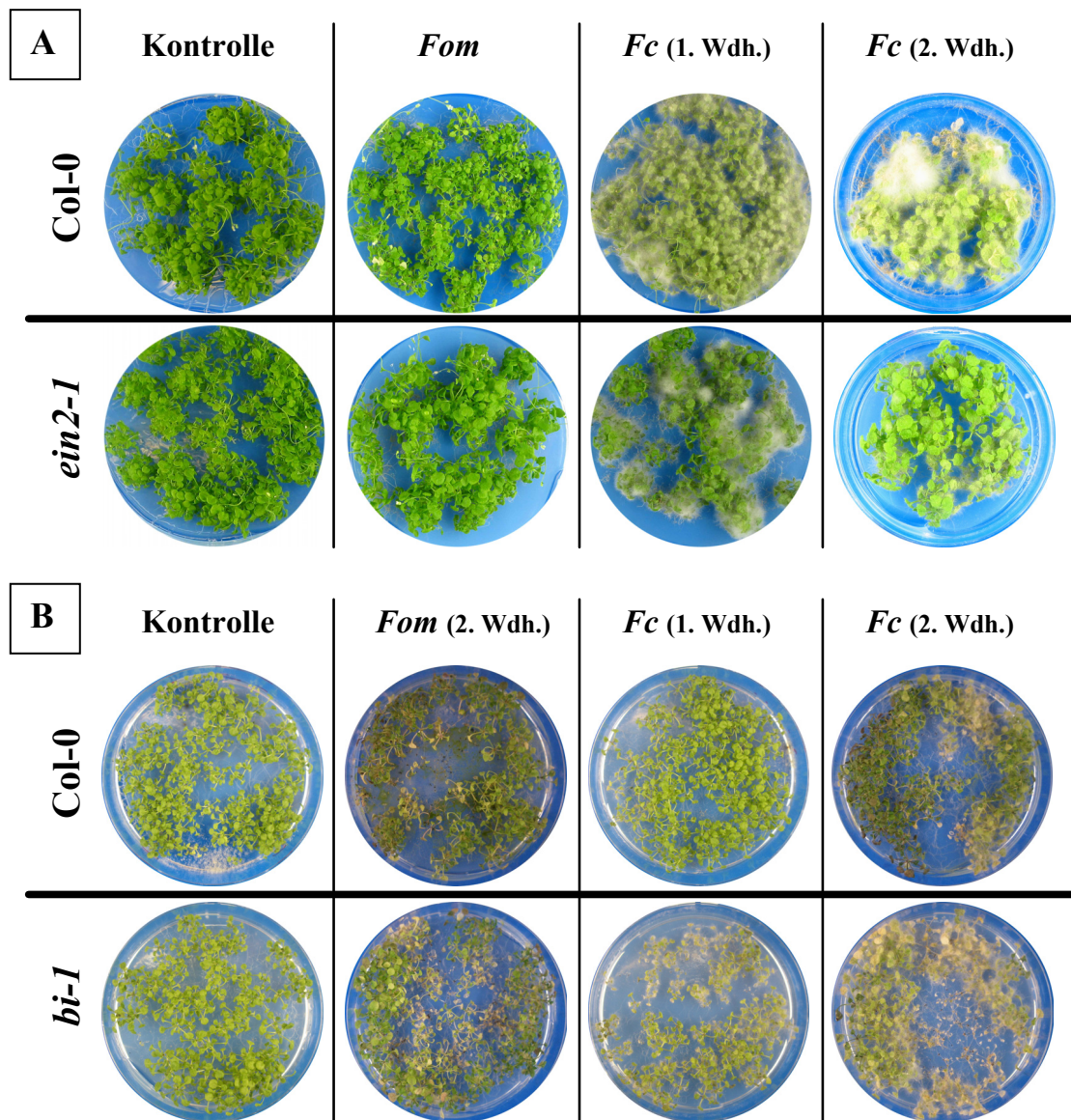
Das *screening* der der aus dem Array erhaltenen Kandidatengene ergab für *relA* eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Fc*, gegenüber *Fom* zeigte sich diese Mutante leicht resistenter. *v-snare11* und *v-snare13* zeigten jeweils eine Tendenz in Richtung erhöhte Anfälligkeit, erstere gegenüber *Fom*, letztere gegenüber *Fc*. Für die Insertionslinie *clathrin* wurde kein reproduzierbarer Unterschied im Resistenzverhalten beobachtet.

Bei den Zelltodregulatoren, waren die Linien *per1*, *bi-1* und *vtc1* anfälliger gegenüber beiden untersuchten Pathogenen bzw. zeigten eine Tendenz in diese Richtung (*vtc1*), *dad2* zeigte diese Tendenz gegenüber *Fc*. Der gegenteilige Effekt, d.h. eine Tendenz in Richtung erhöhter Resistenz, war bei *glp7*, *W2* (der BI-1 überexprimierenden Linie) und *2og* gegenüber *Fc* zu beobachten. *pp1* und *chib1* wiesen im Vergleich zu Col-0 keine Unterschiede im Grad der Anfälligkeit gegenüber *Fc* und *Fom* auf.

Die Untersuchung der SA-Mutanten ergab für *npr1-3* und *pad2* einer erhöhte Anfälligkeit, für *Fom* in der *npr1-3* und für *Fc* in der *pad2* jedoch nur eine Tendenz in Richtung erhöhte Anfälligkeit. Die Mutanten *eds4*, *pad4* und *pad5* zeigten bei beiden Pathogenen eine Tendenz in Richtung Anfälligkeit. Die Mutanten *npr1-2*, *acd2*, *eds5* und *pad1* zeigten keine Unterschiede in der Resistenz/Anfälligkeit.

Bei den im Jasmonat-Signaltransduktionsweg veränderten Arabidopsis-Linien wurde für die *jin1* und die *aim1* in zwei von drei Fällen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Fc* beobachtet, für *Fom* eine Tendenz in diese Richtung bei der *jin1*-Mutante. Die Mutanten *cev1*, *fad7-1* und *fad8-1* zeigten eine Tendenz in Richtung erhöhter Anfälligkeit, die *coil* zeigte ebenso wie *jar1-1* diese Tendenz gegenüber *Fc*. *mpk4* zeigte gegenüber *Fom* eine Tendenz zu erhöhter Anfälligkeit, gegenüber *Fc* zeigte sie keine einheitlichen Unterschiede in der Resistenz verglichen mit dem Wildtyp Col-0.

Bei den Ethylen-Mutanten zeigte sich *ein2-1* zweimal resistenter gegenüber *Fc* und einmal gegenüber *Fom*. Die Mutanten *eto3* und *etr1-1* wiesen keine reproduzierbaren Resistenzunterschiede im Vergleich zum Wildtyp Col-0 auf.



**Abb. 3.12:** Ergebnisse von Infektionsversuchen mit den *A. th.* Mutanten *ein2-1* und *bi-1* im Vergleich zu Col-0.

Zur Veranschaulichung sind zwei Beispiele von Vergleichen des Wildtyps (jeweils obere Reihe) mit einer veränderten Arabidopsis-Mutante/Transgenen (untere Reihe) dargestellt. In der ersten Spalte ist die nicht-infizierte Kontrolle gezeigt, die zweite Spalte zeigt einen *Fom*-Vergleich, in den Spalten 3 und 4 sind *Fc*-infizierte Pflanzen aus zwei verschiedenen Versuchen dargestellt. A: Vergleich der *ein2-1*-Mutante mit erhöhter Resistenz gegenüber *Fusarium* mit Col-0. B: Vergleich der *bi-1*-T-DNA-Insertionslinie mit erhöhter Anfälligkeit gegenüber *Fusarium* mit Col-0.

### 3.5 EINFLUSS VON *F. GRAMINEARUM* UND *P. INDICA* AUF GERSTE

In zahlreichen mono- und dikotylen Pflanzenarten konnten durch die Besiedelung mit dem Wurzelendophyten *Piriformospora indica* (*Pi*) deutliche Wachstumsverbesserungen beobachtet werden. Auch für Gerste konnte in Gefäßversuchen bereits gezeigt werden, dass die Anwesenheit von *Pi* zu einer Erhöhung der Biomasse und zur Steigerung des Kornertrags führt. Neben diesem Wachstumseffekt wurde ebenfalls eine induzierte Resistenz gegenüber

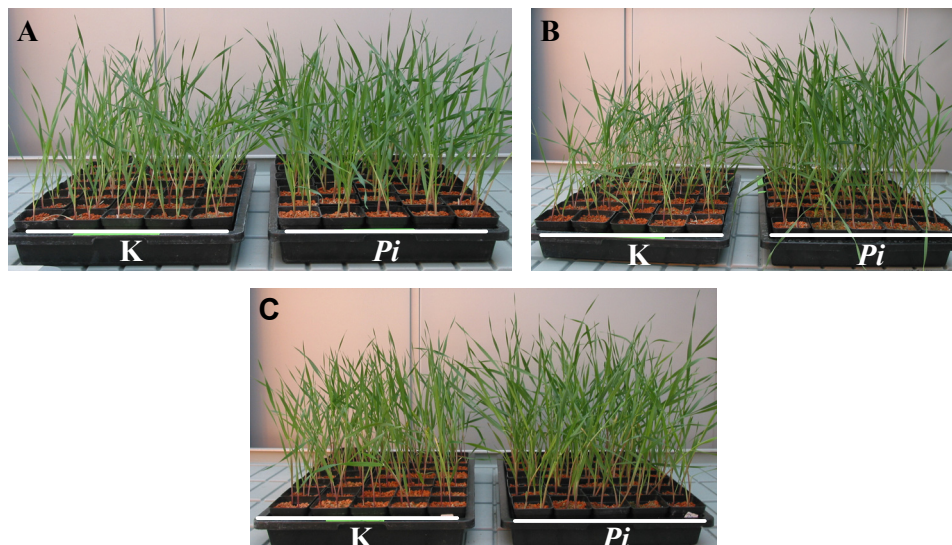
dem echten Gerstenmehltaupilz *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* beobachtet (WALLER *et al.* 2005). Diese Ergebnisse sollen in dieser Arbeit wiederholt und um einen weiteren Parameter, das Pathogen *Fusarium graminearum* (*Fg*), erweitert werden.

Die drei Sommergerstenkultivare Annabell, Ingrid und Maresi wurden in zwei unabhängigen Gefäßversuchen (Ertrag\_I und Ertrag\_II) unter Freiland-Bedingungen in Mitscherlich-Gefäßen systematisch untersucht. Dabei wurden die Einflüsse der beiden Pilze alleine und in Kombination analysiert, um eine mögliche protektive Wirkung des Wurzelendophyten *Pi* gegen *Fg* zu testen. Eine solche Wirkung war bereits in Gerstenwurzeln gegenüber *Fc* beobachtet worden (S. DESHMUK, pers. Mitteilung). Die Kultivare Annabell und Ingrid wurden entsprechend WALLER *et al.* 2005 ausgewählt. Maresi wurde als drittes Kultivar untersucht, da dieses *Fusarium*-anfällige Kultivar auch für die Expressionsanalysen verwendet worden war. Der zeitliche Abstand zwischen den beiden durchgeführten Versuchen, d.h. dem Zeitpunkt der *Pi*-Inokulation, betrug 8 ½ Wochen.

Die Hälfte der Versuchspflanzen für diese Versuche wurden bereits als Keimlinge mit *Pi* inokuliert und für drei Wochen im Gewächshaus kultiviert (s. Kap. 2.7.2). Anschließend wurden die Pflanzen in die Mitscherlich-Gefäße umgetopft, mit *Fg* im Wurzelbereich inokuliert und so bis zur Reife unter Freilandbedingungen kultiviert. Pro Variante gab es insgesamt 36 Pflanzen, je sechs Wiederholungen mit sechs Pflanzen pro Mitscherlich-Gefäß. Zuvor wurde noch die Besiedelung durch den Wurzelendophyten mikroskopisch nachgewiesen und erste Unterschiede im Wachstum fotografisch festgehalten (s. Abb. 3.13). Die erfolgreiche Inokulation mit *Fg* wurde durch Wurzelbohrungen in Zusatzgefäßen kontrolliert, wobei ein Teil des Wurzelmaterials in eine PCR mit *Fg*-spezifischen Primern eingesetzt wurde. Im Folgenden sind nur die Ergebnisse des ersten Versuchs (Ertrag\_I) dargestellt. Die Ergebnisse von Ertrag\_II sind als Abbildungen im Anhang zu finden (Abb. A1 und A2) und werden in Auszügen zur Diskussion herangezogen. Das lag daran, dass sich die Pflanzen durch die späte Aussaat (8 ½ Wochen nach dem ersten) zu schnell entwickelt haben. Dadurch hatte zum einen die Bestockung hat zu früh eingesetzt, zum anderen wurde die Entwicklung nicht abgeschlossen. Die Ähren waren größtenteils noch vom Fahnenblatt eingeschlossen, als die Pflanzen schon abgereift waren.

Nach drei Wochen Anzucht im Gewächshaus sahen in allen drei Kultivaren die mit *Pi* inokulierten Pflanzen üppiger und kräftiger aus. Die direkte Wuchshöhe betreffend waren die größten Unterschiede in cv. Maresi zu sehen, cv. Annabell zeigte kaum Unterschiede.





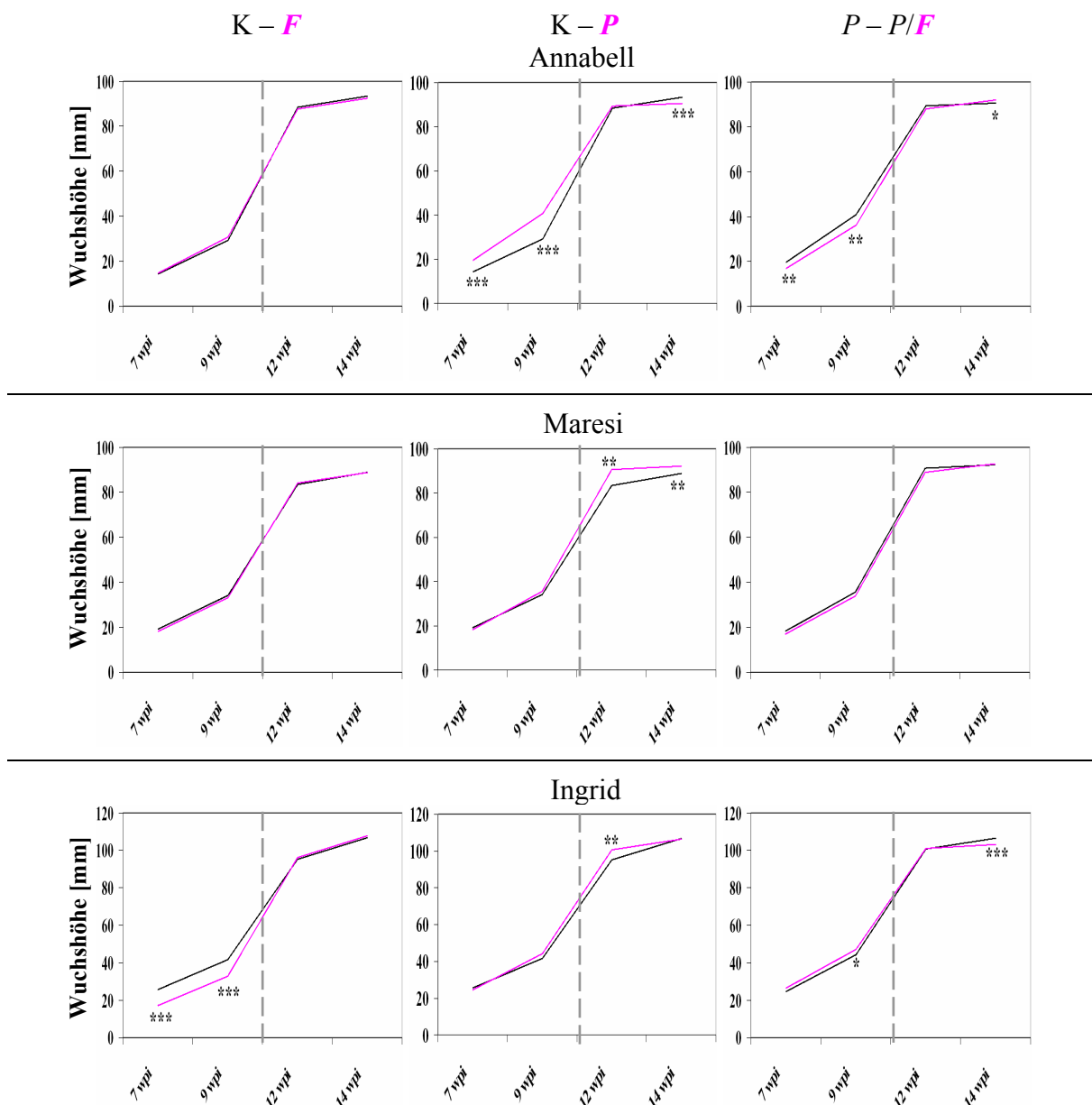
**Abb. 3.13: Wachstumsförderung durch *P. indica* drei Wochen nach Inokulation**  
 Die Bilder zeigen jeweils den Vergleich der Kontrollpflanzen (K) mit den mit *P. indica* inokulierten Pflanzen (*Pi*) für die drei untersuchten Kultivare (A: Annabell, B: Maresi, C: Ingrid). Die Bilder wurden drei Wochen nach Inokulation aufgenommen, unmittelbar bevor die Pflanzen in Mitscherlich-Gefäße umgetopft wurden.

### 3.5.1 Einfluss von *P. indica* und *F. graminearum* auf das Wachstum in Gerste

Zur Beobachtung des Einflusses der Infektion von Gerstenwurzeln mit *Pi* bzw. *Fg* auf das Wachstum wurden 7, 9, 12 und 14 Wochen nach Inokulation (wpi) mit *Pi* die Wuchshöhen der Pflanzen festgehalten (7 und 9 wpi: Messung bis Fahnenblatt, 12 und 14 wpi: Messung bis Grannenspitze). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.14 dargestellt. Für jedes Kultivar gab es vier Varianten: nicht inokulierte Kontrollpflanzen (K), Infektion nur mit *Pi* (*P*), Inokulation nur mit *Fg* (*F*) und Infektion mit beiden Pilzen (*F/P*). So wurde der Einfluß der beiden Pilze einzeln (K – *P* und K – *F*) untersucht bzw. der mögliche protektive Effekt von *Pi* auf *Fg*, hier dargestellt durch den Vergleich der nur mit *Pi* inokulierten Pflanzen mit den mit beiden Pilzen inokulierten Pflanzen (*P* – *F/P*).

Bei cv. Annabell zeigten sich beim direkten Vergleich der Kontrollpflanzen mit *Fg*-Pflanzen zu allen vier Zeitpunkten keine nennenswerten Unterschiede in der Wuchshöhe. Durch *Pi* konnte in cv. Annabell 7 und 9 wpi ein meist deutlich signifikanter wachstumsfördernder Effekt beobachtet werden. 12 wpi war dieser Unterschied nicht mehr vorhanden, 14 wpi waren die *Pi*-Pflanzen verglichen mit den K-Pflanzen signifikant kleiner. Der Vergleich der *Pi*-Pflanzen mit denjenigen, die mit beiden Pilzen inokuliert waren machte deutlich, dass die gleichzeitige Infektion der Wurzeln anfangs (7 und 9 wpi) zu einer Reduktion des Höhenwachstums geführt hatte, 12 und 14 wpi war jedoch kein Unterschied mehr zu den nur mit *Pi* inokulierten Pflanzen zu beobachten.





**Abb. 3.14: Wuchshöhen der verschiedenen Kultivare in Abhängigkeit der Infektion mit *P. indica* und/oder *F. graminearum*.**

Die Wuchshöhe der Pflanzen wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Zu den Zeitpunkten 7 und 9 Wochen nach Inokulation (wpi) wurde bis zum Fahnenblatt gemessen, zu den Zeitpunkten 12 und 14 wpi bis zur Grannenspitze (in den Graphen durch die graue gestrichelte Linie getrennt). Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 36 Pflanzen. In dieser Abb. sind pro Kultivar drei Vergleiche dargestellt: In der ersten Spalte werden Kontrollpflanzen mit *Fg*-infizierten Pflanzen verglichen (K - *F*), Spalte zwei zeigt den Vergleich der Kontrollpflanzen mit *P. indica* (K - *P*) und die dritte Spalte zeigt den Vergleich *P* - *P/F*. Signifikante Unterschiede im jeweiligen Vergleich zu den einzelnen Zeitpunkten sind durch \* angezeigt (ungepaarter Student's t-Test, \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ , \*\*\* =  $P < 0,001$ ).

Das Kultivar Maresi zeigte im Vergleich K - *Fg* keine Unterschiede im Wachstum. *Pi* hatte in diesem Kultivar 7 und 9 wpi ebenfalls keinen Einfluss auf die Wuchshöhe, 12 und 14 wpi waren *Pi*-Pflanzen allerdings signifikant größer als die nicht mit *Pi* infestierten Pflanzen.

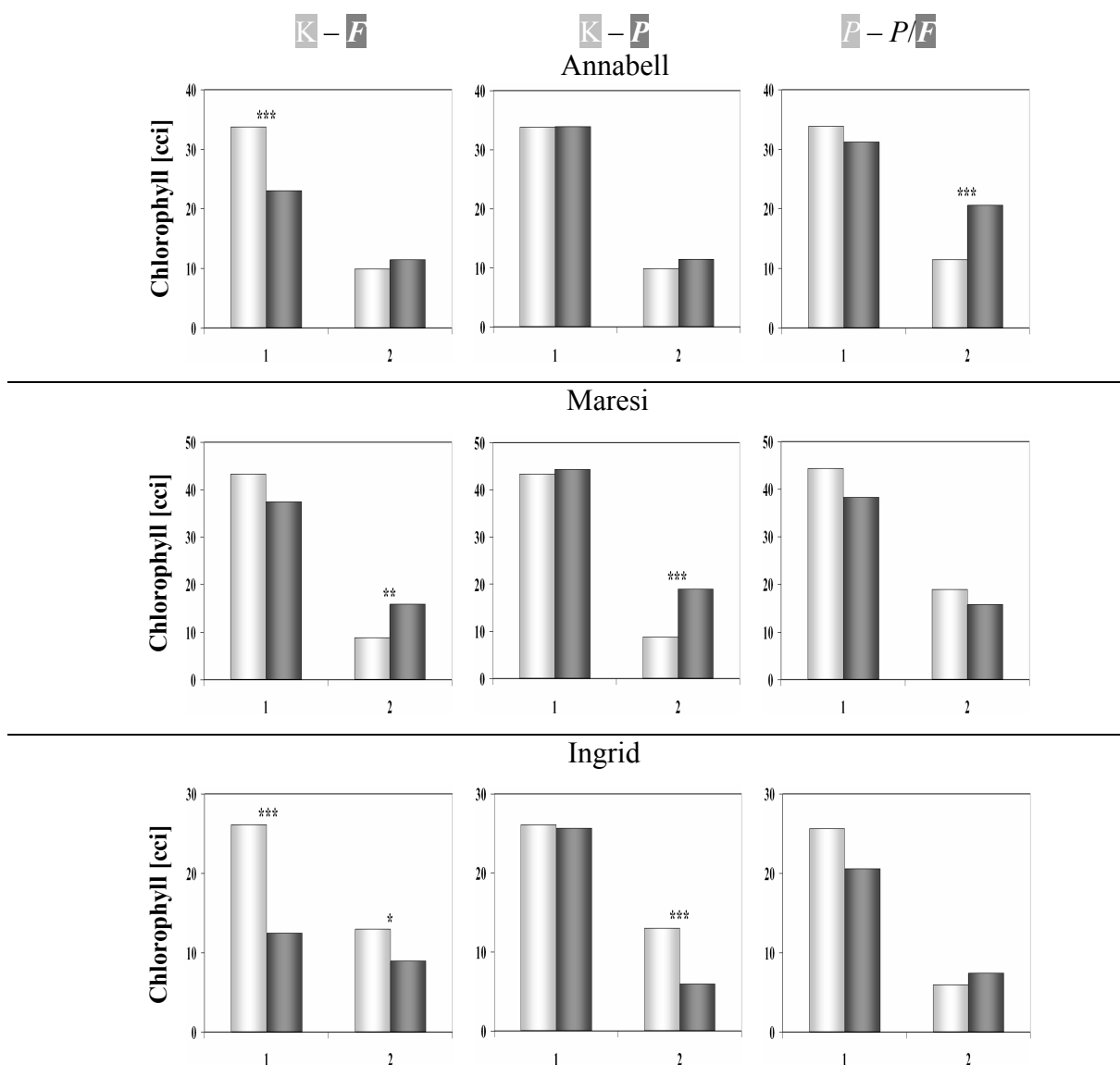
Zudem konnte keine Reduktion des Höhenwachstums durch die Inokulation mit *Fg* bei gleichzeitiger Anwesenheit von *Pi* festgestellt werden (Vergleich *Pi* – *Pi/Fg*).

In cv. Ingrid wurde durch *Fg* 7 und 9 wpi ein deutlicher wachstumsmindernder Effekt bewirkt, der 12 und 14 wpi nicht mehr zu beobachten war. *Pi* verursachte eine leichte Wachstumsförderung besonders 12 wpi. In Anwesenheit von *Pi* hatte *Fg* zu den ersten beiden Messzeitpunkten nicht mehr diese mindernde Wirkung, 14 wpi waren die Pflanzen jedoch hochsignifikant kleiner.

### 3.5.2 Einfluss von *P. indica* und *F. graminearum* auf den Chlorophyllgehalt in Gerste

ACHATZ (2006) hatte im Rahmen von Genexpressionsanalysen von *Pi*-besiedelten Pflanzen im Vergleich mit Kontrollpflanzen mittels Supressiver Subaktiver Hybridisierung (SSH) vor allem chloroplastenkodierte Gene gefunden, die bei *Pi*-Infektion in Gerstenblättern differentiell exprimiert waren. Zudem wirkten *Pi*-besiedelte Pflanzen oft kräftiger und grüner als die entsprechenden Kontrollpflanzen. Um diesem Phänomen weiter auf den Grund zu gehen, wurde die Chlorophyllmenge der Pflanzen dieses Versuchs zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (7 und 9 wpi) gemessen, indem der Chlorophyll-Gehalt-Index [*chlorophyll content index* = *cci*] bestimmt wurde (s. Abb. 3.15).

Cv. Ingrid wies zu beiden Zeitpunkten eine signifikante Verringerung des Chlorophyllgehaltes nach Inokulation mit *Fg* auf. Auch in den Kultivaren Annabell und Maresi wurde 7 wpi ein verringerter Chlorophyllgehalt in *Fg*-inokulierten Pflanzen beobachtet (cv. Annabell hoch signifikant). Zum 2. Messzeitpunkt war dieser Unterschied in cv. Annabell nicht mehr zu beobachten, in cv. Maresi war der Gehalt gegenüber den Kontrollpflanzen sogar erhöht. Der Vergleich des Chlorophyllgehalts der Kontrollpflanzen mit demjenigen der *Pi*-besiedelten Pflanzen zeigt in allen drei Kultivaren 7 wpi keine Unterschiede. Zum 2. Messzeitpunkt waren in cv. Annabell die Werte ungefähr gleich, in cv. Maresi wurde eine deutlich signifikante Erhöhung des Chlorophyllgehaltes durch *Pi* beobachtet. In cv. Ingrid fiel dieser Wert in *Pi*-Pflanzen immer niedriger aus als in den Kontrollen. Auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von *Pi* und *Fg* war 7 wpi in allen drei Kultivaren ein geringerer Chlorophyllgehalt im Vergleich zu nur mit *Pi* inokulierten Pflanzen zu beobachten (allerdings nicht signifikant). Zum 2. Zeitpunkt wiesen in cv. Annabell die *Pi/Fg*-Pflanzen mehr Chlorophyll auf als die nur mit *Pi*-inokulierten Pflanzen, in den anderen beiden Kultivaren waren keine nennenswerten Unterschiede mehr zu vermerken.



**Abb. 3.15: Vergleich der Chlorophyllgehalte der Pflanzen nach Inokulation mit *Pi* und/oder *Fg*.** Zur Beobachtung des Effektes der Pilze auf den Chlorophyllgehalt der Pflanzen wurden von jeder Pflanze an zwei verschiedenen Zeitpunkten der *chlorophyll content index* [cci] gemessen (7 + 9 wpi). Dargestellt sind die Mittelwerte aus den jeweils sechs Wiederholungen. Pro Kultivar sind drei Vergleiche dargestellt: 1. Spalte: Kontrollpflanzen im Vergleich zu *P. indica*-behandelten (K - P); 2. Spalte: Vergleich K - F und die 3. Spalte zeigt den Vergleich P - P/F. Signifikante Unterschiede im jeweiligen Vergleich zu den einzelnen Zeitpunkten sind durch \* angezeigt (ungepaarter Student's t-Test, \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ , \*\*\* =  $P < 0,001$ ).

### 3.5.3 Einfluss von *P. indica* und *F. graminearum* auf die Entwicklung in Gerste

Der Beginn der Blütenbildung und -entwicklung ist agronomisch bedeutend, da dies auch ausschlaggebend für den Zeitpunkt der Ernte ist. Besonders für agronomisch genutzte Pflanzen kann eine beschleunigte Entwicklung unter Umständen von wirtschaftlicher Relevanz sein. Neben dem Zeitpunkt der Blüte wurde bei dem Versuch unter Freilandbedingungen auch die Anzahl der Sprosse pro Mitscherlich-Gefäß ermittelt, da dies

einen direkten Einfluß auf die Höhe des Ertrags hat. Um den Stand der Entwicklung feststellen zu können, wurden die Entwicklungsstadien der vorhandenen Ähren eines jeden Gefäßes an drei verschiedenen Zeitpunkten (10, 11 und 12 Wochen nach Inokulation [wpi]) in drei Klassen eingeteilt: Klasse 1: nur Grannen erkennbar, Klasse 2: Grannen und teilweise Korn sichtbar und Klasse 3: vollständig entwickelte Ähre sichtbar (s. Kap. 2.7.3). Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 3.16 dargestellt.

**Abb. 3.16: Einfluss von *P. indica* und *F. graminearum* auf die Entwicklung in Gerste.**

Dargestellt sind die Entwicklungsstufen der Ähren in den drei untersuchten Kultivaren zu den Zeitpunkten 10, 11 und 12 Wochen nach Inokulation (wpi) mit *P. indica*. Darunter ist die Anzahl der Sprosse pro Gefäß 16 wpi abgebildet. Angegeben sind die Mittelwerte aus sechs Wiederholungen. 10 – 12 wai sind folgende Klassen der Ährenentwicklung dargestellt: Klasse 1: nur Grannen erkennbar (**hellgrau**), Klasse 2: Grannen und teilweise Korn sichtbar (**dunkelgrau**) und Klasse 3: vollständig entwickelte Ähre sichtbar (**schwarz**). Desweiteren sind die Anzahl der Sprosse/Gefäß 16 wai dargestellt. Signifikante Unterschiede bei den einzelnen Zeitpunkten sind durch \* angezeigt (ungepaarter Student's T-Test, \*=P<0,05, \*\*= P<0,01, \*\*\*= P<0,001). Schwarz abgebildete Signifikanzen beziehen sich auf *P. indica*-bedingte Unterschiede (K – P bzw. F – P/F), rot abgebildete Signifikanzen beziehen sich auf *Fg*-bedingte Unterschiede (K – F bzw. P – P/F).

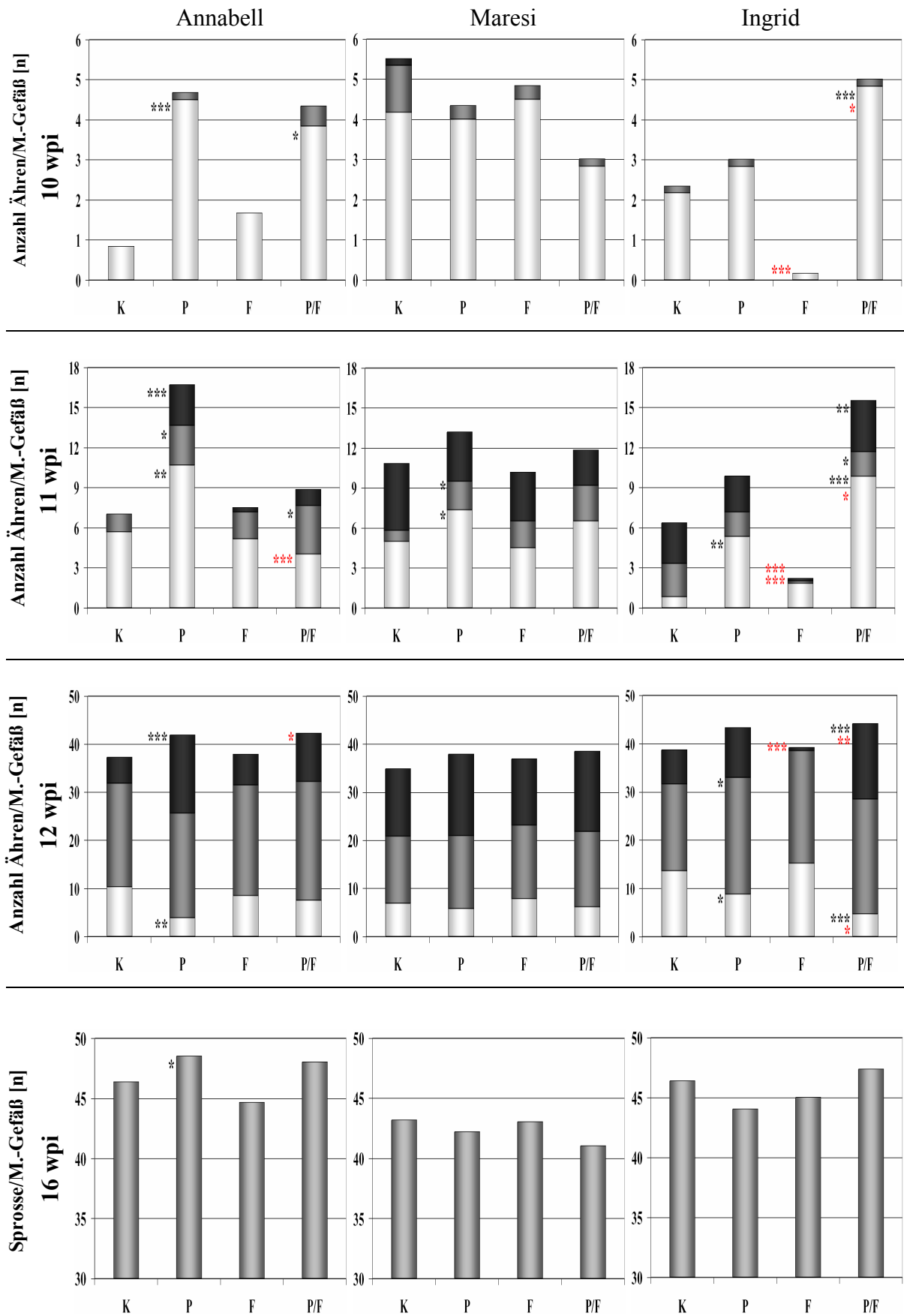


Abb. 3.16: Einfluss von *P. indica* und *F. graminearum* auf die Entwicklung in Gerste.

Für das Kultivar Annabell war zu allen Untersuchungszeitpunkten eine beschleunigte Entwicklung durch den Wurzelendophyten zu vermerken (teilweise deutlich signifikant). Es waren sowohl mehr Ähren (was sich auch 16 wpi in der Anzahl der Sprosse/Gefäß widerspiegelte) als auch weiter entwickelte Ähren vorhanden. Vergleicht man in diesem Kultivar Kontrollpflanzen mit den mit *Fg* inokulierten Pflanzen, so fand sich 10 wpi mit *Fg* mehr Ähren, 11 bis 12 wpi näherten sich die Werte der beiden Behandlungen an und betrachtet man 16 wpi die Anzahl der Sprosse/Gefäß, so fand sich eine verringerte Anzahl durch *Fg*. Vergleicht man *Pi*-Pflanzen mit *Pi/Fg*-Pflanzen, so zeigte sich mit *Fg* 10 wpi eine leicht geringere Anzahl Ähren, die jedoch teilweise schon weiter entwickelt waren. 11 wpi waren in der *Pi/Fg*-Variante deutlich weniger Ähren zu beobachten. 12 wpi hatte sich die Anzahl an Ähren wieder angeglichen, in den *Fg*-Varianten war die Entwicklung aber noch nicht so weit fortgeschritten (11 + 12 wpi teilweise signifikant). Die Anzahl der Sprosse pro Gefäß war bei den *Fg*-infizierten Pflanzen 16 wpi leicht vermindert.

Bezüglich der Effekte von *Pi* fanden sich bei cv. Ingrid ähnliche Beobachtungen zugunsten einer beschleunigten Entwicklung durch den Wurzelendophyten, die teilweise deutlich signifikant waren. 16 wpi fiel in diesem Kultivar die Anzahl der Sprosse pro Gefäß im Vergleich K – P in der mit *Pi*-infestierten Variante geringer aus. Betrachtet man den Einfluss von *Fg*, so zeigte sich im Vergleich K – F zu allen drei Zeitpunkten eine langsamere Ährenentwicklung in den *Fusarium*-Varianten (oft hoch signifikant). Auch 16 wpi war die Anzahl der Sprosse pro Gefäß bei den *Fusarium*-infizierten Varianten geringer. Im Vergleich P – P/F ist der gegenteilige Effekt zu beobachten: 10, 11 und 12 wpi zeigten P/F-Pflanzen eine frühere, schnellere Entwicklung (leicht signifikant) und 16 wpi auch mehr Sprosse pro Gefäß.

Das Kultivar Maresi verhielt sich im Vergleich zu den anderen beiden anders, besonders bezüglich der Effekte durch *Pi*. 10 wpi waren in beiden durch *Pi*-behandelten Varianten weniger Ähren vorhanden als in den entsprechenden Kontrollvarianten. 11 und 12 wpi verschob sich das Verhältnis zugunsten der *Pi*-besiedelten Pflanzen, allerdings nur 11 wpi im Vergleich K – P leicht signifikant. 16 wpi waren bei *Pi*-besiedelten Pflanzen weniger Sprosse pro Gefäß zu beobachten. Durch *Fg* war keine bzw. nur eine leichte Reduktion in der Anzahl der Sprosse pro Gefäß zu beobachten (10 wpi und 11 und 16 wpi im Vergleich P – P/F).

### 3.5.4 Einfluss von *P. indica* und *F. graminearum* auf den Ertrag in Gerste

Letztendlich sollte dieser Versuch dazu dienen, die Einflüsse des mutualistischen Wurzelendophyten *Pi* und des Wurzelpathogens *Fg* auf den Ertrag der Gerste zu untersuchen.

Dazu wurden nach Abreife der Pflanzen folgende Parameter bestimmt: der mittlere Gesamtertrag pro Gefäß, die mittlere Anzahl Ähren pro Gefäß, der mittlere Kornmenge pro Ähre, der Strohertrag und der Ernteindex (Verhältnis Korn:Stroh). Die diesbezüglichen Werte und die durchgeführte Varianzanalyse sind in Tab. 3.6 dargestellt. Zusätzlich wurden der absolute Kornertrag für die drei Kultivare und die jeweilige Variante sowie die relativen Unterschiede in Prozent ermittelt (Abb. 3.17 und Abb. 3.18).

Die mittels der Software SPSS durchgeführte mehrfaktorielle Varianzanalyse diente dazu, signifikante Unterschiede ( $P < 0,5$ ) zwischen den einzelnen Faktoren  $P_i$ ,  $F_g$  und der jeweiligen Sorte herauszustellen.

**Tab. 3.6: Ertragsparameter für Gerste nach Inokulation mit  $P_i$  und  $F_g$ .**

Zur Untersuchung der Einflüsse des Wurzelendophyten *P. indica* und des Pathogens *F. graminearum* wurden verschiedene Ertragsparameter bestimmt. Zunächst wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, deren Signifikanzen im ersten Teil der Tabelle dargestellt sind (Signifikante Werte sind fett markiert). Im zweiten Teil sind die Mittelwerte der jeweils sechs Wiederholungen pro Variante des ersten Experiments aufgeführt. Signifikante Unterschiede im jeweiligen Vergleich zu den einzelnen Zeitpunkten sind durch \* angezeigt (ungepaarter Student's t-Test, \*= $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$ , \*\*\*= $P < 0,001$ ). Sternchen markieren *P. indica*-bedingte Unterschiede (K – P bzw. F – P/F), Kringel  $F_g$ -bedingte Unterschiede (K – F bzw. P – P/F).

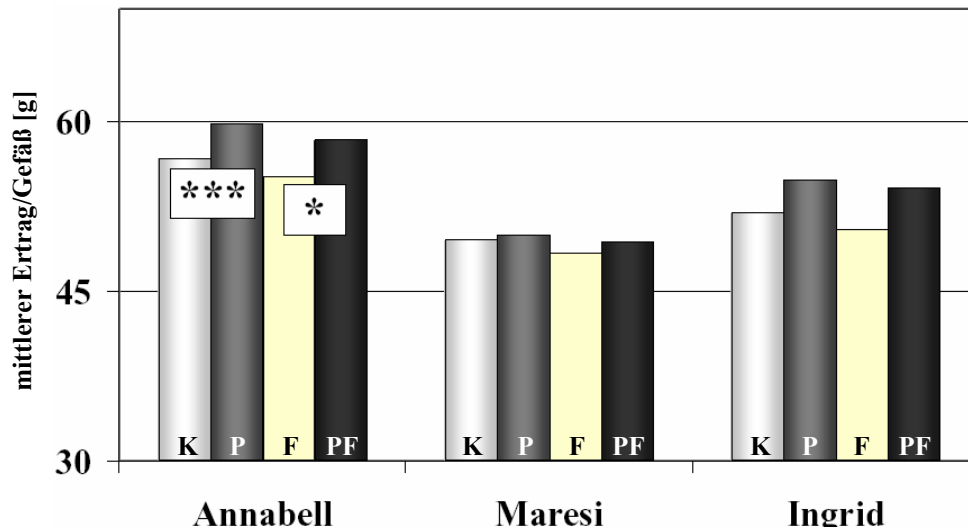
Kultivar	Variante	Ertrag/ Gefäß [g]	TKG	Ähren/ Gefäß	Körner/ Ähre	Stroh ertrag/ Gefäß [g]	Ernte- index/ Gefäß
<b>Signifikanzen der Varianzanalyse</b>							
	<i>P. indica</i>	<b>0,000</b>	<b>0,045</b>	0,516	0,264	<b>0,000</b>	0,307
	<i>F. graminearum</i>	0,072	<b>0,000</b>	0,613	<b>0,002</b>	0,251	<b>0,001</b>
	Sorte	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
	Pi + Fg	0,670	0,850	0,087	0,358	0,379	0,716
	Pi + Sorte	0,176	0,062	<b>0,002</b>	0,127	<b>0,014</b>	<b>0,000</b>
	Fg + Sorte	0,921	0,193	0,357	0,383	0,295	0,172
	Pi + Fg + Sorte	0,982	0,430	0,815	<b>0,045</b>	0,637	0,626
<b>Mittelwerte der einzelnen Parameter</b>							
Annabell	K	56.7 ± 1.24	49.3 ± 0.83	44.5 ± 4.37	24.4 ± 1.04	44.4 ± 0.95	1.3 ± 0.04
	P	59.7 ± 1.00***	50.0 ± 1.27	48.8 ± 1.94	24.1 ± 1.13	45.3 ± 0.62	1.3 ± 0.02
	F	55.0 ± 1.81	48.8 ± 1.82	45.3 ± 3.82	22.7 ± 1.02 <sup>o</sup>	45.3 ± 1.62	1.2 ± 0.02 <sup>oo</sup>
	P/F	58.3 ± 2.49*	48.8 ± 2.20	46.0 ± 5.29	23.0 ± 1.64	46.8 ± 0.87 <sup>oo</sup>	1.2 ± 0.07 <sup>o</sup>
Maresi	K	49.5 ± 1.84	49.1 ± 0.76	44.2 ± 2.23	23.5 ± 1.89	41.3 ± 1.90	1.2 ± 0.02
	P	49.9 ± 2.50	51.1 ± 1.07**	42.2 ± 1.47	21.9 ± 1.52	44.8 ± 1.44**	1.1 ± 0.07*
	F	48.3 ± 1.41	47.2 ± 0.68 <sup>oo</sup>	44.3 ± 1.51	21.7 ± 1.13	41.3 ± 1.47	1.2 ± 0.05
	P/F	49.3 ± 2.60	48.6 ± 1.66 <sup>oo</sup>	39.3 ± 5.68	22.9 ± 1.26	47.0 ± 1.66***	1.0 ± 0.06**
Ingrid	K	51.8 ± 3.84	48.1 ± 1.67	44.5 ± 2.74	21.6 ± 2.35	48.7 ± 2.10	1.1 ± 0.10
	P	54.7 ± 3.27	47.4 ± 0.52	47.7 ± 2.42	23.8 ± 1.48	50.4 ± 3.09	1.1 ± 0.04
	F	50.4 ± 4.53	45.7 ± 1.45 <sup>o</sup>	46.3 ± 1.97	20.9 ± 1.10	48.3 ± 4.59	1.0 ± 0.03
	P/F	54.1 ± 3.38	46.1 ± 0.88 <sup>o</sup>	48.2 ± 1.47	21.5 ± 1.71 <sup>o</sup>	49.8 ± 1.72	1.1 ± 0.04

Dabei zeigte sich, dass *Pi* einen signifikanten Einfluss auf den Ertrag pro Gefäß (cv. Annabell), auf das Tausend-Korn-Gewicht (TKG, cv. Maresi) und den Strohertrag pro Gefäß (cv. Maresi) hatte. *Fg* bewirkte eine signifikante Änderung des TKG (cv. Maresi + Ingrid), der Anzahl Körner/Ähre (cv. Annabell + Ingrid) und des Ernteindex (cv. Annabell). Die Wahl der Sorte hat auf jeden der untersuchten Parameter einen signifikanten Einfluss. Die Interaktion von *Pi* und *Fg* bewirkt ebenso wie die Interaktion von *Fg* und der gewählten Sorte keine signifikanten Veränderungen. Für die Anzahl Ähren pro Gefäß, den Strohertrag pro Gefäß und den Ernteindex bestanden signifikante Wechselwirkungen zwischen *Pi* und der gewählten Sorte. Wechselwirkungen zwischen beiden Pilzen und der Sorte zeigten sich nur für die Anzahl der Körner pro Ähre. Um genau sehen zu können, wo diese Wechselwirkungen bestehen, müssen die Mittelwerte der einzelnen Parameter mit ihren Standardabweichungen und t-Tests betrachtet werden (s. Tab. 3.6).

Alle drei Kultivare zeigten in den verschiedenen Varianten die gleichen Tendenzen, wobei die jeweiligen Unterschiede in cv. Maresi nur sehr gering und in cv. Annabell am deutlichsten, da signifikant, waren. Verglichen mit dem Ertrag der Kontrollpflanzen zeigten *Pi*-besiedelte Pflanzen eine Ertragssteigerung: bei cv. Annabell um + 5,3 % (\*\*\*) , cv. Maresi um + 0,8 % und cv. Ingrid um + 5,6 %. Die *Fg*-Varianten zeigten eine Reduktion des Ertrags, am deutlichsten in cv. Annabell (- 2,9 %) und am schwächsten in cv. Maresi (- 2,4%), cv. Ingrid lag mit -2,8 % dazwischen. Im Vergleich PF – P war durch das Pathogen *Fg* jeweils eine Reduktion des Ertrags zu beobachten (Annabell: - 2,34 %, Maresi: - 1,31 %, Ingrid: - 1,14 %). In den Kultivaren Annabell und Ingrid wurde der positive Effekt durch *Pi* also um ca. die Hälfte oder weniger verringert, in cv. Maresi war kein positiver Effekt mehr zu beobachten. Umgekehrt betrachtet kann man auch sagen, dass der negative Effekt von *Fg* durch gleichzeitige Anwesenheit von *Pi* in allen drei Kultivaren aufgehoben wurde, in cv. Annabell und cv. Ingrid war sogar immer noch ein positiver Effekt durch *Pi* festzustellen. Die durch *Fg* bedingten Ertragsminderungen gingen meistens auf ein geringeres Tausend-Korngewicht (TKG) und auf eine geringere Anzahl von Körnern pro Ähre zurück (Ausnahme: cv. Maresi PF-P). Die Anzahl der Ähren pro Gefäß war hingegen durch das Pathogen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen sogar erhöht. Die Ertragssteigerungen durch *Pi* waren in cv. Annabell auf ein erhöhtes TKG (cv. Annabell + Maresi) und eine erhöhte Anzahl Ähren pro Gefäß (cv. Annabell + Ingrid) bzw eine erhöhte Anzahl Körner pro Ähre (cv. Ingrid) zurückzuführen. Der Strohertrag war durch den Wurzelendophyten in allen Varianten immer leicht erhöht, allerdings nur im Kultivar Maresi signifikant. *Fg* alleine hatte keine Änderung bezüglich des

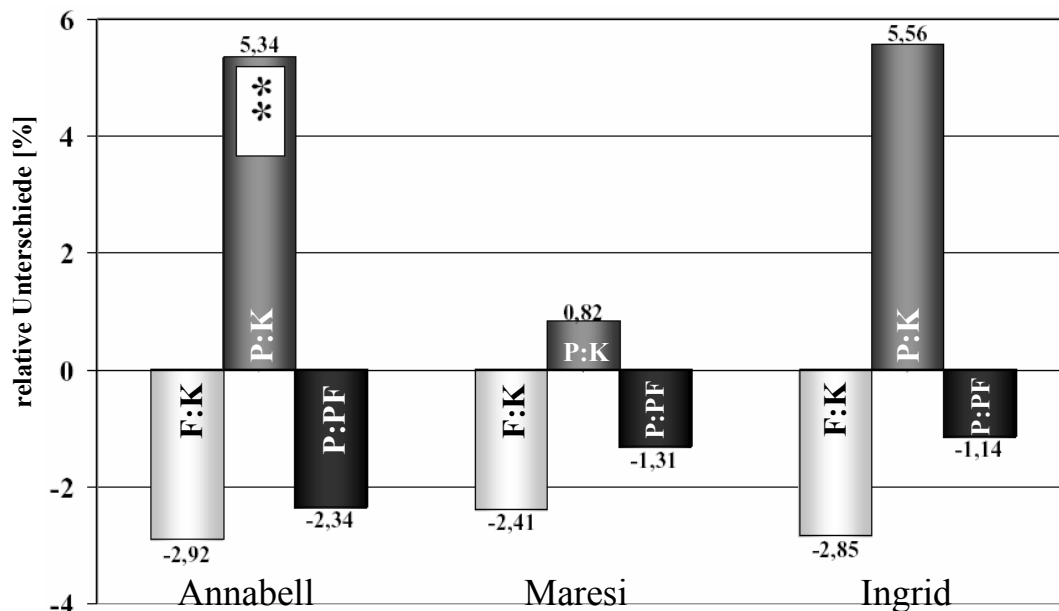


Strohertrags bewirkt, in Kombination mit *Pi* konnte in cv. Annabell und Maresi eine teilweise signifikante Erhöhung des Strohertrags beobachtet werden.



**Abb. 3.17: Kornertrag der Kultivare Annabell, Maresi und Ingrid in Abhängigkeit der Infektion mit *Pi* und/oder *Fg*.**

Dargestellt sind die Mittelwerte der Kornerträge pro Gefäß [g] aus allen sechs Wiederholungen (insgesamt 36 Pflanzen) in den drei Kultivaren und den verschiedenen Varianten (K: Kontrolle; P: *Pi*; F: *Fg*; PF: *Pi* + *Fg*). Signifikante Unterschiede im jeweiligen Vergleich zu den einzelnen Zeitpunkten sind durch \* angezeigt (ungepaarter Student's t-Test, \*=P<0,05, \*\*= P<0,01, \*\*\*= P<0,001).



**Abb. 3.18: Relative Unterschiede im Ertrag [%] der drei Kultivare durch Vergleich der verschiedenen Varianten.**

Dargestellt sind für jedes Kultivar die relativen Unterschiede [%] durch den Einfluss der beiden Pilze *Pi* und *Fg* (Vergleiche: P: K – *Pi*, F: K – *Fg*; PF-F: *Pi*+*Fg* – *Fg*; PF-P: *Pi*+*Fg* – *Pi*). Signifikante Unterschiede im jeweiligen Vergleich zu den einzelnen Zeitpunkten sind durch \* angezeigt (ungepaarter Student's t-Test, \*=P<0,05, \*\*= P<0,01, \*\*\*= P<0,001).

## 4 DISKUSSION

Die Getreidepathogene *Fusarium culmorum* (*Fc*) und *F. graminearum* (*Fg*) sind Generalisten, die alle Getreidearten und viele nicht zu den Gräsern gehörende Pflanzen befallen (GERLACH & NIERENBERG 1982). Sie verursachen partielle oder vollständige Taubährigkeit, Wurzel- und Halmbasisfäule und sorgen zusätzlich zu den damit verbundenen Ertragsverlusten für eine Kontamination des Getreides mit verschiedenen Mykotoxinen. Dies verursacht in den gemäßigten und sub-tropischen Breiten Ertragseinbußen von bis zu 30 % (MIEDANER *et al.* 2001). Bis heute besteht bezüglich der Antwort der Wirtspflanzen auf molekularer Ebene bei einer Infektion mit diesen Pathogenen Klärungsbedarf (BODDU *et al.* 2006).

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich daher damit, die Expressionsmuster verschiedener Gene nach einer *Fc*-Infektion der Kulturpflanzen Gerste und Weizen weiter aufzuklären. Hierzu wurde die Expression von über 1500 Gerstengenen in Blättern der beiden Gerstenkultivare Nickel (weniger *Fc*-anfällig) und Maresi (stark *Fc*-anfällig) mittels *macroarray*-Studien näher untersucht. Mittels semi-quantitativer *two-step* RT-PCR wurde anschließend die Expression ausgewählter Gene in unterschiedlichen Organen verschiedener Gersten- und Weizenkultivare analysiert. Die Beteiligung einiger Kandidatengene an der Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber *Fusarium* wurde abschließend im System Arabidopsis – *Fc* bzw. *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* (*Fom*) untersucht. Diese beiden Spezies wurden ausgewählt, da sie, obwohl beide der Gattung der Fusariumpilze angehören, völlig verschiedene Infektionsstrategien verfolgen. Bei *Fc* handelt es sich um ein Nekrose-induzierendes Pathogen, das in allen Geweben einer Wirtspflanze zu finden ist, während *Fom* sich in Leitgeweben ausbreitet und so Welke induziert. Somit konnten pflanzliche Komponenten identifiziert werden, die entweder eine oder beide Infektionsformen beeinflussten.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse, ob – und wenn ja – welcher der von den Phytohormonen Salizylsäure, Jasmonat und Ethylen abhängigen Signaltransduktionswege in Arabidopsis an einer Resistenzausprägung gegen Pathogene der Gattung *Fusarium* beteiligt ist. Dazu wurden verschiedene Mutanten, die in einem der Signalwege gestört waren, mit den Pathogenen *Fc* und *Fom* infiziert und die Anfälligkeit der Mutanten mit der von Wildtyp-Arabidopsispflanzen verglichen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss des Pathogens *Fg* sowie des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* (*Pi*) auf Wachstum, Chlorophyllgehalt, Entwicklung und Ertrag in Gerste bestimmt. Dazu wurden Gefäßversuche unter

Freilandbedingungen mit Gerstenpflanzen der Kultivare Ingrid, Maresi und Annabell durchgeführt, bei denen die Pflanzen entweder mit *Pi* oder *Fg* oder beiden Pilzen infiziert wurden.

#### 4.1 EXPRESSIONSSTUDIEN UND FUNKTIONELLE ANALYSEN

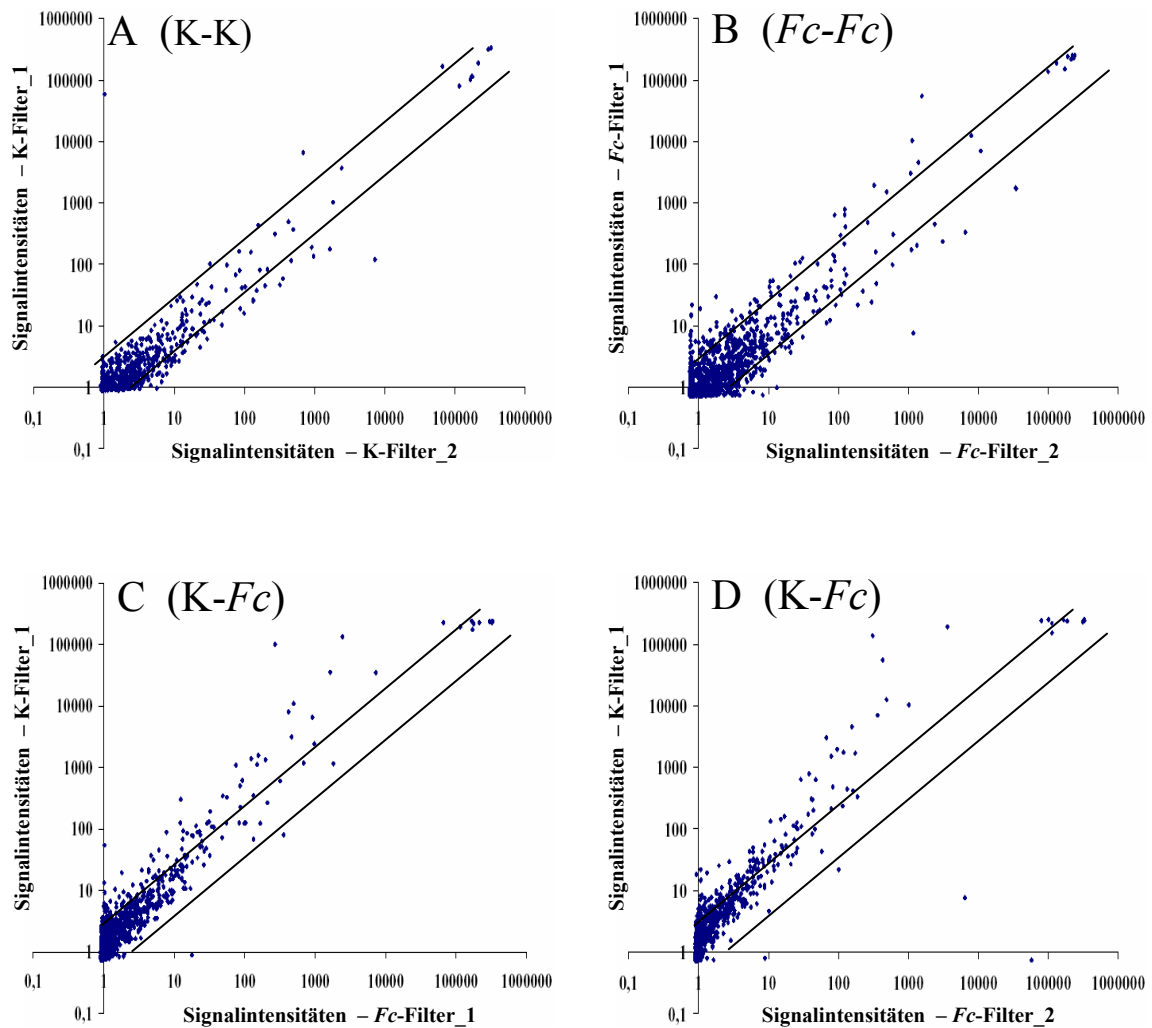
##### 4.1.1 *macroarray*-Analysen

Um auf veränderte Umweltsituationen (z.B. Pathogenbefall) reagieren zu können, gibt es in Pflanzen verschiedene regulatorische Mechanismen, die unter anderem zu einer veränderten Genexpression führen. Um die durch das Pathogen *Fc* verursachten Änderungen in der Genexpression der Gerste zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zunächst *macroarray*-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Filter, die mit 1536 verschiedenen cDNA-Klonen beladen waren, vergleichend mit cDNA-Sonden aus Blättern von gesunden (K-Filter) und *Fc*-infizierten (*Fc*-Filter) Gerstenpflanzen hybridisiert. Um mögliche Determinanten der Anfälligkeit bzw. Resistenz zu identifizieren, wurde Material vom stark *Fc*-anfälligen Kultivar Maresi mit dem vom weniger *Fc*-anfälligen Kultivar Nickel verglichen. Jedes der drei durchgeführten Experimente (2 biologische Wiederholungen mit cv. Nickel, 1 biologisches Experiment mit cv. Maresi) umfasste eine technische Wiederholung, d.h. es wurden zwei *macroarrays* mit derselben Sonde hybridisiert. Insgesamt waren 112 verschiedene Klone des *macroarrays* differentiell exprimiert: 37 davon nur im Kultivar Nickel (in mindestens einer von beiden biologischen Wiederholungen), 38 nur im Kultivar Maresi und 37 in beiden Kultivaren. Im Kultivar Nickel waren in beiden Experimenten 75 Klone differentiell exprimiert, 39 davon nur in einem der beiden Experimente, 36 in beiden (Einzelergebnisse s. Tab. 3.2). Von diesen 36 Klonen zeigten 9 Klone die gleiche differentielle Expression in beiden Experimenten, d.h. sie waren in beiden Versuchen entweder induziert oder reprimiert. Für die übrigen 27 Klone gab es Widersprüche in der Regulation entweder zwischen den biologischen oder den technischen Wiederholungen. Es war also nur für neun der 75 Klone (12 %) eine klare Aussage zu treffen: drei Gene waren induziert, sechs waren reprimiert. Beim Experiment mit dem Kultivar Maresi zeigten ebenfalls 75 Klone eine differentielle Expression, wovon zwei reprimiert und 69 induziert waren und 4 ein widersprüchliches Ergebnis zwischen den technischen Wiederholungen lieferten (s. Tab. 3.1).

Für die schwache Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der *macroarray*-Analysen kann es zwei Gründe geben: zum einen war die Stärke der Infektion bei den beiden biologischen Wiederholungen mit cv. Nickel vermutlich unterschiedlich hoch. Ein Hinweis darauf ist, dass die Expression von *PR-1* als Antwort auf die *Fc*-Infektion im ersten Versuch schwächer als

im zweiten war. Zum anderen zeigten auch die technischen Wiederholungen teilweise deutliche Unterschiede in den Expressionsmustern, was auf eine schwankende Qualität der Filter schließen lässt. Schon der Vergleich zweier gleichzeitig in einer Hybridisierungsröhre hybridisierten Filter lieferte teilweise über 100 differentiell exprimierte Gene. Zur Veranschaulichung sind in Abb. 4.1 exemplarisch die *scatter plots* von zwei Vergleichen zweier Filter, die mit derselben Sonde hybridisiert worden waren, also von zwei technischen Wiederholungen (A und B) sowie von zwei Vergleichen zwischen einem K-Filter und einem *Fc*-Filter (C und D), dargestellt. In den Diagrammen sind die normalisierten Signalintensitäten der beiden Filter gegeneinander aufgetragen. Ober- und unterhalb der in die Diagramme eingezeichneten Diagonalen liegende Punkte zeigen mehr als 2-fach induzierte bzw. reprimierte Klone an. Um wirklich aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können, sollten im Idealfall zwei gleiche Behandlungen im *Scatter Plot* kaum Streuung nach oben oder unten zeigen, sondern eher auf einer Geraden im Bereich zwischen den beiden eingezeichneten Linien liegen (SREENIVASULU *et al.* 2002). In Abb. 4.1 kann man deutlich erkennen, dass sich die Signale der technischen Wiederholungen (A und B) jeweils gleichmäßig um den Bereich der beiden Diagonalen verteilen, allerdings nicht so eng wie erwünscht. Vor allem im Vergleich *Fc-Fc* ist die Streuung recht groß. In den beiden dargestellten Vergleichen K-*Fc* (C und D) sind die Signale deutlich nach oberhalb verschoben, d.h. es gab eine Vielzahl vermeintlich *Fc*-induzierter Gene. Allerdings gab es deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden *scatter plots*, die zeigen, dass die Ergebnisse, die mit diesen Analysen erzielt wurden, zwar Hinweise, jedoch keinesfalls Sicherheiten bezüglich ihrer Aussage über die differentielle Expression geben konnten.

Da die Aussagekraft der *macroarray*-Analysen wesentlich geringer war als ursprünglich erwartet, wurden die Kandidatengene für die folgenden Expressions- bzw. Funktionsanalysen von diesen drei Experimenten vorrangig aufgrund interessanter Homologien ausgesucht.



**Abb. 4.1:** *Scatter plots* der Filteranalyse des Experiments mit Material von cv. Maresi.

Dargestellt sind die *scatter plots* für Vergleiche zweier Filter, die mit identischen Sonden aus gesundem (A) bzw. *Fc*-infiziertem Blattgewebe (B) hybridisiert wurden, sowie für zwei Vergleiche zwischen einem K- und einem *Fc*-Filter (C und D). Dabei sind die normalisierten Signalintensitäten der entsprechenden Filter gegeneinander aufgetragen.

#### 4.1.2 Weitergehende Expressionsanalysen und Funktionelle Analysen im Pathosystem

##### *Arabidopsis* – *Fusarium*

Für diese Expressions- bzw. Funktionsanalysen wurden zwölf Gene ausgewählt (s. Tab. 3.2), deren Expression zunächst in einem unabhängigen Inokulationsversuch mit Gerstenblättern überprüft wurde. Anschließend wurde die Expression dieser Gene ebenfalls in Gerstenähren sowie in Weizenblättern und –ähren nach *Fc*-Infektion untersucht. Zur funktionellen Analyse standen für drei dieser Gene (*vSNARE11*, *CLATHRIN*, *RELA*, s.u.) *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinien aus dem *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) zur Verfügung, die auf ihre Anfälligkeit gegenüber *Fc* und *Fom* untersucht wurden. In diesen T-DNA-Insertionslinien war jeweils das *Arabidopsis*-Homolog zu dem hier ursprünglich untersuchten

Gerstengen *ausgeknockt*. Für die übrigen neun Kandidatengene waren leider keine Insertionslinien erhältlich bzw. es konnten keine homologen Gene in Arabidopsis identifiziert werden, so dass hier eine funktionelle Analyse nicht möglich war. Die Arabidopsislinien wurden auf Festmedium unter sterilen Bedingungen angezogen und mit einer Sporenlösung des entsprechenden Pathogens besprüht. Untersucht wurde dabei auch, inwiefern die unterschiedlichen Infektionsstrategien der beiden Pilze *Fc* und *Fom* sich in den Änderungen der Anfälligkeiten in den Funktionsanalysen widerspiegeln.

#### 4.1.2.1 Gene, die laut *macroarray*-Analysen nur in cv. Nickel differentiell exprimiert waren

Vier der ausgewählten Gene (*auxin repressed protein* [*ARP*], *glycine-rich cell wall structural protein 1.0 precursor* [*GRP*], *Clathrin coat assembly protein* [*CLATHRIN*] und ein *RELA*-Homolog [*RELA*]) stammten von Klonen, die im *macroarray* nur in Blättern des resistenteren Kultivars Nickel nach Infektion mit *Fc* differentielle Signale gegeben hatten. ***GRP*** und ***ARP*** zeigten dabei eine *Fc*-bedingte Induktion. Diese Ergebnisse konnten mittels semi-quantitativer RT-PCR für *ARP* nicht und für *GRP* nur teilweise bestätigt werden. Die weitergehenden Analysen der Expressionsmuster dieser Gene in Gerstenähren und in Weizen (Blatt und Ähre) machten zudem deutlich, dass keine Korrelation zwischen der Expression dieser Gene und der Resistenzausprägung der Pflanzen gegenüber *Fc* bestand. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass diese Gene an der Resistenz in Gerste und Weizen gegenüber *Fc* beteiligt sind.

Die Gene *RELA* und *CLATHRIN* waren in chimären Klonen enthalten, d.h. zusätzlich zu diesen Genfragmenten waren noch 1-2 weitere in den entsprechenden Klonen vorhanden. Beide Klone zeigten ein schwächeres Signal auf den *Fc*-Filtern im Vergleich zu den K-Filtern. Die Expression von ***CLATHRIN*** war im unabhängigen Infektionsversuch nicht differentiell, so dass eine mögliche Beteiligung dieses Gens an der Suszeptibilität der Wirtspflanze gegenüber *Fusarium* fraglich ist. Möglicherweise wurde das differentielle Signal im *macroarray* vom zweiten in diesem Klon enthaltenen Genfragment, das Teil eines Chlorophyll a/b-Bindeprotein kodierenden Gens war, bestimmt. Die Annahme, dass *CLATHRIN* keine Rolle bei der Abwehr von Fusariumpilzen in Pflanzen spielt, wurde durch die funktionelle Analyse im System Arabidopsis – *Fusarium* bekräftigt, da *clathrin*-Mutanten von Arabidopsis keine veränderte Anfälligkeit gegenüber *Fc* oder *Fom* zeigten.

Als interessant erwies sich dagegen die nähere Untersuchung des ***RELA***. Bei *RELA* handelt es sich um eine Ribosomen-assoziierte Guanosin-3',5'-bispyrophosphat (ppGpp) Synthetase. Zusammen mit SPOT agiert es als Regulator physiologischer Anpassungen an eine Fülle von

Umweltbedingungen (BRAEKEN *et al.* 2006). Beschrieben wurde das RELA/SPOT-System erstmals in Bakterien als Teil der *stringent response*, welche durch eine rapide Herunterregulierung von stabiler RNA-Synthese bei Aminosäuremangel oder anderen Nährstoffmängeln charakterisiert ist (CASHEL *et al.* 1996). Ein Kennzeichen dieser *stringent response* ist die Akkumulation der Effektormoleküle (p)ppGpp und AMP, ausgehend von GTP/GDP und ATP. Dieser Prozess ist abhängig von der Bindung von RELA an Ribosomen und von der Anwesenheit ungeladener tRNAs an der Aminoacylstelle des Ribosoms sowie des ribosomalen Proteins L11. Die Bindung von RELA an das Ribosom und die damit verbundene (p)ppGpp-Synthese sind reversibel. Die Menge an RELA scheint durch Stress reguliert zu werden (BRAEKEN *et al.* 2006). In Hefe und *Escherichia coli*, die mit dem RELA/SPOT-Homolog des Halophyten *Suaeda japonica* transformiert worden waren, konnte eine erhöhte Toleranz gegenüber Salzstress beobachtet werden (YAMADA *et al.* 2003). Auch in Pflanzen wurden inzwischen RELA-Homologe identifiziert und es wird vermutet, dass (p)ppGpp hier als ein schnell aktivierter Transkriptionsfaktor agiert (VAN DER BIEZEN *et al.* 2000). Das direkte *target* des ppGpp ist die RNA-Polymerase, an die es in der Nähe des aktiven Zentrums bindet und mit deren  $\beta$  und  $\beta'$ -Untereinheiten es interagiert. Es scheint die Transkription auf diese Weise ohne regulatorische Partner-Proteine, die spezifisch an Sequenzen der DNA binden, zu beeinflussen und kann sowohl als negativer als auch positiver Regulator der Genexpression agieren (MAGNUSSON *et al.* 2005).

Im *macroarray* zeigte der Klon GBN001D10, der neben RELA noch Fragmente zweier weiterer Gene enthielt, in cv. Nikel ein leicht schwächeres Signal auf einem der *Fc*-Filtern im Vergleich zum entsprechenden K-Filter. In den semi-quantitativen *two-step* RT-PCRs allerdings war RELA sowohl in Gerstenblättern als auch in Blättern des *Fc*-anfälligen Weizenkultivars Nandu bei *Fc*-Infektion nicht differentiell exprimiert, im resistenteren Weizenkultivar Sumai3 war es in Blättern 24 Stunden nach *Fc*-Inokulation (hpi) induziert, 48 hpi reprimiert und 72 hpi nicht differentiell exprimiert. Laut TAKAHASHI *et al.* (2004) liegt das Maximum der wundinduzierten ppGpp-Akkumulation in Arabidopsis bei 60 Minuten nach Behandlung. Demnach könnte auch in Blättern von Gerste bzw. Weizen eine erhöhte RELA-Expression zu beobachten sein, wenn frühere Zeitpunkte untersucht würden. Ein Hinweis darauf findet sich auch in dem Versuch mit Weizenblättern, da das RELA hier in cv. Sumai3 zum frühesten Zeitpunkt (24 hpi) induziert war, 48 hpi jedoch nicht mehr.

In Ähren zeigte sich folgendes Bild: sowohl in Gersten- als auch in Weizenähren der untersuchten Kultivare war RELA nach *Fc*-Inokulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im jeweils resistenteren Kultivar deutlich induziert. In den anfälligen Kultivaren

war es nur in cv. Maresi (*H.v.*) 72 hpi induziert. Zumindest in Ähren korrelierte also eine erhöhte Expression von *RELA* mit höherer Resistenz gegenüber dem Getreidepathogen *Fc*. Die Expressionsanalyse führte somit zu der Vermutung, dass es sich bei *RELA* um einen Resistenzfaktor im System Gerste/Weizen – *Fc* handeln könnte. Verstärkt wurde diese Hypothese durch die Ergebnisse der funktionellen Analyse im System Arabidopsis – *Fc*. Der *knock-out* von *RELA* führte hier zu erhöhter Anfälligkeit gegenüber dem nekrotrophen Pathogen. Damit könnte auch die Resistenz von Getreide gegenüber *Fc* z.T. über *RELA* reguliert sein. Gegenüber *Fom* zeigte die Linie *relA* dagegen eine Tendenz in Richtung erhöhter Resistenz. Dies weist darauf hin, dass die Abwehr der beiden Pilze auf verschiedene Art und Weise verläuft, was auf die unterschiedlichen Infektionsstrategien zurückzuführen sein könnte (s. S.86, Kap. 413).

#### 4.1.2.2 Gene, die laut *macroarray* nur in cv. Maresi differentiell exprimiert waren

Die Expression der drei in der *macroarray*-Analyse nur im anfälligeren Kultivar Maresi als induziert beobachteten Gene konnte in zwei Fällen (*Vesicle transport* Protein v-SNARE 11 [*vSNARE11*]); *Dim1*-Homolog [*DIM1*]) bestätigt werden. Der *myb-related transcription factor* MYB59 (*MR-TF*) war in der semi-quantitativen *two-step* RT-PCR nicht differentiell exprimiert. Die weiteren Analysen der Expressionsmuster dieser drei Gene in Gerstenähren und in Blättern und Ähren in Weizen ergaben für *DIM1* und *MR-TF* keine Korrelation mit der Ausprägung von Resistenz bzw. Suszeptibilität gegenüber *Fc*. Funktionelle Analysen konnten mit diesen Genen nicht durchgeführt werden, da keine Arabidopsis -T-DNA-Insertionslinien zur Verfügung standen.

Ein interessantes Expressionsmuster ergab sich hingegen für *vSNARE11*: Es war sowohl im Array als auch in den RT-PCRs in Gerste sowohl in Blättern als auch in Ähren in den resistenteren Kultivaren weder mit noch ohne *Fc*-Infektion exprimiert. In Weizenblättern war seine Expression im resistenteren Sumai3 durch die *Fc*-Inokulation nicht beeinflusst und in der Ähre reprimiert. In den anfälligeren Kultivaren dagegen zeigte dieses Gen jeweils ähnliche Expressionsmuster: entweder eine deutliche Induktion (cv. Maresi, Blatt und Ähre; cv. Nandu, Blatt; cv. Remus, Ähre) bzw. eine schwache Induktion (cv. Pasadena [Ähre]) bei *Fc*-Infektion. Die Ergebnisse dieser Arbeit (keine differentielle Expression bzw. Repression in resistenteren Kultivaren und Induktion in anfälligeren Kultivaren) deuteten darauf hin, dass es sich bei *vSNARE11* in der Gerste/Weizen – *Fc* – Interaktion um einen Suszeptibilitätsfaktor handelt.



Vesikeltransport zwischen verschiedenen Membranen ist auf die Erkennung zwischen vSNARE-Proteinen auf Transportvesikeln und tSNARE-Proteinen auf Zielmembranen angewiesen (ZHENG *et al.* 1999). Allen SNARE-Proteinen gemein ist eine helikale Domäne. Bildet sich aus je vier SNARE-Proteinen der Vier-Helix-Komplex, der die Fusion des Transportvesikels mit der Zielmembran fördert, so lagern sich die SNARE-Proteine an diesen Domänen zusammen. Zusammengesetzt ist dieser Vier-Helix-Komplex (*trans*-SNARE Komplex) aus drei tSNARE-Proteinen und einem vSNARE-Protein. Nach der Vesikelfusion existiert das Vier-Helix-Bündel als *cis*-SNARE Komplex. Um den Komplex aufzulösen wird ein  $\alpha$ -SNAP (*soluble NSF attachment protein*) und die ATPase-Aktivität von NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) benötigt (SANDERFOOT *et al.* 2000, SURPIN & RAIKHEL 2004). Bei den vSNARE-Proteinen handelt es sich um lösliche NSF *attachment*-Protein Rezeptoren, die unter Eukaryoten sehr konserviert sind (SUTTER *et al.* 2006). Die Funktion der SNARE-Proteine umfasst nicht nur *house-keeping*-Prozesse. Sie sind darüber hinaus auch an Antworten der Pflanze auf Umweltbedingungen beteiligt wie z.B. Stomatabewegungen, gravitropische Mechanismen und Pathogenbefall (SUTTER *et al.* 2006). Einige der SNARE-Proteine tragen zu spezifischen Membranfusions-Ereignissen bei und sind essentiell für verschiedene Signaltransduktionswege (SURPIN & RAIKHEL 2004, SUTTER *et al.* 2006). Das homologe Protein des in dieser Arbeit untersuchten vSNARE11 der Hefe ist am *cis*-Golgi Membrantransport sowie an der Fusion von Golgi-Vesikeln mit dem prävakuolaren Kompartiment beteiligt (FISCHER *et al.* 1997). Das Arabidopsis-Homolog ist einerseits in endodermalem Gewebe an Stängel-Gravitropismus beteiligt (YANO *et al.* 2003), andererseits in anderen Geweben an der Morphogenese der Zellstruktur (MORITA *et al.* 2002). Bei einem anderen SNARE-Protein in Arabidopsis (*PEN1*, kodiert für ein tSNARE Syntaxin) führt der *knock-out* zu einer Erhöhung der Befallshäufigkeit mit *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *PEN1* ist hier also ein wichtiges Protein zur Ausbildung der Nicht-Wirts-Resistenz (COLLINS *et al.* 2003). NÜHSE *et al.* (2003) haben die Theorie aufgestellt, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Phosphorylierung von tSNARE-Proteinen die Exocytose von Proteinen und Komponenten, die der Abwehr dienen, stimuliert. Interessant ist, dass einzelne SNARE-Proteine verschiedene Funktionen haben können und sowohl als vSNARE fungieren können als auch als tSNARE (SANDERFOOT *et al.* 2000).

Da die Expression des *Hv\_vSNARE11* mit erhöhter Anfälligkeit korrelierte, werden durch das *vSNARE11*-Homolog in Gerste und Weizen möglicherweise Prozesse vermittelt, die für eine *Fusarium*-Infektion förderlich sind. Die ebenfalls hier durchgeführte funktionelle Analyse in Arabidopsis lieferte aber ein gegenteiliges Ergebnis. Getestet wurden *knock-out* Mutanten

zweier *vSNARE*-Gene aus Arabidopsis, *vSNARE11* und *vSNARE13*, in der Interaktion mit *Fc* und *Fom*. *v-snare11* zeigte eine Tendenz in Richtung erhöhter Anfälligkeit gegenüber *Fom*, *v-snare13* zeigte diese Tendenz gegenüber *Fc*. Zu erklären ist dieser Widerspruch vermutlich damit, dass die Aminosäuresequenz des *vSNARE11*-Homologs aus Gerste mit denjenigen in Arabidopsis nur zu 61 % (*vSNARE11*) bzw. 62 % (*vSNARE13*) übereinstimmt. Da ein einzelnes *vSNARE*-Proteine schon in ein und demselben Organismus verschiedene Funktionen haben kann (SANDERFOOT *et al.* 2000), ist es durchaus denkbar, dass mit *vSNARE11/13* nicht die Gene in Arabidopsis getroffen wurden, die die gleiche Funktion ausüben wie das *Hv\_vSNARE11* in Gerste.

#### 4.1.2.3 Gene, die laut *macroarray* in cv. Nickel und cv. Maresi differentiell exprimiert waren

Von den fünf ausgewählten Genen, die im Array sowohl im *Fc*-anfälligen Kultivar als auch im weniger *Fc*-anfälligen differentiell exprimiert waren, waren drei vor allem wegen ihrer gegensätzlichen Expression in den beiden Kultivaren interessant. Alle drei waren hier im *Fc*-anfälligen cv. Maresi induziert, im weniger *Fc*-anfälligen cv. Nickel reprimiert. Es handelte sich hierbei um das *Ankyrin-repeat protein* HBP1 [*ANKYRIN*]), das *senescence-associated protein* [*SAP*] und das 23 kDa *jasmonate-induced protein* [*JIP*]). In einem unabhängigen Versuch konnte die Induktion von *SAP* und *JIP* in cv. Maresi bestätigt werden, in cv. Nickel wurde keine differentielle Expression beobachtet, ebenso wie für das *ANKYRIN* in beiden Kultivaren. Da das *ANKYRIN* wiederum aus einem chimären Klon stammte (GBN001G02), kann man davon ausgehen, dass die differentielle Expression im *macroarray* auf das zweite Genfragment in diesem Klon, das für ein unbekanntes Protein kodierte, zurückzuführen war. Ausgehend von den Ergebnissen in Gerstenblättern könnte man für *SAP* und *JIP* annehmen, dass beide generell in anfälligen Kultivaren bei *Fc*-Infektion induziert sind, in weniger anfälligen dagegen reprimiert bzw. nicht differentiell exprimiert. Dies ließ sich in den weitergehenden Expressionsanalysen in Gerstenähren und in Weizen in Ähren und Blättern jedoch nicht bestätigen. Auch für das *ANKYRIN* wurde keine einheitliche Expression abhängig vom Grad der Anfälligkeit der Pflanzen beobachtet. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass *SAP*, *JIP* und *ANKYRIN* keine wichtige Funktion bei der Abwehr von *Fc* in Getreide haben. Eine Funktionsanalyse im Pathosystem Arabidopsis – *Fusarium* war für diese Gene leider nicht möglich, da keine entsprechenden T-DNA-Insertionslinien in den Arabidopsis Stock Centern erhältlich waren.

Der Calreticulin 3 *precursor* (*CRT3*) und die MAP Kinase (*MAPK2*) waren in den *macroarray*-Analysen in beiden Kultivaren induziert. In dem unabhängigen Blattversuch konnte dies weitgehend bestätigt werden, die *MAPK2* war hier allerdings nur 6 und 48 hpi

induziert, nicht aber 24 hpi. Verglichen mit den Expressionsmustern dieser Gene in Gerstenähren und im Weizen waren beide Gene mal im anfälligen Kultivar stärker exprimiert, mal im resistenteren. Es lässt sich also keine allgemeingültige Aussage bezüglich der möglichen Funktion der *MAPK2* in der Abwehr von *Fc* in den untersuchten Getreidearten treffen. Da auch hier keine T-DNA-Insertionslinien von Arabidopsis zur Verfügung standen, konnten für diese Gene keine funktionellen Analysen durchgeführt werden.

Neben den Genen aus der *macroarray*-Analyse wurde auch die Expression eines putativen *CYANASE*-Gens (Acc.No: AAG21913) in den verschiedenen Gersten- und Weizenkultivaren und -organen untersucht. Dieses Gen war in der *Bipolaris sorokiniana* – Weizen – Interaktion in Blättern des resistenteren Kultivars Yangmai 6 induziert (8, 40, 60 + 100 hpi), in dem hochanfälligen cv. Sonalika jedoch nicht differentiell exprimiert (JAIN 2004). Interessanter Weise konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die putative *CYANASE* auch in der Gerste/Weizen – *Fc* – Interaktion in den weniger anfälligen Kultivaren jeweils stärker und meist auch länger induziert war als in den anfälligen Kultivaren. Die einzige Ausnahme zeigte sich bei der *Fc*-Inokulation von Weizenblättern, wo die Induktion der *CYANASE* in beiden Kultivaren gleich war.

*CYANASEN* sind in vielen Bakterien, Pilzen und Pflanzen vorhanden und auf vielfältige Weise am Stickstoff-Stoffwechsel beteiligt. Das Enzym katalysiert u.a. die Umsetzung von Cyanat und Bicarbonat zu Carbamat, welches dann spontan zu Ammonium und CO<sub>2</sub> zerfällt (ANDERSON *et al.* 1994, EBBS 2004). Cyanat kann einen wichtigen Einfluss bei der Zelltodregulation ausüben: Untersuchungen mit Kanadischem Berufkraut (*Erigeron canadensis* L.) haben gezeigt, dass Cyanat eine Störung des antioxidativen Ascorbat/Glutathion-Zyklus bedingt, indem es eine irreversible Carbamylierung von Dehydroascorbat verursacht. Carbamyliertes Dehydroascorbat kann durch die Dehydroascorbat-Reduktase nicht mehr zu Ascorbat reduziert werden, was in einen Ascorbatmangel resultiert (KOSHIISHI *et al.* 1997). Ein Defizit an Ascorbat führt zu einem Anstieg der Menge reaktiver Sauerstoffintermediate und dies wiederum zu vermehrtem Zelltod. Daher ist die *CYANASE*-katalysierte Detoxifizierung von Cyanat ein wichtiger Schritt um die Versorgung der Zellen mit freiem Ascorbat sicher zu stellen und sie so vor oxidativem Stress und dadurch bedingten Zelltod zu schützen. Eine weitere Funktion der *CYANASE* ist die Detoxifikation von Cyanid. Cyanid ist ein starker cytotoxischer Wirkstoff, der insbesondere als Inhibitor von Metalloenzymen Schaden anrichtet. Als größte Quelle der Produktion von Cyanid in Pflanzenzellen wird die Biosynthese von Ethylen angesehen (ASKARI *et al.* 2006).

Die verstärkte Expression des putativen *CYANASE*-Gens in weniger anfälligen Getreidekultivaren lässt vermuten, dass die putative *CYANASE* tatsächlich an der Abwehr von *Fc* in Gerste und Weizen beteiligt ist. Dabei spielt vermutlich die Funktionen der Sicherung des Ascorbat-Vorrats, der den durch reaktive Sauerstoffintermediate bedingten Zelltod verhindert, eine Rolle, da dies zu einer Wachstumsinhibierung des nekrotrophen *Fc* führen kann.

#### 4.1.3 Abhängigkeit der Resistenz gegen *Fusarium* von Programmierem Zelltod

Da nur für drei der aus den *macroarray*-Analysen gewählten Kandidatengene homozygote *knock-out*-Linien für die jeweiligen *At*-Homologe verfügbar waren, wurden weiteren Kandidatengene für die funktionellen Analyse im Pathosystem *Arabidopsis-Fusarium* ausgewählt. Darunter waren zwei Zelltodinhibitorgene und ein Gen, das für ein an der Zelltodinduktion beteiligtes Enzym kodiert. Mit Hilfe der Mutanten dieser Gene sollte geklärt werden, ob sich verminderter Zelltod möglicherweise negativ auf das *Fusarium*-Wachstum auswirkt, die Pflanzen also durch unterdrückten Zelltod resistenter sein könnten. Bei den Zelltodinhibitoren handelte es sich um den sowohl in Pflanzen als auch in Tieren beschriebenen Zelltodinhibitor BAX-Inhibitor-1 (BI-1, EICHMANN *et al.* 2004) und den Caspaseinhibitor DAD2 (*Defender against Apoptotic Death*, DANON *et al.* 2004). Daneben wurde die Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase (2OG) untersucht, ein Protein, das sich in *Arabidopsis* *downstream* von  $H_2O_2$  in der Signalkette befindet, die zu programmiertem Zelltod führt (GECHEV *et al.* 2005). Weitere Gene stammten aus einer Affymetrix *microarray*-Analyse, bei der Material aus unbehandelten Gerstenähren (cv. Rika), mit Material aus Ähren, die mit *Fg* inokuliert worden waren, verglichen wurde. Alle aus diesem Versuch ausgewählten Kandidatengene zeigten eine deutliche Induktion 5 Tage nach *Fg*-Inokulation. Dabei handelte es sich um ein Germin-like Protein (*GLP7*), eine Peroxidase (*PPI*), ein Peroxiredoxin (*PER1*) und eine saure Endochitinase (*CHIB1*). *GLP7*, *PPI* und *PER1* wurden ausgewählt, weil sie ebenfalls am antioxidativen System beteiligt sind und somit einen Einfluss auf die Ausbildung von Programmierem Zelltod haben könnten. Pflanzliche Chitinasen sind evtl. an der Verdauung chitinhaltiger Pilzhyphen beteiligt und können so zu Resistenz beitragen. Das *PPI*-Homolog und das *CHIB1*-Homolog von *Arabidopsis* zeigten allerdings bei der funktionellen Analyse keine Beteiligung an der Abwehr von *Fc* oder *Fom*.

BAX Inhibitor-1-Proteine (**BI-1**) werden als Suppressoren von Programmierem Zelltod in Säugetieren und Pflanzen beschrieben. Es handelt sich hierbei um sehr konservierte Proteine, deren physiologische Bedeutung in Pflanzen noch nicht abschließend untersucht ist

(WATANABE & LAM 2006). In der Interaktion von Gerste mit dem biotrophen Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* erhöht die Überexpression des *Hv-BI-1* nicht nur die Penetrationsrate dieses Pilzes (HÜCKELHOVEN *et al.* 2003), sondern bricht zudem die *mlo*-vermittelte Penetrationsresistenz sowie die Nichtwirtresistenz gegenüber dem Echten Weizenmehltaupilz (EICHMANN *et al.* 2004). Dagegen konnten bei Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie dem Baculovirus Apoptoseinhibitorgen p35 in Tomate erhöhte Resistenzen gegenüber nekrotrophen Pathogenen gezeigt werden. Dies zeigte sich sowohl bei Infektion (Pathosysteme Tomate – *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici/Colletotrichum coccodes*) als auch nach der Behandlung mit deren Toxinen (*Alternaria alternata*) (LINCOLN *et al.* 2002). WATANABE & LAM (2006) machten die Beobachtung, dass nach Behandlung von Arabidopsis-Pflanzen mit dem *Fusarium*-Toxin Fumonisin B1 (FB1) die Expression des *AtBI-1* induziert ist. Außerdem haben sie festgestellt, dass der *knock-out* von BI-1 in Arabidopsis zu verstärktem Zelltod führt.

Auch in dieser Arbeit zeigten transgene Arabidopsis-Pflanzen, in denen das *BI-1*-Gen ausgeschaltet war (*bi-1*), eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber beiden getesteten *Fusarium*-Arten. Im Gegenzug wurde in entsprechend transgenen *BI-1*-überexprimierenden Pflanzen (*W2-1*) eine Tendenz zu erhöhter Resistenz gegenüber *Fc* beobachtet. Damit lässt sich sagen, dass die Überexpression von BI-1 eine erhöhte Resistenz gegenüber *Fc* bedingt, die Abwesenheit von BI-1 dagegen den Befall durch dieses nekrotrophe Pathogen fördert. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass generell die Suppression von Zelltod mit einer erhöhten Resistenz gegenüber *Fusarium* einhergeht.

Die Funktionsanalyse des Caspaseinhibitors **DAD2** (*Defender against Apoptotic Death*) im Rahmen dieser Arbeit unterstreicht diese Theorie, da auch durch den *knock-out* von *DAD2* in Arabidopsis eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Fc* zu beobachten war. Näher untersucht wurde bislang nur *DAD1*, ein Homolog zu *DAD2*, das ursprünglich in Hamsterzellen entdeckt wurde. Die Zelllinie mit entsprechender *dad1*-Mutation starb durch Apoptose ab (NAKASHIMA *et al.* 1993). In Arabidopsis-Blattprotoplasten wird Zelltod nicht nur durch *AtDAD1* und 2 unterdrückt, sondern auch durch den tierischen Caspaseinhibitor p53 (DANON *et al.* 2004). Bezüglich des Wirkmechanismus der DAD-Proteine wird noch spekuliert. In Säugetieren wurde entdeckt, dass *DAD1* im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und eine Untereinheit der Oligosacharyltransferase ist (KELLEHER & GILMORE 1997). DANON und Mitarbeiter (2004) fanden heraus, dass die Überexpression von *DAD1* Zelltod in Protoplasten unabhängig von Glycosylierung unterdrückt. In Hefe wurde beobachtet, dass die Hefemutante *ost2* (defekt in einer der neun Untereinheiten der Oligosacharyltransferase mit

Homologie zu DAD1) auch morphologische und biochemische Symptome von Apoptose aufweist (HAUPTMANN *et al.* 2006). Somit ist DAD1 möglicherweise ein bifunktionales Protein, das einerseits durch seine alleinige Anwesenheit und andererseits durch seine Beteiligung an der N-Glycosylierung Zelltod supprimiert. Eine ähnliche Funktion kann auch für DAD2 postuliert werden.

Die Annahme, dass Zelltodrepression zu verminderter Anfälligkeit gegenüber *Fusarium* führt, wurde ebenfalls durch das Ergebnis, das mit der *Knock-out*-Arabidopsis Mutante *2og* beobachtet wurde, bestärkt. Bei **2OG** handelt es sich um eine Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase, die an Zelltodreaktionen in Arabidopsis beteiligt ist. Beschrieben wurde sie von GECHEV und Mitarbeitern (2005), die sich mit der Frage beschäftigt haben, welche Gene *downstream* von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Zelltod-Netzwerk eine Rolle spielen. Bei den von ihnen durchgeführten *microarray*-Analysen wurde unter anderen Genen die *2OG* als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induziert gefunden, und in *2og Knock-out*-Mutanten von Arabidopsis wurde signifikant weniger Zelltod-Symptome nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induktion beobachtet. In dieser Arbeit zeigte die *2og*-Mutante eine erhöhte Resistenz gegenüber einer *Fc*-Infektion. Damit führte auch hier die Verminderung der Zelltodreaktion zu erhöhter Resistenz gegenüber diesem nekrotrophen Pathogen.

Auch die hier durchgeführten Untersuchungen mit der *glp7*-Mutante passen in dieses Bild. Bei **GLP7** handelt es sich um ein Germin-*like* Protein. Germine sind Oxalatoxidasen, und auch den GLPs werden Oxalatoxidase- bzw. Superoxiddismutase-Aktivitäten zugeschrieben. Diese Aktivitäten führen zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion, was wiederum zur Einleitung von Zelltodreaktionen führen kann (CARTER *et al.* 1998, ZIMMERMANN *et al.* 2006). Die *glp7*-Insertionslinie zeigte eine erhöhte Resistenz gegenüber *Fc* im Vergleich zum Col-0-Wildtyp. Auch hier war also eine gesteigerte Resistenz gegenüber *Fc* durch verminderte Zelltodreaktionen zu beobachten.

Die Peroxiredoxin-*Knock-out*-Mutante (*per1*) von Arabidopsis zeigte eine höhere Anfälligkeit gegenüber *Fc* und *Fom* im Vergleich zum Wildtyp. Damit kann **PER1** als eine Komponente in der Abwehr der beiden Pathogene postuliert werden. In Pflanzen gibt es vier verschiedene Unterfamilien von Peroxiredoxinen (Prx): 1-Cys Prx, 2-Cys Prx, Type II Prx und Prx Q. Alle Peroxiredoxine wirken über ihren N-terminalen Cystidinrest (Cys), der mit Peroxiden reagiert und diese reduziert. 1-Cys Prx tragen nur ein katalytisches Cys, alle anderen Peroxiredoxine tragen zwei (DIETZ *et al.* 2006). Peroxiredoxine sind in Pflanzen an der Detoxifikation von Peroxiden in der Photosynthese beteiligt. Sie haben DNA-protektive Funktion und wurden in der Abwehr von Pathogenen beschrieben, wo sie antifungale Wirkung zeigen (ROUHIER *et al.*

2004, KIBA *et al.* 2005). All diese Funktionen wurden aber bislang nur für die 2-Cys Prx, Type II Prx und Prx Q beschrieben. Die 1-Cys-Prx von Pflanzen, zu denen auch das hier untersuchte PER1 gehört, sind bisher nur als in der Aleuronschicht und dem Embryo der Samen exprimiert beschrieben (AALEN 1999, DIETZ 2003). Dort wirken sie einerseits antioxidativ, andererseits sind sie evtl. daran beteiligt, den richtigen Zeitpunkt zur Keimung in den Samen wahrzunehmen (HASLEKÅS *et al.* 2003).

Da eine erhöhte Anfälligkeit der *perl*-Mutanten im Vergleich zu nicht transgenen Arabidopsispflanzen deutlich war, kann davon ausgegangen werden, dass das 1-Cys-Prx PER1 nicht nur, wie bisher angenommen, in Samen exprimiert wird, sondern auch in vegetativen Geweben. Weiterhin kann ihm eine Funktion in der Abwehr der Pathogene *Fc* und *Fom* zugeschrieben werden. Man kann spekulieren dass PER1 in Arabidopsis am Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beteiligt ist und damit zu einer Verminderung des Zelltods zur Abwehr von *Fusarium* beiträgt. Dies würde die erhöhte Anfälligkeit der *perl*-Mutanten gegen *Fc* und *Fom* erklären. Gestützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen mit humaner 1-Cys-Prx, die gezeigt haben, dass dieses Enzym in *E. coli* die intrazelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration bei Anwesenheit eines Elektronendonators deutlich reduzieren kann (KANG *et al.* 2005).

**VTC1** kodiert für eine GDP-Mannose Pyrophosphorylase/Mannose-1-pyrophosphatase. Dieses Enzym wird unter anderem für die Biosynthese von Ascorbat (Vitamin C) benötigt. Wie bereits bei der Diskussion des *CYANASE*-Gens (s. S. 81) beschrieben, ist Ascorbat eine wesentliche Komponente in Redox-Signalling-Ereignissen. Neben Glutathion stellt es einen der wichtigsten Redoxpuffer der pflanzlichen Zellen dar (FOYER & NOCTOR 2005, PAVET *et al.* 2005). Als ein Antioxidant agiert Ascorbat direkt als Radikalfänger von reaktiven Sauerstoffintermediaten oder indirekt als Substrat für die hochspezifische Ascorbatperoxidase (APX) bei der Detoxifikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (WOLUCKA *et al.* 2005). Ein Defizit an Ascorbat führt zu vermehrten Zelltodreaktionen, und macht Arabidopsis Pflanzen resistenter gegenüber dem pathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* (PAVET *et al.* 2005). Wie die funktionelle Analyse im hier durchgeführten Screening ergeben hat, zeigten *vtc1-1*-Mutanten eine Tendenz in Richtung erhöhter Anfälligkeit gegenüber *Fc* und *Fom* im Vergleich zu Col-0. Dieses Ergebnis weist wiederum darauf hin, dass eine Erhöhung der Zelltodrate in Arabidopsis (hier ausgelöst durch einen Ascorbatmangel aufgrund der *vtc1*-Mutation) das Wachstum des nekrotrophen Pathogens *Fc* und auch gegenüber *Fom* fördert.

Fasst man die Ergebnisse der funktionellen Analyse mit den Zelltod-fördernden bzw. supprimierenden Mutanten in Arabidopsis zusammen, so wird bestätigt, dass der programmierte Zelltod, der von Pflanzen oft zur Abwehr von Pathogenen eingesetzt wird, die

Infektion durch das nekrotrophe Pathogen *Fc* begünstigt. Eine Erhöhung der Resistenz in Pflanzen kann also dadurch erzielt werden, dass man eben diese Form der Abwehr unterdrückt. Da dies jedoch wahrscheinlich negative Effekte auf die Abwehr biotropher Pathogene hätte, kann ein optimaler Eingriff in die Regulation der pflanzlichen Abwehr zur Verbesserung der *Fusarium*-Resistenz nur darin bestehen, dass die Repression des Zelltods lokal begrenzt wird, also z.B. nur auf die Ähre beschränkt ist. Dies könnte man durch die Wahl geeigneter Promotoren zur Kontrolle der Expression von Zelltodinhibitoren erreichen. Bezüglich der Abwehr von *Fom* zeigen die Ergebnisse teilweise eine andere Situation. Zwar war auch hier bei drei von vier Mutanten, in denen ein Zelltodinhibierendes Protein ausgeknockt war, eine erhöhte Anfälligkeit bzw. Tendenz in diese Richtung zu beobachten. Die Suppression des Zelltods durch Überexpression von *BI-1* bzw. *knock-out* von *GLP7* oder *2OG* führte jedoch nicht wie bei *Fc* zu erhöhter Resistenz. Dies könnte durch die unterschiedlichen Infektionsstrategien der beiden Pilze begründet sein. *Fc* infiziert das pflanzliche Gewebe direkt von außen ohne ein bestimmtes Gewebe besonders zu bevorzugen. Die Ausbreitung erfolgt in allen Gewebearten des Wirtes durch aktives Abtöten der Zellen durch Ausschüttung pilzlicher Toxine. Damit haben sowohl die Inhibierung als auch die Förderung des Zelltods einen Einfluss auf die Pathogenese von *Fc*. *Fom* dagegen dringt über die Wurzeln in das Vaskulargewebe der Pflanzen ein. Die Welke tritt dabei durch die Blockade des Xylems und die damit verbundene mangelnde Wasserversorgung der Pflanze bzw. durch die vom Pilz produzierten Toxine ein. Die Infektion wird außerdem durch das schrittweise Absterben des Xylemparenchyms begleitet (DE CAL *et al.* 1999). Wird der Zelltod nicht unterdrückt, wie in den Mutanten *bi-1*, *vtc1* und *per1*, wird diese Begleiterscheinung begünstigt, der *knock-out* entsprechender Zelltodinhibitoren macht die Pflanzen also anfälliger. Wird der Zelltod hingegen unterdrückt (*W2*, *2og*, *glp7*), schützt dies die Pflanze zwar möglicherweise eine zeitlang vor dem Absterben des Parenchyms, die Blockade des Xylems und die daraus resultierende Unterbindung der Wasserzufuhr und Welke finden aber weiterhin statt. Durch das reichlich vorhandene Inokulum und den dadurch bedingten hohen Befallsdruck auf die Pflanzen konnte daher vermutlich kein Unterschied zwischen Wildtyp-Pflanzen und denjenigen Mutanten, in denen der Zelltod unterdrückt wurde, bei Infektionsversuchen mit *Fom* festgestellt werden.

#### 4.2 BETEILIGUNG BEKANNTER SIGNALWEGE AN DER ABWEHR VON *FC* UND *FOM*

Zu Beginn dieser Arbeit war nichts über eine mögliche Beteiligung bekannter Phytohormon-abhängigen systemischen Signaltransduktionswege an der Abwehr von *Fusarium* bekannt. Im



Allgemein sagt man, dass eine effektive Abwehr gegen biotrophe Pathogene durch den Salizylsäure (SA)-abhängigen Signalweg reguliert wird, die Abwehr nekrotropher Pathogene dagegen durch den Jasmonat (JA)- bzw. Ethylen (ET)-abhängigen. Begründet wird dies mit der Theorie, dass die Abwehr biotropher Pathogene hauptsächlich auf SA-induzierten programmierten Zelltod zurückzuführen ist. Bei nekrotrophen Pathogenen, die vom Zelltod des Wirtes profitieren, werden daher eher JA/ET-abhängige Abwehrstrategien aktiviert (GLAZEBROOK 2005). Da diese Theorie bisher nur durch Untersuchungen mit einigen wenigen Pathogenen und in dikotylen Systemen belegt wurde, kann sie nicht von vornherein auf jedes Pathogen bzw. jede Pflanze übertragen werden. Grundsätzlich fehlt für monokotyle Pflanzen z.Z. noch eine genauere Charakterisierung der systemischen Abwehr von Pathogenen. Es ist bisher nur bekannt, dass es systemisch induzierte Resistenz in Getreide gibt (KOGEL *et al.* 1994, GÖRLACH *et al.* 1996, SCHWEIZER *et al.* 1997), und dass einige der aus Dikotylen bekannten *downstream*-Komponenten, wie z.B. *NPR1*, auch in Getreide konserviert sind und dieselben Funktionen haben (KOGEL & LANGEN 2005). Da für Getreide kaum Mutanten bzw. Transgene vorhanden sind, mit denen man eine Beteiligung der Signalwege systematisch untersuchen könnte, wurde für das hier durchgeführte *screening* auf Arabidopsis-Mutanten zurückgegriffen, die anfällig gegenüber dem Getreidepathogen *Fc* sind (s. Kap. 3.4.1). Vergleichend wurde auch hier das Arabidopsis-Pathogen *Fom* untersucht. Da das System Arabidopsis – *Fusarium* nicht direkt auf das System Getreide – *Fusarium* übertragbar ist, diente dieses *screening* dazu, Hinweise auf die Art der Resistenzantwort der Pflanzen auf eine Infektion durch das Getreidepathogen *Fc* zu bekommen.

In einer Studie von 2004 wurde bereits die Anfälligkeit verschiedener Arabidopsis-Signalwegmutanten (SA: *NahG*, *eds1-1*, *eds5-1*, *pad4-1*, *pad2-1*, *npr2-1*, *npr1-1*, *coi1-1*, *sid2*; JA: *jar1-1*, ET: *ERF1*, *ein2-5*) gegenüber einer Infektion mit *F. o. f.sp. conglutinans* (*Foc*) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass *ein2-5*, *jar1-1*, *npr1-1* und *NahG* eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Foc* aufweisen. Die Überexpression des Transkriptionsfaktors *ERF1* (*ethylen response factor 1*) führte hingegen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Foc* im Vergleich zu Col-0 Kontrolle. Daraus schlossen die Autoren, dass im Falle der Abwehr von *Fo* in Arabidopsis die drei SA-, JA- und ET-abhängigen Signalwege synergistisch wirken und für die Resistenzausprägung notwendig sind (BERROCAL-LOBO & MOLINA 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neun Arabidopsis-Mutanten des SA-Signaltransduktionsweges, acht Mutanten des JA-Signaltransduktionsweges und drei Mutanten des ET-Signaltransduktionsweges untersucht (s. Tab. 2.1).

Bei **NPR1** handelt es sich um ein *ankyrin repeat*-Protein, das in Arabidopsis bei niedrigem SA-Level in oligomerer Form im Zytoplasma vorliegt. Steigt die SA-Konzentration an, dissoziieren die Oligomere zu Monomeren. Diese Monomere wandern in den Nukleus, wo sie mit TGA-Transkriptionsfaktoren interagieren und *PR*-Genexpression auslösen (GLAZEBROOK 2005). Es ist schon länger bekannt, dass NPR1 nicht nur im SA-Signaltransduktionsweg eine Schlüsselrolle einnimmt, sondern auch im SA-unabhängigen Signalweg der ISR ein wichtiges Element darstellt (PIETERSE & VAN LOON 1999).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Arabidopsis-Infektionsversuchen war *npr1-3* anfälliger gegenüber *Fc* und *Fom*; *npr1-2* zeigte dagegen keinen Unterschied in der Suszeptibilität gegenüber beiden Pathogenen. Dies war zunächst unerwartet. Eine Erklärung für diesen Befund erhält man jedoch, wenn man den Unterschied zwischen den beiden Mutanten betrachtet. In *npr1-2* weist das *NPR1*-Gen einen Aminosäureaustausch an der 150. Aminosäure von Cystein zu Tyrosin auf (CAO *et al.* 1997). Dies führt vermutlich zu Änderungen der inter- oder auch intramolekularen Proteinstruktur durch veränderte Disulfidbrückenbindungen (SOMSSICH 2003). Der Effekt dieser Mutation ist jedoch unvollständig, da immer noch eine Rest-Induzierbarkeit der *PR1*-Expression in *npr1-2* beobachtet werden kann (CAO *et al.* 1997). Auf die Funktion des Proteins in der Abwehrantwort der Pflanze gegen die Pathogene *Fc* und *Fom* hat diese Mutation offenbar keinen Einfluss.

Die Mutation in *npr1-3* dagegen bewirkt die Synthese eines verkürzten NPR1-Proteins durch Einbau eines frühzeitigen Stopp-Codons. Der C-Terminus des *npr1-3*-Proteins ist daher um 194 Aminosäuren kürzer als der des Wildtyp-Proteins. Diese 194 Aminosäuren des NPR1 enthalten u.a. das Signal zur Kernlokalisierung und der dadurch bedingten Aktivierung der *PR*-Genexpression (*nuclear-localization signal*, NLS, KINKEMA *et al.* 2000, DONG 2004). Dass *npr1-3* anfälliger gegenüber *Fc* und *Fom* war, deutet darauf hin, dass für die *Fusarium*-Abwehr die Funktion des NPR1 im Zellkern essentiell ist.

Für **PAD2** und **PAD4** (PAD: *phytoalexin deficient*, PAD2: 20S Proteasom Untereinheit, PAD4: Lipase-ähnliches Protein) wurde bereits beschrieben, dass sie nicht nur für die Akkumulation von SA verantwortlich sind, sondern auch weitere Abwehrantworten aktivieren (ZHOU *et al.* 1998, GLAZEBROOK *et al.* 2003, KISHIMOTO *et al.* 2006). GLAZEBROOK *et al.* (2003) fanden heraus, dass die Abwehr von *P. syringae* in Arabidopsis PAD4 benötigt, nicht jedoch die für die SA-Biosynthese essentiellen Proteine SID2 und EDS5.

Auch in der Arabidopsis–*Fusarium*–Interaktion zeigte sich, dass EDS5 keinen Einfluss auf die Resistenz/Anfälligkeit gegenüber diesem Pathogen hat, die *pad2*- und *pad4*-Mutanten dagegen deutlich bzw. tendenziell anfälliger waren als Wildtyp-Pflanzen.

Auch scheint **PAD5** eine Rolle in der Abwehr von *Fc* und *Fom* in Arabidopsis zu spielen, da die Mutation des *PAD5*-Gens die Anfälligkeit von Arabidopsis gegenüber *Fc* und *Fom* leicht erhöhte. Über PAD5 ist allerdings relativ wenig bekannt, weshalb noch nicht sicher ist, an welcher Stelle genau es in die Modelle der Signalwege einzufügen ist oder ob es überhaupt an einer Signalübertragung beteiligt ist (VAN WEES *et al.* 2003).

**EDS4** (EDS: *enhanced disease susceptibility*) spielt laut Literatur sowohl im SA- (GUPTA *et al.* 2000, GLAZEBROOK *et al.* 2003) als auch im ET-Signalweg (ISR, TON *et al.* 2002, BOHMAN *et al.* 2004) eine Rolle. Interessant ist dabei, dass es in den oben zitierten Untersuchungen niemals gleichzeitig für beide Wege relevant war, sondern jeweils entweder für den einen oder den anderen. Da die Wachstumsbedingungen der *eds4*-Mutanten bei GUTPA *et al.* (2000) anders waren als bei TON *et al.* (2002), kamen letztere zu dem Schluss, dass EDS4 möglicherweise anhängig von Wachstumsbedingungen entweder den SA- oder den ET-Signalweg beeinflusst. Da *eds4* in den hier durchgeführten Untersuchungen eine Tendenz in Richtung erhöhter Resistenz gegenüber *Fc* und *Fom* zeigte, ist auch dieses Protein höchstwahrscheinlich auch an der Abwehr von Pathogenen wie *Fusarium* beteiligt.

Die Arabidopsis *coil*-Mutante (COI: *coronatine insensitive*) ist vollständig insensitiv gegenüber JA, und das **COII**-Protein wird für alle bis dato bekannten JA-abhängigen Stress-Antworten benötigt (COEGO *et al.* 2005). Es codiert für ein LRR-F-Box-Protein, dessen Funktion möglicherweise darin besteht, Regulatoren der Abwehr der Modifikation durch Ubiquitination zuzuführen (XIE *et al.* 1998). *coil* ist in der Literatur als stark anfällig gegenüber den nekrotrophen Pathogenen *Plectosphaerella cucumerina* und *Botrytis cinerea* beschrieben (LORENZO *et al.* 2004).

Auch in dieser Arbeit war in den Experimenten mit der *coil*-Mutante eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Fc* zu beobachten. Dieser Effekt war allerdings nicht sehr deutlich, was möglicherweise durch das in dieser Arbeit verwendete Testsystem zu erklären ist, da hier keine Einzelpflanzen untersucht wurden und die Testpflanzen nicht auf Homo- bzw. Heterozygotie getestet werden konnten. Homozygote *coil*-Pflanzen sind männlich steril. Zur Samenproduktion wurden also heterozygote *COII/coil*-Pflanzen vermehrt, die 1:2:1 (*COII:COII/coil:coil*) spalten. Es waren daher nur ¼ der hier im *Screening* verwendeten Pflanzen homozygot und demnach vollständig JA-insensitiv.

Die Mutanten zweier *downstream*-Komponenten von COI1, *jar1* und *jin1*, waren ebenfalls anfälliger gegenüber *Fc*. *jin1* zeigte ebenfalls eine Tendenz in Richtung erhöhter Suszeptibilität gegenüber *Fom*. **JIN1** kodiert einen Helix-loop-Helix Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor. In der Literatur finden sich verschiedene Untersuchungen mit *jin1*, die eine Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene belegen. So beschreiben ANDERSON *et al.* 2004 und COEGO *et al.* (2005) JIN1 als einen Repressor der Resistenz gegenüber *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* und *Plectosphaerella cucumerina* bzw. als positiven Regulator der Expression von wundinduzierten Genen. In anderen Untersuchungen war *jin1* ebenfalls resistenter gegenüber dem Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (NICKSTADT *et al.* 2004, LAURIE-BERRY *et al.* 2006). LAURIE-BERRY *et al.* (2006) haben in *jin1*-Mutanten eine verminderte Induktion JA-responsiver Gene nach einer *P. syringae*-Infektion beobachtet. Weiterhin konnten sie, ebenso wie NICKSTADT und Mitarbeiter (2004), in Korrelation zu reduzierter Suszeptibilität gegenüber diesem Pathogen in *jin1*-Pflanzen eine erhöhte SA-Akkumulation sowie erhöhte Expression SA-abhängiger Gene feststellen. Da der SA-Signaltransduktionsweg u.a. zelltodfördernd ist, könnte dies die erhöhte Anfälligkeit von *jin1* gegenüber *Fc* in der hier vorliegenden Arbeit erklären.

**JAR1**, eine Jasmonat-Adenylase (STASWICK *et al.* 2002), wird laut Literatur für die Resistenz von Arabidopsis gegen *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* und *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* bzw. f.sp. *lycopersici* und *Pythium irregulare* benötigt. Gekennzeichnet ist die *jar1*-Mutante durch eine reduzierte JA-abhängige Genexpression (STASWICK *et al.* 1998, BERROCAL-LOBO & MOLINA 2004). Dass *jar1* auch in dieser Arbeit suszeptibler gegenüber *Fc* war belegt erneut die Bedeutung des JA-Signalwegs bei der Abwehr dieses Pathogens.

Bei **FAD7** und **FAD8** (FAD: *fatty acid desaturase*) handelt es sich um plastidäre Enzyme, die die Strukturänderung von zweifach- zu dreifach- ungesättigten Fettsäuren katalysieren. Das führt zu einer durch Erhöhung der Fluidität der Membranen zu erhöhter Toleranz gegenüber Kältestress (KODAMA *et al.* 1994), zum anderen dient die dreifach ungesättigte Linolensäure als Substrat für die Biosynthese von Jasmonat, das zur Expression JA-induzierter Genexpression führt (WASTERACK & PARTIER 1997, SONG *et al.* 2004). In dieser Arbeit zeigten sowohl *fad7* als auch *fad8* eine Tendenz in Richtung erhöhter Anfälligkeit gegenüber beiden getesteten Fusariumspezies, wodurch die Notwendigkeit der JA-Synthese zur Abwehr einer *Fusarium*-Infektion in Arabidopsis gezeigt wurde.

**AIM1** (AIM: *abnormal inflorescence meristem*) besitzt eine hohe Homologie zu einem Protein mit Acyl-CoA Hydratase-Aktivität, das vermutlich in die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren

involviert ist (BERGER 2002). Der Verlust von AIM1 verändert die Fettsäure-Zusammenstellung von ausgewachsenen Arabidopsispflanzen und führt zu reduzierter Fertilität. Zudem weist die *aim1*-Arabidopsis-Mutante einen Phänotyp mit veränderter Meristenausbildung des Blütenstands auf (RICHMOND & BLEECKER 1999). Der Defekt in der  $\beta$ -Oxidation verhindert im Oktadekanoid Stoffwechsel die Biosynthese von Methyljasmonat, da der Schritt von der 3-*oxo*-2(2'-pentenyl)-cyclopentan-1-Oktansäure zu (+)-7-iso-JA (Jasmonat) unterbrochen ist (DEVOTO & TURNER 2005). Eine veränderte Anfälligkeit/Resistenz der *aim1*-Mutante gegenüber Pathogenen wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit zeigte die *aim1* eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Fc*, was vermutlich ebenso wie bei *fad7* und *fad8* auf eine verminderte Synthese von JA zurückzuführen ist.

Die Mutante *cevl* (CEV: *constitutive expression of vegetative storage protein*) ist durch eine konstitutive Expression verschiedener JA- und ET-responsiver Gene gekennzeichnet (PILLING & HÖFTE 2003). **CEV1** codiert eine Cellulosesynthase und ist an der Synthese der Primärzellwand beteiligt. Durch reduzierte Cellulose-Level in der Pflanze werden einerseits die Ligninsynthese aktiviert, andererseits Abwehrantworten der Pflanze durch JA-, ET- und andere Signalwege in die Wege geleitet (CAÑO-DELGADO *et al.* 2003). Die Mutante *cevl* produziert nicht nur JA konstitutiv sondern auch ET. Die dadurch bedingte konstitutive Expression JA- und ET-responsiver Gene führt zu erhöhter Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen (ELLIS *et al.* 2002).

Dass *cevl* in dieser Arbeit nicht resistenter sondern anfälliger gegenüber *Fc* war, war zunächst unerwartet. Allerdings wurde auch schon eine erhöhte Resistenz von *cevl* gegenüber *Erysiphe* spp., also biotrophen Pathogenen beschrieben (ELLIS & TURNER 2001). Diese Befunde weisen darauf hin, dass CEV1 nicht nur an der Regulation des JA- und ET-Signalwegs beteiligt ist, da sonst keine Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen in *cevl* zu erwarten wäre. Diese unbekannte Funktion des CEV1 könnte auch bei der Abwehr von *Fc* von Bedeutung sein und daher die erhöhte Suszeptibilität von *cevl* gegenüber diesem Pathogen erklären.

Von den im ET-Signalweg gestörten Mutanten zeigten *eto3* (ET-Überexpression) und *etr1-1* (ET-insensitiv, defekter ET-Rezeptor) keine Unterschiede in der Resistenz gegenüber *Fc* und *Fom* im Vergleich zu nicht transgenen Pflanzen. *ein2-1* (ET-insensitiv, defekt in Membran-gebundenem Metallionen-Transporter) dagegen war resistenter als Col-0.

Auch in einer früheren Studie von HIRSCH und Mitarbeitern (2002) führte die Untersuchung von ET-Mutanten im Arabidopsis-*Rastonia solanacearum* Pathosystem zu keinem klaren

Bild. Es wurde hier sowohl für die ET-*knock-out*-Mutante *ein2-1* als auch für die ET-überexprimierende Mutante *eto3* eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Welke-induzierenden Bakterium festgestellt, während eine weitere ET-insensitive Mutante (*etr1-3*) keinerlei Effekt zeigte. Möglicherweise besitzt daher EIN2 eine weitere Funktion, unabhängig vom ET-Signalweg, die diese widersprüchlichen Befunde erklärt. Das würde bedeuten, dass im Fall der Resistenz von Arabidopsis gegen *Fusarium* der ET-Signalweg möglicherweise nicht involviert ist und hier nur die bislang unbekannte Funktion des EIN2 eine Rolle spielt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich aber durch Befunde von TUOMINEN und Mitarbeitern (2004) auch auf eine andere Weise interpretieren. Diese Arbeitsgruppe hat, ebenso wie OVERMYER *et al.* (2000), die Beteiligung vom JA- und ET-Signalweg an Ozon-induziertem Zelltod in Arabidopsis untersucht. Beide Studien führten zu der Erkenntnis, dass JA-abhängige Prozesse über JAR1 die Pflanzen vor oxidativem Zelltod schützen, während ET diesen Zelltod begünstigt. Darüber hinaus zeigten entsprechende Expressionsstudien, dass die ET-vermittelte Genexpression durch JA unterdrückt wird, und umgekehrt, dass ET (unter Beteiligung von EIN2) die Expression von JA-induzierten Genen unterdrückt. Dabei stellt sich die Suppression des ET-Signalwegs durch JA als deutlich stärker heraus als die des JA-Wegs durch ET.

Eine Übertragung der Erkenntnisse zum O<sub>3</sub>-induzierten Zelltod in Arabidopsis auf die Arabidopsis – *Fusarium* – Interaktion würde nun zu folgender Interpretation führen: Wie hinreichend in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, besitzt der JA-Signalweg eine ganz entscheidende Bedeutung für die Abwehr von Fusariumpilzen in Arabidopsis. Dies ist möglicherweise z.T. darauf zurückzuführen, dass hier, analog zu TUOMINEN *et al.* (2004) und OVERMYER *et al.* (2000), eine starke Blockade durch JA auf den ET-Signalweg erfolgt, die eine möglicherweise Zelltod-fördernde Wirkung des ET bei Fusariumbefall unterdrückt.

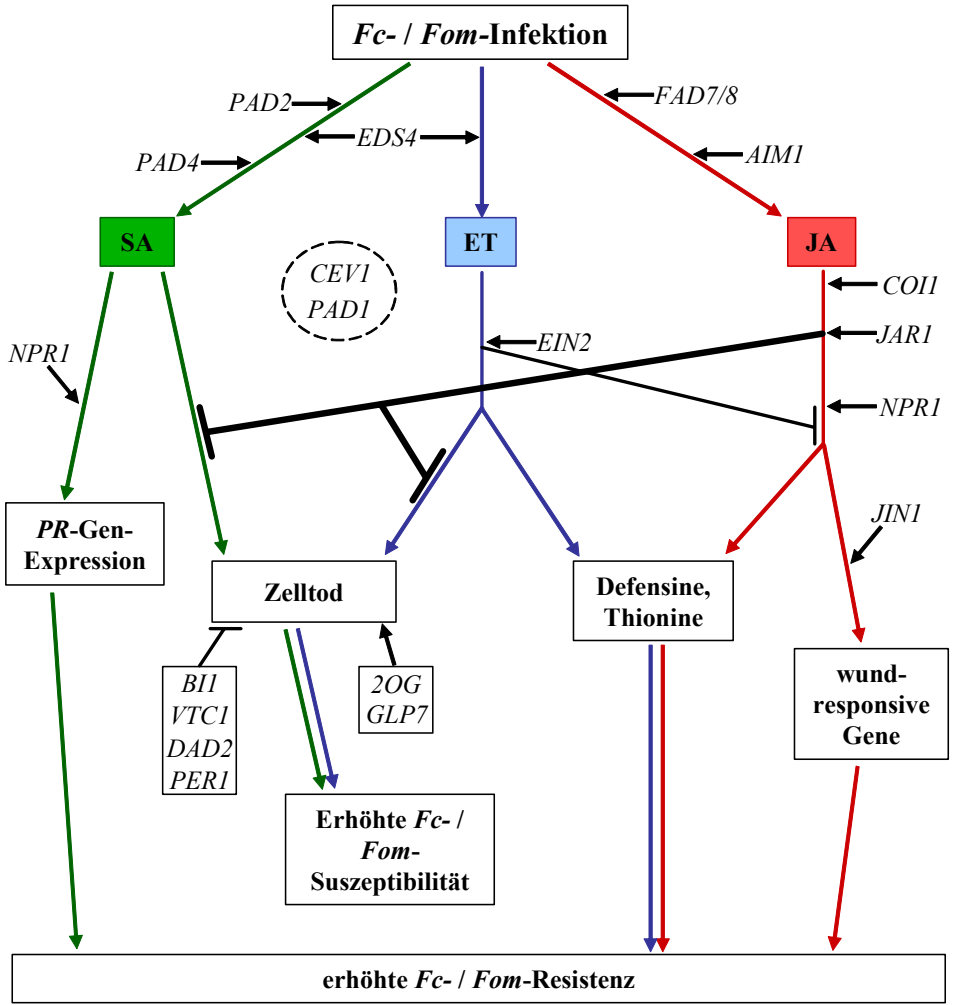
Diese Blockade ist wesentlich stärker als die postulierte antagonistische Wirkung des ET auf den JA-Weg, wodurch erklärt werden könnte, weshalb *eto3*, eine ET-überexprimierende Mutante, keine veränderte Anfälligkeit gegenüber *Fc* oder *Fom* zeigte.

Bei *ein2-1* hingegen würde der leicht inhibierende Effekt auf den JA-Signalweg wegfallen, so dass hier nun die JA-vermittelte Resistenz noch stärker zum Ausdruck käme und diese Mutanten eine erhöhte Resistenz zeigen.

Die in dieser Arbeit mit dem Arabidopsis-Mutanten-Screening erhaltenen Ergebnisse liefern klare Hinweise darauf, dass die Abwehr von *Fusarium* über die SA- und JA-abhängigen Signaltransduktionswege reguliert ist, der ET-abhängige Signalweg dagegen nicht, oder eher antagonistisch daran beteiligt ist. Weiterhin wird deutlich, dass die drei SA-, JA- bzw. ET-

abhängigen Signalwege hier nicht als getrennte Wege zu betrachten sind, sondern ein stark verzweigtes Netzwerk bilden, das bei der Abwehr von *Fusarium*-Pilzen in *Arabidopsis* aktiviert wird. Diese Vernetzung der Signalwege wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (GLAZEBROOK 2005). Auf diese Weise verfügt die Pflanze über die Möglichkeit, mit wenigen konservierten Komponenten komplizierte Netzwerke aufzubauen, um variabel und angemessen auf eine Vielzahl von Signalen antworten zu können (KANNEGANTI *et al.* 2006).

Abb. 4.2 zeigt ein Modell zur Beteiligung der verschiedenen Komponenten der SA-, JA- und ET-abhängigen Signaltransduktionswege an der Abwehr der Pathogene *Fc* bzw. *Fom* aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse.



**Abb. 4.2:** Modell zur Beteiligung der untersuchten Signalweg-Komponenten an der Abwehr von *Fc* und *Fom*.

Dargestellt sind die JA-, ET- und SA-Signalwege mit den untersuchten Komponenten, die im Rahmen dieser Arbeit einen Einfluss auf die Abwehr von *Fc* bzw. *Fom* hatten. Fördernde Effekte der Komponenten auf die Abwehr sind durch  $\rightarrow$  dargestellt, hemmende durch  $\dashv$ . Für zwei Komponenten (*CEVI* und *PAD5*) konnte keine genaue Position in diesem Netzwerk bestimmt werden. Das *screening* der Signalweg-Mutanten hat gezeigt, dass die Abwehr von *Fc* und *Fom* in dieser Arbeit über den SA- und JA-Signalweg reguliert ist, der ET-Signalweg dagegen nicht oder antagonistisch beteiligt ist.

Zusammenfassend kann man postulieren, dass der JA-Signalweg zur Abwehr von *Fc* und *Fom* von größter Bedeutung ist, da er zum einen den möglichen ET- und SA-induzierten Zelltod blockiert und zum anderen die Expression von Abwehrgenen vermittelt. Der SA-Signalweg hat ebenfalls eine protektive Wirkung, da die Expression von *PR*-Genen induziert wird, während die SA-bedingte Zelltodinduktion durch den JA-Weg unterdrückt ist. Der ET-Signalweg hat wenn dann eine antagonistische Wirkung durch die schwache Inhibierung des JA-Weges und die postulierte Zelltodinduktion (abgeleitet von O<sub>3</sub>-bedingtem Zelltod über den ET-Weg, TUOMINEN *et al.* [2004]), welche die Expression von Abwehrgenen überwiegen.

Um diese Zusammenhänge zu bestätigen, wären Versuche mit Doppel- bzw. Trippelmutanten von *Arabidopsis* sinnvoll. Z.B. könnte so die postulierte ET-Beteiligung durch *eto3*-Mutanten, in denen der SA- und JA-Signalweg gestört ist, untersucht werden, da allein die ET-Wirkung ohne den starken JA-Block zum Tragen kommen würde. Diese Mutanten sollten also suszeptibler sein, da der postulierte ET-bedingte Zelltod bei der *Fusarium*-Infektion eintreten würde. Weiterhin könnten Versuche mit Mutanten durchgeführt werden, die sowohl im SA- als auch im JA-Siganlweg gestört sind. In diesem Fall würde eine Hypersuszeptibilität erwartet. Auch könnte in Versuchen durch eine Sorbitol-Behandlung, die zu einem Anstieg des endogenen JA-Spiegels führt, eine erhöhte Resistenz gegenüber *Fc* bzw. *Fom* überprüft werden.

#### 4.3 EINFLUSS VON *F. GRAMINEARUM* UND *P. INDICA* AUF GERSTENPFLANZEN

Pflanzen sind in ihrer Umwelt nicht nur den für sie schädlichen Organismen wie Pathogenen ausgesetzt, die ihnen durch ihre bio- oder nekrotrophe Lebensweise Schaden zufügen. Genauso gibt es mutualistische Interaktionspartner, wobei in diesem Fall sowohl die Pflanze als auch der besiedelnde Organismus von der Interaktion profitieren. Für die Pflanze können sich diese Interaktionen sowohl positiv auf ihre Ernährung und Entwicklung, als auch auf ihre Resistenz bzw. Toleranz gegenüber biotischen und abiotischen Einflüssen auswirken (AZCÓN-AGUILAR & BAREA 1996, LEKBERG & KOIDE 2005). So führt die Besiedelung von Pflanzen mit dem 1997 entdeckten Wurzelendophyten *Piriformospora indica* (*Pi*, VERMA *et al.* 1998) in zahlreichen mono- und dikotylen Pflanzenarten zu deutlichen Wachstumsverbesserungen. Auf welche Weise die Wachstumsförderung durch *Pi* hervorgerufen wird, ist noch nicht geklärt.

In der weit verbreiteten Symbiose zwischen Pflanzen und der arbuskulären Mykorrhiza (AM) erhält die Pflanze vom Pilz vor allem Phosphat, aber auch Nitrat und andere Mineralien. Im Gegenzug werden dem Pilz Kohlenhydrate zur Verfügung gestellt (SMITH & SMITH 1990).



Die Bereitstellung von Phosphat ist für die Pflanze deshalb so wichtig, da die Absorptionsrate von wachsenden Wurzeln um einiges höher ist als die Diffusionsrate von Phosphat im Boden (KARANDASHOV & BUCHER 2005). Auch in der Interaktion der Pflanzen mit *Pi* wird ein positiver Effekt durch verbesserte Phosphatzufuhr diskutiert (PHAM *et al.* 2004, SHAHOLLARI *et al.* 2005), BARAZANI *et al.* (2005) konnten in *Pi*-besiedelten Tabakpflanzen jedoch weder im Gesamt-Phosphat noch im Stickstoffgehalt der Blätter Unterschiede im Vergleich zu nicht besiedelten Pflanzen beobachten. SHERAMETI und Mitarbeiter (2005) haben in *A. thaliana* eine verstärkte Akkumulation von Stickstoff durch Besiedelung mit *Pi* in Wurzeln beobachtet. Neben einer Verbesserung der Nährstoffversorgung könnte auch eine durch die Interaktion mit dem Pilz veränderte Phytohormonkonzentration zu dem verbesserten Wachstum führen. Auf diese Art bewirkte Einflüsse auf das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen sind sowohl in parasitären (MENDE *et al.* 1997) als auch mutualistischen Interaktionen beschrieben (BAREA & AZCON-AGUILAR 1982, BARKER & TAGU 2000). MENDE und Mitarbeiter (1997) z.B. beschreiben die Abgabe von Gibberellinen durch das Reispathogen *Gibberella fujikoroii*, was zu einer starken Verlängerung der Internodien und letztlich zum Abknicken des Sprosses führt. Für Gerste konnte in Gefäßversuchen gezeigt werden, dass die Anwesenheit von *Pi* zu einer Erhöhung der Biomasse und zur Steigerung des Kornertrags führt. Zudem konnte auch eine induzierte Resistenz gegenüber dem biotrophen Blattpathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Echter Gerstenmehltaupilz) beobachtet werden (WALLER *et al.* 2005).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des nekrotrophen Pathogens *Fusarium graminearum* (*Fg*) und des Wurzelendophyten *Pi* auf Gerste sowie ihr Resistenzverhalten gegenüber *Fg* in Anwesenheit von *Pi* untersucht. Dadurch lag der Focus dieses Experiments insbesondere auf der Fragestellung, ob der Wurzelendophyt *Pi* möglicherweise eine protektive Wirkung gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *Fg* besitzt. Unter Laborbedingungen konnte dies bereits in Gerstenwurzeln gegenüber *Fc* beobachtet werden (S. DESHMUKH, pers. Mitteilung). Die Parameter zur Charakterisierung der jeweiligen Interaktionen waren dabei Sproßlänge, Entwicklung, Chlorophyllgehalt und Ertrag der Gerstenpflanzen. Um möglichst reale Bedingungen zu imitieren, wurde dieses Experiment in einem Gefäßversuch unter Freilandbedingungen mit den drei Sommergerstenkultivaren Annabell, Ingrid und Maresi durchgeführt (s. Kap. 3.5). Die erfolgreiche Besiedelung der Pflanzen durch *Pi* wurde mikroskopisch überprüft. Die erfolgreiche Inokulation mit *Fg* wurde mittels PCR mit *Fg*-spezifischen Primern bestätigt. Ein zweites biologisches Experiment wurde nur bezüglich Wuchshöhe und Entwicklung ausgewertet (s. Anhang, Abb. 1 und 2). Der Grund dafür war, dass sich die Pflanzen durch die jahreszeitlich gesehen späte Aussaat (8 ½ Wochen nach dem

ersten Versuch [05.05.06]) zu schnell entwickelt haben. Dadurch hat zum einen die Bestockung zu früh eingesetzt, zum anderen wurde die Entwicklung der Ähren nicht abgeschlossen. Die Ähren waren größtenteils noch vom Fahnenblatt eingeschlossen, als die Pflanzen schon abgereift waren.

Bezüglich des Einflusses einer Infektion von Gerstenwurzeln mit *Fg* auf das Wachstum des Getreides sind bislang keine Daten veröffentlicht. Bei Setzlingen von *Pinus strobus* (Weymouths-Kiefer), die mit verschiedenen Wurzelfäule-verursachenden *Fusarium*-Arten befallen waren, konnte allerdings eine signifikante Reduktion der Sprosslänge beobachtet werden (OCAMB *et al.* 2002).

In dieser Arbeit war der Einfluss des Pathogens *Fg* auf die Sprosslänge der Gerstenpflanzen eher gering. Der direkte Vergleich der *Fg*-inokulierten Pflanzen mit den Kontrollpflanzen zeigt nur in Ingrid sieben und neun wpi (4-6 Wochen nach *Fg*-Inokulation) einen durch das Pathogen bedingten deutlich negativen Effekt.

In Pflanze – *Pi* – Interaktionen wurden schon von vielen Arbeitsgruppen verbesserte Wachstumsbedingungen beschrieben (z.B. VARMA *et al.* 1999, SINGH *et al.* 2000, PHAM *et al.* 2004).

Die Betrachtung der *Pi*-inokulierten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ergab, ebenso wie bei ACHATZ (2006), ein verbessertes Wachstum bei allen drei untersuchten Gerstenkultivaren. Unterschiede gab es allerdings darin, zu welchem Zeitpunkt diese Wuchshöhenunterschiede am deutlichsten waren. So waren drei Wochen nach Inokulation mit *Pi* die deutlichsten Unterschiede in cv. Maresi zu beobachten, dagegen nur geringe Unterschiede in cv. Annabell. 7 bzw. 9 wpi verhielt es sich genau umgekehrt, 12 bzw. 14 wpi waren die Unterschiede wiederum in cv. Maresi deutlich zu sehen und in cv. Annabell nicht mehr. Interessanterweise war diese Beobachtung in den cv. Annabell und Maresi nahezu unabhängig davon, ob die Pflanzen nur mit *Pi* inokuliert worden waren (*Pi*-Pflanzen) oder zusätzlich auch mit *Fg* (*Pi/Fg*-Pflanzen). Der direkte Vergleich der *Pi*-Pflanzen mit den *Pi/Fg*-Pflanzen zeigt generell eher geringe Unterschiede (Ausnahme: cv. Annabell, 7 + 9 wpi). In cv. Ingrid war der positive Effekt durch *Pi* am deutlichsten 12 wpi zu sehen. Bei gleichzeitiger Inokulation mit *Fg* war der positive Effekt durch *Pi* in diesem Kultivar nur 14 wpi vermindert. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *Pi* wie erwartet wachstumsfördernde Effekte auf Gerste hatte. Diese wurden bei gleichzeitiger Inokulation mit dem nekrotrophen Pathogen *Fg* nur geringfügig negativ beeinflusst. Die Inokulation der Wurzeln mit *Fg* alleine hatte nahezu keinen Effekt auf das Längenwachstum der Gerste. Dies

wurde durch die biologische Wiederholung weitgehend bestätigt. Nach Inokulation mit *Fg* wurde hier z.T. sogar größere Wuchshöhen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet.

Auch bezüglich des Einflusses auf den Chlorophyllgehalt durch eine *Fg*-Infektion der Wurzeln ist bisher nichts bekannt. In dem hier durchgeführten Versuch war der Chlorophyllgehalt in allen drei untersuchten Gerstenkultivaren zum früheren Zeitpunkt (7 wpi) durch die *Fg*-Infektion leicht bis deutlich negativ beeinflusst. Zum späteren Zeitpunkt (9 wpi) war keine Korrelation mehr zu erkennen. *Pi* dagegen hatte weder zum frühen noch zum späteren Zeitpunkt einen erkennbaren Effekt auf den Chlorophyllgehalt. Dies steht im Gegensatz zu ACHATZ (2006), da dort jeweils eine leichte Erhöhung des Chlorophyllgehalts durch *Pi*-Infektion in cv. Annabell (8, 9, 10, 11 und 12 wpi) beobachtet wurde.

Die Effekte einer Wurzelinfektion mit *Fusarium* auf die Entwicklung der Ähren und den Ertrag war zu Beginn dieser Arbeit noch Nichts bekannt. Von *Pi* weiß man hingegen, dass der Wurzelendophyt auch zu einer früheren und schnelleren Entwicklung von Gerstenähren führt (Achatz 2006).

In dieser Arbeit wurden nach Inokulation mit *Fg* in cv. Annabell 10 und 11 wpi wenig mehr bzw. weiter entwickelte Ähren beobachtet, 12 wpi war die Entwicklungsstufe etwa vergleichbar. In cv. Ingrid und Maresi dagegen zeigte sich eine verzögerte Ährenentwicklung nach Inokulation mit *Fg*. Durch Inokulation mit dem Wurzelendophyten *Pi* wurde in allen drei Kultivaren und biologischen Experimenten zu allen Zeitpunkten, wiederum in Übereinstimmung mit ACHATZ (2006), eine schnellere Entwicklung der Ähren, d.h. mehr Ähren sowie weiter entwickelte Ähren beobachtet (Ausnahme: cv. Maresi, 10 wpi). Diese Beobachtung war in cv. Annabell und Ingrid sowohl im Vergleich *Pi* – K als auch im Vergleich K – *Pi/Fg* zu. Der leicht negative Effekt durch *Fg* auf die Ährenentwicklung wurde also meist durch den positiven Einfluss von *Pi* ausgeglichen, bzw. der positive Effekt von *Pi* auf die Entwicklung wurde nur selten durch *Fg* vermindert.

Dass die direkte Infektion von Getreideähren mit *Fg* zu starken Ertragsverlusten von 30 – 70 % führt, ist hinreichend bekannt. Durch Keimlings- und Wurzelfäule wurden Ertragseinbußen von 7 – 17 % bzw. 10 – 30 % beschrieben (MIEDANER 1997).

Die Inokulation mit *Fg* verursachte in dieser Arbeit in allen drei Gerstenkultivaren Ertragsverluste von knapp 3 % (allerdings nicht signifikant). Diese Ertragsminderungen gingen meistens auf ein geringeres Tausend-Korngewicht (TKG) und auf eine geringere

Anzahl von Körnern pro Ähre zurück. Die Anzahl der Ähren pro Gefäß war hingegen durch das Pathogen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen sogar erhöht.

Dass die Infestierung von Wurzeln durch *Pi* zu verstärkter Blütenbildung führt, ist bekannt. RAI *et al.* (2001) z.B. haben dies an den medizinischen Pflanzen *Spilanthes calva* und *Withania somnifera* (Schlafbeere) beobachtet. BARAZANI *et al.* (2005) bemerkten an Wildtabak nicht nur eine vermehrte, sondern auch eine um zwei Tage frühere Blütenbildung. Agronomisch betrachtet wäre eine frühzeitigere Abreife der Gerste wünschenswert, weil so die Zeit, in der ungünstige Witterungsbedingungen im Feld Schaden anrichten könnten, verkürzt würde.

Eine Besiedelung der Gerstenpflanzen mit *Pi* bewirkte eine Erhöhung des Ertrags in allen drei untersuchten Kultivaren von knapp 1 % (Maresi) bis über 5 % (Annabell [signifikant], Ingrid). Die Ertragssteigerungen bei gleichzeitiger Anwesenheit von *Fg* und *Pi* lagen um ca. 2 % geringer. *Pi* hatte somit einen positiven Einfluss auf den Ertrag in Gerste. Des Weiteren war *Pi* in der Lage, die ertragsmindernden Effekte des Pathogens *Fg* auszugleichen und sogar trotz Anwesenheit des Pathogens eine signifikante Ertragssteigerung zu bewirken. Zurückzuführen waren diese Ertragssteigerungen in cv. Annabell und cv. Maresi auf ein erhöhtes TKG, eine erhöhte Anzahl Ähren pro Gefäß (cv. Annabell und Ingrid) bzw. eine erhöhte Anzahl Körner pro Ähre (cv. Ingrid). In den Untersuchungen von ACHATZ (2006) waren die Ertragssteigerungen durch *Pi* in cv. Annabell und Ingrid dagegen ausschließlich durch eine erhöhte Anzahl Ähren pro Gefäß bedingt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Inokulation von Gerstenwurzeln mit dem nekrotrophen Pathogen *Fg* kaum einen Effekt auf die Wuchshöhe aber deutlich negative Effekte auf die Ährenentwicklung und den Ertrag der untersuchten Gerstenkultivare hatte. Die Besiedelung der Pflanzen mit dem Wurzelendophyten *Pi* bewirkte einen umgekehrten Effekt. Sie wirkte sich auf alle untersuchten Parameter der Pflanzenentwicklung, abgesehen vom Chlorophyllgehalt, positiv aus. Interessant im Sinne des Pflanzenschutzes ist, dass die negativen Effekte, die durch die Infektion mit *Fg* verursacht wurden, durch die *Pi*-Besiedelung oft nicht nur aufgehoben sondern sogar umgekehrt wurden. Damit zeigt *Pi* in Gerste also nicht nur eine protektive Wirkung gegenüber dem biotrophen Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (WALLER *et al.* 2005), sondern auch gegenüber den negativen Einflüssen des nekrotrophen Pathogen *Fg* auf Wachstum, Entwicklung und Ertrag. Dies ist eine bemerkenswerte Eigenschaft, da Behandlungen oder züchterische Veränderungen von Pflanzen oft nur entweder gegen biotrophe oder nekrotrophe Pathogene wirksam sind. So sind z.B. Gerstenpflanzen mit dem *mlo*-Genotyp resistent gegenüber *Blumeria graminis* f.sp.

*hordei*, aber anfälliger gegenüber den Zelltod-induzierenden Pathogenen *Magnaporthe oryzae*, *Fg* und gegenüber Kulturfiltrat von *Bipolaris sorokiniana* (JANSEN *et al.* 2005, JAROSCH *et al.* 1999, KUMAR *et al.* 2001).

Die Nutzung von *Pi* in der Landwirtschaft stellt somit die einzigartige Möglichkeit dar, einen Schutz gegenüber biotrophen wie auch nekrotrophen Pathogenen bei gleichzeitiger Ertragssteigerung zu erreichen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Getreidepathogene *Fusarium culmorum* (*Fc*) und *F. graminearum* (*Fg*) sind Generalisten, die durch partielle oder vollständige Taubährigkeit, Wurzel- und Halmbasisfäule hohe Ertragsverluste sowie die Kontamination des Getreides mit verschiedenen Mykotoxinen verursachen.

Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression von 1500 verschiedenen Genen der Gerste als Antwort auf eine *Fc*-Blattinfektion vergleichend mit je einem *Fc*-anfälligen bzw. einem weniger stark *Fc*-anfälligen Kultivar in *macroarray*-Analysen untersucht. Anschließend wurde die Expression ausgewählter Kandidatengene mittels semi-quantitativer RT-PCR in Blättern und Ähren von Gerste und Weizen überprüft. Dabei zeigten drei Kandidatengene ein Expressionsmuster, das mit Resistenz bzw. Suszeptibilität der untersuchten Getreidekultivare gegenüber *Fc* korrelierte. Zwei dieser Gene waren im jeweils weniger *Fc*-anfälligen Kultivar stärker induziert: ein *RELA*-Homolog, das vermutlich in die Produktion eines schnell aktivierten Transkriptionsfaktors involviert ist, sowie ein putatives *CYANASE*-Gen, das vermutlich *Fc*-förderndem Zelltod entgegenwirkt. Die funktionelle Analyse bestätigte die Relevanz des *RELA*-Homologs zur Abwehr von *Fc* in Arabidopsis. Ein *vSNARE11* war dagegen im jeweils anfälligeren Kultivar induziert, im jeweils resistenteren dagegen nicht exprimiert (Gerste) bzw. nicht differentiell exprimiert oder reprimiert (Weizen).

In weiteren Untersuchungen wurden zum einen Funktionsanalysen im System Arabidopsis – *Fc* bzw. *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* mit Arabidopsis *knock-out* Mutanten Zelltod-fördernder bzw. –inhibierender Gene durchgeführt. Dies ergab eine erhöhte Resistenz gegenüber *Fc* durch Suppression des Zelltods sowie eine erhöhte Suszeptibilität durch vermehrten Zelltod in Arabidopsis gegenüber beiden Pathogenen. Zum anderen wurde die Beteiligung der Salizylat (SA)-, Jasmonat (JA)- bzw. Ethylen (ET)-abhängigen Signaltransduktionswege an der Abwehr von *Fusarium* untersucht. Die hier erzielten Ergebnisse belegen, dass der JA-Weg zur Abwehr beider Pathogene am wichtigsten ist. Dies ist vermutlich einerseits auf die JA-vermittelte Expression von Abwehrgenen zurückzuführen sowie andererseits auf eine mögliche Blockade von ET- bzw. SA-vermitteltem Zelltod. Auch der SA-Signalweg zeigte einen positiven Effekt auf die Resistenz von Arabidopsis gegenüber *Fc* und *Fom*, was vermutlich durch die SA-vermittelte *PR*-Genexpression zu erklären ist. Der ET-Signalweg hat, wenn überhaupt, eher eine antagonistische Wirkung im Pathosystem Arabidopsis – *Fusarium*, da er eine schwache Blockade des wichtigen JA-Signalwegs bewirkt und zudem eventuell zelltodfördernd wirkt.

Daneben wurde der Einfluss einer Wurzelinfektion durch *Fg* sowie der Besiedelung durch den Wurzelendophyten *Piriformospora indica* (*Pi*) auf Wachstum, Entwicklung,

Chlorophyllgehalt sowie den Ertrag von Gerste untersucht. Abgesehen vom Chlorophyllgehalt wurden alle Parameter durch *Fg* insgesamt negativ, durch *Pi* positiv beeinflusst. Bei gleichzeitiger Inokulation mit *Fg* und *Pi* wurde der negative Effekt durch *Fg* nicht nur aufgehoben, sondern zudem Wachstums- und Ertragssteigerungen sowie eine schnellere Entwicklung erzielt, die mit denen von Pflanzen, die nur mit *Pi* inokuliert worden waren, vergleichbar waren.

## 6 SUMMARY

The crop pathogens *Fusarium culmorum* (*Fc*) and *F. graminearum* (*Fg*) are generalists, which cause considerable yield losses by partial or complete head blight, root and foot rot as well as contamination of grain with mycotoxins.

In this work, the expression of 1536 different barley genes 24 hours after *Fc*-leaf inoculation was compared in a *Fc*-susceptible and a less *Fc*-susceptible cultivar, by using macroarrays. The expression of selected candidate genes was then verified via semi-quantitative RT-PCR in leaves and ears of barley and wheat. Three candidate genes showed an expression profile that correlated with the resistance or susceptibility in the investigated crop cultivars to *Fc*, respectively. Two genes showed a stronger induction in the less *Fc*-susceptible cultivar: a *RELA*-homologue that is probably involved in the production of a fast activated transcription factor, and a putative *CYANASE* which most likely antagonizes *Fc*-promoted cell death. The functional analysis confirmed the relevance of the *RELA*-homologue in the defense of *Arabidopsis* against *Fc*. On the other hand a *vSNARE11* was induced in the more susceptible cultivar, but not expressed in the more resistant barley plants and not differentially expressed or repressed in wheat after *Fc*-inoculation.

Further investigations were carried out in the interaction of *Arabidopsis* with *Fc* and *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* (*Fom*) respectively, using *Arabidopsis* knock-out mutants defective in cell death promoting or inhibiting genes. These experiments revealed that suppression of cell death enhances resistance to *Fusarium* while vice versa susceptibility to both pathogens investigated is increased by accelerated cell death in *Arabidopsis*. Moreover the participation of salicylate (SA), jasmonate (JA) and ethylen (ET) depending signal transduction pathways in the defense against *Fc* and *Fom* in *Arabidopsis* was analysed. The results of this study supported the importance of the JA-pathway in the defense against both pathogens. This is probably due to the JA-mediated expression of defense genes and to the blockade of ET- or SA-mediated cell death. In addition the SA-signalling pathway showed a positive effect on the resistance of *Arabidopsis* against *Fc* and *Fom* which can be explained by SA-mediated PR-gene expression. The ET-signalling pathway was, if at all, antagonistic within the pathosystem *Arabidopsis* – *Fusarium* maybe because of the weak block of the important JA-pathway and the postulated cell death promoting role of ET.

In additional experiments the influence of root infection by *Fg* and colonization by the root endophyte *Piriformospora indica* (*Pi*) on growth, development, chlorophyll content and yield of barley was investigated. Besides the chlorophyll content all other parameters were



negatively influenced by *Fg*, *Pi* had the opposite effect. Concomitant inoculation with *Fg* and *Pi* abolished the negative effect of *Fg* and resulted in enhancement of growth and yield as well as faster development comparable to the effect achieved by exclusive *Pi*-infection.

## 7 LITERATUR

- Aalen, R.B. (1999). Peroxiredoxin antioxidants in seed physiology. *Seed Sci Research* 9, 285-295.
- Achatz, B. (2006). Untersuchungen zum Einfluss des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* auf das Wachstum von *Hordeum vulgare*, die Resistenz gegen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* und die Genexpression in den Blättern. Dissertation.
- Agrios, G.N. (1997). *Plant Pathology*. 4<sup>th</sup> edition, Academic Press, San Diego, USA.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, A. und Ecker, J.R. (1999). EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in *Arabidopsis*. *Science* 284, 2148-2152.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Anderson, P.M., Korte, J.J. und Holcomb, T.A. (1994). Reaction of the N-Terminal Methionine Residues in Cyanase with Diethylpyrocarbonate. *Biochem* 33, 14121-14125.
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R. und Kazan, K. (2004). Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 3460-3479.
- Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M. und Salekdeh, G.H. (2006). Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics* 6, 2542-2554.
- Azcón-Aguilar, C. & Barea, J.M. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6, 457-464.
- Bai, G.-H., Plattner, R., Desjardins, A. und Kolb, F. (2001). Resistance to Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Plant Breed* 120, 1-6.
- Bai, G. & Shaner, G. (2004). Management and Resistance in Wheat and Barley to Fusarium Head Blight. *Annu Rev Phytopathol* 42, 135-161.
- Barazani, O., Benderoth, M. und Groten, K. (2005). *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* increase growth performance at the expense of herbivore resistance in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* 146 (2), 234-243.
- Barea, J.M. & Azcón-Aguilar, C. (1982). Production of plant growth-regulating by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl Environ Microbiol* 43, 810-813.

- Barker, S.J. & Tagu, D. (2000). The Roles of Auxins and Cytokinins in Mycorrhizal Symbioses. *J Plant Growth Regul* 19, 144-154.
- Berger, S. (2002). Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta* 214, 497-504.
- Berrocal-Lobo, M. & Molina, A. (2004). Ethylene Response Factor 1 Mediates *Arabidopsis* Resistance to the Soilborne Fungus *Fusarium oxysporum*. *MPMI* 17, 763-770.
- Blumwald, E., Aharon, G.S. und Lam, B.C.-H. (1998). Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 3(9), 342-346.
- Boddu, J., Cho, S., Kruger, W.M. und Muehlbauer, G.J. (2006). Transcriptome Analysis of the Barley-*Fusarium graminearum* Interaction. *MPMI* 19(4), 407-417.
- Bohmann, S., Staal, J., Thomma, B.P.H.J., Wang, M. und Dixelius, C. (2004). Characterisation of an *Arabidopsis*-*Leptosphaeria maculans* pathosystem: resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant J* 37, 9-20.
- Braeken, K., Moris, M., Daniels, R., Vanderleyden, J. und Mickiels, J. (2006). New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends in Microbiol* 14(1), 45-54.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R., und Lamb, C. (1994). Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6, 1703-1712.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S. und Dong, X. (1997). The *Arabidopsis* NPR1 Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats. *Cell* 88, 57-63.
- Caño-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M. und Bevan, M. (2003). Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 34, 351-362.
- Carter, C., Graham, R.A. und Thornburg, R.W. (1998). *Arabidopsis thaliana* contains a large family of germin-like proteins: characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members. *Plant Mol Biol* 38, 929-943.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J. und Vinella, D. (1996). The stringent response. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology (Vol. 1). F.C. Neidhardt, R. Curtiss, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, und H.E. Umberger, eds. (ASM Press, Washington, D.C.) pp. 1458-1496.
- Chandler, E.A., Simphon, D.R., Thomsett, M.A. und Nicholson, P. (2003). Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 62, 355-367.
- Chester, K. (1933). The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quar Rev Biol* 8: 129-154, 275-324

- Christensen, A.B., Cho, B.H., Naesby, M., Gregersen, P.L., Brandt, J., Madriz-Ordenana, K., Collinge, D.B. und Thordal-Christensen, H. (2002). The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Mol Plant Pathol* 3, 135-144.
- Coego, A., Ramirez, V., Gil, M.J., Flors, V., Mauch-Mani, B. und Vera, P. (2005). An Arabidopsis Homeodomain Transcription Factor, *OVEREXPRESSOR OF CATIONIC PEROXIDASE 3*, Mediates Resistance to Infection by Necrotrophic Pathogens. *Plant Cell* 17, 2123-2137.
- Collinge, D.B., Gregersen, P.L. und Thordal-Christensen, H. (2002). The nature and role of defence response genes in cereals. In *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*, R.R. Belanger und W.R. Bushnell, eds. (St. Paul, Minnesota, USA, APS Press, pp. 146-160.
- Collins, N.C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J.-L., Hüchelhoven, R., Stein, M., Freialdenhoven, A., Somerville, S.C. und Schulze-Lefert, P. (2003). SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 425, 973-977.
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S. und Kohler, A. (2001). Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *Europ J Plant Pathol* 107: 113-119.
- Danon, A., Rotari, V.I., Gordon, A., Mailhac, N. und Gallois, P. (2004). Ultraviolet-C Overexposure Induces Programmed Cell Death in *Arabidopsis*, Which Is Mediated by Caspase-like Activities and Which Can Be Suppressed by Caspase Inhibitors, p35 and *Defender against Apoptotic Death*. *J Biol Chem* 279(1), 779-787.
- De Cal, A., Garcia-Lepe, R. und Melgarejo, P. (1999). Induced Resistance by *Penicillium oxalicum* Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Histological Studies of Infected and Induced Tomato Stems. *Phytopathol* 90(3), 260-268.
- Devoto, A. & Turner, J.G. (2005). Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network. *Physiol Plantarum* 123, 161-172.
- Diamond, H. & Cooke, B.M. (2002). Preliminary studies on biological control of the *Fusarium* ear blight complex of wheat. *Crop Protect* 22, 99-107.
- Dickmann, M.B., Park, Y.K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T. und French, T. (2001). Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6957-6962.
- Dietz, K.-J. (2003). Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol* 54, 93-107.
- Dietz, K.-J., Jacob, S., Oelze, M.-L., Laxa, M., Tognetti, V., Marina, S., de Miranda, N., Baier, M. und Finkemeier, I. (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J Exp Bot* 57(8), 1697-1709.
- Dill-Maack, R. & Jones, R.K. (2000). The Effect of Previous Crop Residues and Tillage on *Fusarium* Head Blight of Wheat. *Plant Disease* 84(1), 71-75

- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Postel, D., Dijkma, W.T.P., Dujardin, A. und Placinta, C.M. (1998). Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *Europ J Plant Pathol* 104, 741-751.
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* 7, 547-552.
- Doohan, F.M., Brennan, J. und Cooke, B.M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Europ J Plant Pathol* 109, 755-768.
- Duncan, K.E. & Howard, R.J. (2000). Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycol Res* 104(9), 1074-1082.
- Ebbs, S. (2004). Biological degradation of cyanide compounds. *Curr Opin Biotechnol* 15, 231-236.
- Eichmann, R., Schultheiss, H., Kogel, K.-H. und Hückelhoven, R. (2004). The Barley Apoptosis Suppressor Homologue Box Inhibitor-1 Compromises Nonhost Penetration Resistance of Barley to the Inappropriate Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. *MPMI* 17(5), 484-490.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C. und Turner, J.G. (2002). The Arabidopsis Mutant *cev1* Links Cell Wall Signaling to Jasmonate and Ethylene Responses. *Plant Cell* 14, 1557-1566.
- Ellis, C. & Turner, J.G. (2001). The Arabidopsis Mutant *cev1* Has Constitutively Active Jasmonate and Ethylene Signaling Pathways and Enhanced Resistance to Pathogens. *Plant Cell* 13, 1025-1033.
- Epple, P., Apel, K. und Bohlmann, H. (1997) Overexpression of an Endogenous Thionin Enhances Resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9, 509-520.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D., Daniels, M.J. und Parker, J.E. (1999). EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3292-3297.
- Fischer von Mollard, G., Nothwehr, S.F. und Stevens, T.H. (1997). The Yeast v-SNARE Bti1p Mediates Two Vesicle Transport Pathways through Interactions with the t-SNAREs Sed5p and Pep12p. *J Cell Biol* 137(7), 1511-1524.
- Flor, H.H. (1971). Current status of the gene for gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9, 275-296.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 28, 1056-1071.
- Gechev, T.S., Minkov, I.N. und Hille, J. (2005). Hydrogen Peroxide-induced Cell Death in Arabidopsis: Transcriptional and Mutant Analysis Reveals a Role of an Oxoglutarate-dependent Dioxygenase Gene in the Cell Death Process. *IUBMB Life* 57(3), 181-188.

- Gerlach, W. & Nierenberg, H. (1982). The Genus *Fusarium* – A pictorial Atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, Heft 209.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Métraux, J.-P., Zhu, T. und Katagiri, F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J* 34, 217-228.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43, 205-227.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.-H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. und Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629-643.
- Greenberg, J.T. (1996). Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 12094-12097.
- Gupta, B., Willits, M.G. und Glazebrook J. (2000). *Arabidopsis thaliana* *EDS4* Contributes to Salicylic Acid (SA)-Dependent Expression of Defense Responses: Evidence for Inhibition of Jasmonic Acid Signaling by SA. *MPMI* 13(5), 503-511.
- Hammerschmidt, R. (1993). The nature and generation of systemic signals induced by pathogens, arthropod herbivores and wounds. *Advances Plant Pathol* 10, 307-337.
- Hammond-Kosack, K. & Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8(10), 1773-1791.
- Haselkås, C., Viken, M.K., Grini, P.E., Nygaard, V., Nordgard, S.H., Meza, T.J. und Aalen, R.B. (2003). Seed 1-Cysteine Peroxiredoxin Antioxidants Are Not Involved in Dormancy, But Contribute to Inhibition of Germination during Stress. *Plant Physiol* 133, 1148-1157.
- Hauptmann, P., Riel, C., Kunz-Schughart, L.A., Fröhlich, K.-U., Madeo, F. und Lehle, L. (2006). Defects in N-glycosylation induce apoptosis in yeast. *Mol Microbiol* 59(3), 765-778.
- Heath, M.C. (1981). A generalised concept of host-parasite specificity. *Phytopathol* 71, 1121-1123.
- Heath, M.C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 3, 315-319.
- Higgins D., Thompson J., Gibson T. Thompson J.D., Higgins D.G., und Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

- Hirsch, J., Deslandes, L., Fen, D.X., Balagué, C. und Marco, Yves (2002). Delayed Symptom Development in *ein2-1*, an *Arabidopsis* Ethylene-Insensitive Mutant, in Response to Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathol* 92(10), 1142-1148.
- Hückelhoven, R. & Kogel, K.-H. (2003). Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216, 891-902.
- Hutcheson, S.W. (1998). Current concepts of active defense in plants. *Annu Rev Phytopathol* 36, 59-90.
- Inch, S.A. & Gilbert, J. (2003). Survival of *Gibberella zeae* in *Fusarium*-Damaged Wheat Kernels. *Plant Disease* 87(3), 282-287.
- Jain, S.K. (2004). Investigations on the Host – Pathogen Interaction of Cereals with Fungal Pathogens from the Genus *Blumeria* and *Bipolaris*. Dissertation.
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A. und Maier, F.J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc Natl Acad Sci* 102(46), 16892-16897.
- Jarosch, B., Kogel, K.-H. und Schaffrath, U. (1999). The ambivalence of the barley *Mlo* locus: Mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *MPMI* 12, 508-514.
- Kanneganti, T.-D., Huitema, E., Cakir, C. und Kamoun, S. (2006). Synergistic Interactions of the Plant Cell Death Pathways Induced by *Phytophthora infestans* Nep1-Like Protein PiNPP1.1 and INF1 Elicitor. *MPMI* 19(8), 854-863.
- Karandashov, V. & Bucher, M. (2005). Symbiotic phosphat transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci* 10, 22-29.
- Kelleher, D.J. & Gilmore, R. (1997). DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4994-4999.
- Kiba, A., Nishihara, M., Tsukatani, N., Nakatsuka, T., Kato, Y. und Yamamura, S. (2005). A peroxiredoxin Q homolog from gentians is involved in both resistance against fungal disease and oxidative stress. *Plant Cell Physiol* 46, 1007-1015.
- Kinkema, M., Fan, W. und Dong, X. (2000). Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Activation of *PR* Gene Expression. *Plant Cell* 12, 2339-2350.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R. und Takabayashi, J. (2006). ETR1-, JAR1- and PAD2-dependent signaling pathways are involved in C6-aldehyde-induced defense responses of *Arabidopsis*. *Plant Sci* 171, 415-423.
- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, G., Nishimura, M. und Iba, K. (1994). Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 105, 601-605.

- Kogel, K.-H., Beckhove, U., Dreschers, J., Munch, S. und Romme, Y. (1994). Acquired Resistance in Barley (The Resistance Mechanism Induced by 2,6-Dichlorisonicotinic Acid Is a Phenocopy of a Genitically Based Mechanism Governing Race-Specific Powdery Mildew Resistance). *Plant Physiol* 106(4), 1269-1277.
- Kogel, K.-H. & Langen, G. (2005). Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cell Microbiol* 7(11), 1555-1564.
- Koide, R.T. & Dickie, I.A. (2002). Effects of mycorrhizal fungi on plant populations. *Plant Soil* 244, 307-317.
- Koshiishi, I., Mamura, Y. und Imanari, T. (1997). Cyanate causes depletion of ascorbate in organisms. *Biochem Biophys Acta* 1336, 566-574.
- Kouadio, J.H., Mobio, T.A., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S.D. und Creppy, E.E. (2005). Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology* 213(1-2), 56-65.
- Kumar, J., Hückelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S. und Kogel, K.-H. (2001). A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathol* 91, 127-133.
- Lamb, C. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48, 251-275.
- Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I.H. und Kunkel, B.N. (2006). The *Arabidopsis thaliana* *JASMONATE INSENSITIVE 1* Gene Is Required for Suppression of Salicylic Acid-Dependent Defenses During Infection by *Pseudomonas syringae*. *MPMI* 19(7), 789-800.
- Lekberg, Y. & Koide, R.T. (2005). Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. *New Phytol* 168, 189-204.
- Lincoln, J.E., Richael, C., Overduin, B., Smith, K., Bostock, R. (2002). Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15217-15221.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J. und Solano, R. (2004). *JASMONATE-INSENSITIVE1* Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 1938-1950.
- Lorenzo, O. & Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* 8, 532-540.
- Luan, S. (1998). Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. *Trends Plant Sci* 3, 271-275.



- Magnusson, L.U., Farewell, A. und Nyström, T. (2005). ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. Trends in Microbiol 13(5), 236-242.
- McGrath, R.B. & Ecker, J.R. (1998). Ethylene signaling in *Arabidopsis*: Events from the membrane to the nucleus. Plant Physiol Biochem 36, 103-113.
- Mehdy, M.C. (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. Plant Physiol 105, 467-472.
- Mende, K., Homann, V. und Tudzynski, B. (1997). The geranylgeranyl diphosphat synthase gene of *Gibberella fujikuroi* – isolation and expression. Mol Gen Genetics 255, 96-105.
- Mesterházy, Á. (2002). Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. Culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. Europ J Plant Pathol 108, 675-684.
- Miedaner, T. (1997). Review: Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. Plant Breeding 116, 201-220.
- Miedaner, T., Schilling, A.G. und Geiger, H.H. (2001). Molecular Genetic Diversity and Variation for Aggressiveness in Populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* Sampled from Wheat Fields in Different Countries. J Phytopathol 149, 641-648.
- Miedaner, T., Schilling, A.G. und Geiger, H.H. (2004). Competition effects among isolates of *Fusarium culmorum* differing in aggressiveness and mycotoxin production on heads of winter rye. Europ J Plant Pathol 110, 63-70.
- Miedaner, T., Wilde, F., Steiner, B. und Buerstmayr, H. (2006). Stacking quantitative trait loci (QTL) for *Fusarium* head blight resistance from non-adapted sources in an European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. Theor Appl Genet 112, 562-569.
- Morita, M.T., Kato, T., Nagafusa, K., Saito, C., Ueda, T., Nakano, A. und Tasaka, M. (2002). Involvement of the Vacuoles of the Endodermis in the Early Process of Shoot Gravitropism in *Arabidopsis*. Plant Cell 14, 47-56.
- Nakashima, T., Sekiguchi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama, S. und Nishimoto, T. (1993). Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. Mol Cell Biol 13, 6367-6374.
- Nickstadt, A., Thomma, B.P.H.J., Feussner, I., Kangasjärvi, J., Zeier, J., Loeffler, C., Scheel, D. und Berger, S. (2004). The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. Mol Plant Pathol 5(5), 425-434.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B.F. und Dangl, J.L. (2003). Recognition and Response in the Plant Immune System. Annu Rev Genet 37, 579-609.

- Nühse, T.S., Boller, T. und Peck, S.C. (2003). A Plasma Membrane Syntaxin Is Phosphorylated in Response to the Bacterial Elicitor Flagellin. *J Biol Chem* 278(46), 45248-45254.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198, 249-266.
- Ocamb, C.M., Juzwik, J. und Martin, F.B. (2002). *Fusarium* spp. And *Pinus strobus* seedlings: root disease pathogens and taxa associated with seed. *New Forests* 24(1), 67-79.
- Oelmüller, R., Peškan-Berghöfer, T., Shahollari, B., Trebicka, A., Sherameti, I. und Varma, A. (2005). MATH domain proteins represent a novel protein family in *Arabidopsis thaliana*, and at least one member is modified in roots during the course of a plant-microbe interaction. *Physiol Plantarum* 124, 152-166.
- Oerke, E.-C. & Dehne, H.-W. (1997). Global crop production and the efficacy of crop protection – current situation and future trends. *Europ J Plant Pathol* 103, 203-215.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H. Jr. und Kangasjärvi, J. (2000). The ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating super-oxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12, 1849-1862.
- Parry, D.W., Jenkinson, P. und McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathol* 44, 207-238.
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniwi, J., Alvarez, M.E. und Foyer, C.H. (2005). Ascorbic Acid Deficiency Activates Cell Death and Disease Resistance Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139, 1291-1303.
- Peškan-Berghöfer, T., Shahollari, B., Giong, P.H., Hehl, S., Markert, C., Blanke, V., Kost, G., Varma, A. und Oelmüller, R. (2004). Association of *Piriformospora indica* with *Aarabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiol Plantarum* 122, 465-477.
- Pham, G.H., Singh, A., Malla, R., Kumari, R., *et al.* (2004). Interaction of *Piriformospora indica* with Diverse Microorganisms and Plants. *Plant Surface Microbiology*, A. Varma, L. Abbott, D. Werner, R. Hampp (eds.) (Springer-Verlag Berlin Heidelberg) pp.237-265.
- Pieterse, C.M.J. & van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Science* 4(2), 52-58.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, N., Weisbeek, P.J. und van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1571-1580.
- Pilling, E. & Höfte, H. (2003). Feedback from the wall. *Curr Opin Plant Biol* 6, 611-616.

- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F. und Macdonald, A.M.C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Sci Techn* 78, 21-37.
- Pshibytko, N.L., Zenevich, L.A. und Kabashnikova, L.F. (2006). Changes in the Photosynthetic Apparatus during Fusarium Wilt of Tomato. *Russ J Plant Phys* 53(1), 25-31.
- Rai, M., Acharya, D. und Singh, A. (2001). Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. *Mycorrhiza* 11, 123-128.
- Richmond, T.A. & Bleecker, A.B. (1999). A Defect in  $\beta$ -Oxidation Causes Abnormal Inflorescence Development in Arabidopsis. *Plant Cell* 11, 1911-1923.
- Rocha, O., Ansari, K. und Doohan, F.M. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Add Cont* 22(4), 369-378.
- Rouhier, N., Gelhaye, E., Gualberto, J.M. *et al.* (2004). Poplar Peroxiredoxin Q. A Thioredoxin-Linked Chloroplast Antioxidant Functional in Pathogen Defense. *Plant Physiol* 134, 1027-1038.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sanderfoot, A.A., Assaad, F.F. und Raikhel, N.V. (2000). The Arabidopsis Genome. An Abundance of Soluble *N*-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Adaptor Protein Receptors. *Plant Physiol* 124, 1558-1569.
- Schäfer, P. (2003). *Cytological and Molecular Investigation of Cereal Resistance Mechanisms Against the Hemibiotrophic Pathogen Bipolaris sorokiniana (Teleomorph: Cochliobolus sativus)*. Dissertation.
- Scheel, D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opinion Plant Biol* 1, 305-310.
- Schlösser, E. (1997). *Allgemeine Phytopathologie*. 2. Ausgabe, Thieme, Stuttgart.
- Schultheiss, H., Hückelhoven, R. und Kogel, K.-H. (2001). In-planta-Funktionsanalyse von PR1 im Pathosystem Gerste-Echter Gerstenmehltau mittels transientem *gene silencing*. *Phytomedizin* 31, 86-87.
- Schulze-Lefert, P. & Vogel, J. (2000). Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci* 5, 343-348.
- Schweizer, P., Buchala, A. und Métraux, J.P. (1997). Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Physiol* 115, 61-70.

- Shahollari, B., Varma, A. und Oelmüller, R. (2005). Expression of a receptor kinase in *Arabidopsis* roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. *J Plant Physiol* 162, 945-958.
- Sherameti, I., Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., Varma, A. und Oelmüller, R. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcriptionfactor which binds to a conserved motif in their promoters. *J Biol Chem* 280, 26241-26247.
- Simpson, D.R., Weston, G.E., Turner, J.A., Jennings, P. und Nicholson, P. (2001). Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *Europ J Plant Pathol* 107, 421-431.
- Singh, A., Sharma, J., Rexer, K.-H. und Varma, A. (2000). Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformospora indica* – A revolutionary plant growth promoting fungus. *Curr Sci* 79 (11), 1548-1554.
- Smith, S.E. & Smith, F.A. (1990). Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytol* 114, 1-38.
- Somssich, I.E. & Hahlbrock, K. (1998). Pathogen defence in plants – paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci* 3 (3), 86-90.
- Somssich, I.E. (2003). Closing another gap in the plant SAR puzzle. *Cell* 113(7), 815-816.
- Song, JT, Lu, H. und Greenberg, J.T. (2004). Divergent roles in *Arabidopsis thaliana* development and defense of two homologous genes, *ABERANT GROWTH AND DEATH2* and *AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEINI*, encoding novel aminotransferases. *Plant Cell* 16, 353-366.
- Sreenivasulu, N., Altschmied, L., Panitz, R., Hähnel, U., Michalek, W., Weschke, W. und Wobus, U. (2002). Identification of genes specifically expressed in maternal and filial tissues of barley caryopses: a cDNA array analysis. *Mol Genet Genomics* 266, 758-767.
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y. und Lehmann, C.C. (1998). Jasmonate signalling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J* 15, 747-75.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. und Métraux, J.-P. (1997). Systemic Acquired Resistance. *Annu Rev Phytopathol* 35, 235-270.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M. und Lappi, D.A. (1992). Ribosomen-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10, 405-412.
- Surpin, M. & Raikhel, N. (2004). Traffic Jams Affect Plant Development and Signal Transduction. *Nature Rev, Mol Cell Biol* 5, 100-109.
- Sutter, J.-U., Campanoni, P., Blatt, M.R. und Paneque, M. (2006). Setting SNAREs in a Different Wood. *Traffic* 7, 627-638.

- Takahashi, K., Kasai, K. und Ochi, K. (2004). Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants. *Proc Natl Acad Sci* 101(12), 4320-4324.
- Thatcher, L.F., Anderson, J.P. und Singh, K.B. (2005). Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Func Plant Biol* 32, 1-19.
- Thordal-Christensen, H., Gregersen, P.L. und Collinge, D.B. (1999). The barley/*Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. In *Mechanisms of resistance to plant diseases.*, A. Slusarenko, R. Fraser, und K. van Loon, eds. (Kluwer Academic Publishers), pp. 77-100
- Ton, J., ce Vol, M., Robben, C., Buchala, A., Métraux, J.-P., van Loon, L.C. und Pieterse, C.M.J. (2002). Characterization of *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. *Plant J* 29(1), 11-21.
- Tuominen, H., Overmyer, K., Keinänen, M., Kollist, H. und Kangasjärvi, J. (2004). Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. *Plant J* 39, 59-69.
- van der Biezen, E.A., Sun, J., Coleman, M.J., Bibb, M.J. und Jones, J.D.G. (2000). *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl Acad Sci* 97(7), 3747-3752.
- van Loon, L.C. & van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55, 85-97.
- van Wees, S.C.M., Chang, H.-S., Zhu, T. und Glazebrook, J. (2003). Characterization of the Early Response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* Infection Using Expression Profiling. *Plant Physiol* 132, 606-617.
- Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Bütchorn, B. und Franken, P. (1999). *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. *Appl Env Microbiol* 65, 2741-2744
- Varma, A., Singh, A., Sudha, Sahay, N.S., Sharma, J., et al. (2000). *Piriformospora indica*: An Axenically Culturable Mycorrhiza-Like Endosymbiotic Fungus. *The Mycota IX*, Fungal Associations Hock (ed.) (Springer-Verlag Berlin Heidelberg) pp. 125-150.
- Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Bütchorn, B. und Franken, P. (1989). *Piriformospora indica*, gen. Et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*, 90(5), 896-903.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, et al. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci* 102 (38), 13386-13391.
- Wasternack, C. & Parthier, B. (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci* 2(8), 302-307.

- Watanabe, N. & Lam, E. (2006). Arabidopsis Bax in inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J* 45(6), 884-894.
- Weiss, M., Selosse, M.-A., Rexer, K.-H., Urban, A. und Oberwinkler, F. (2004). *Sebacinales*: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential *Mycol Res* 108 (9), 1003-1010.
- Wolucka, B.A., Goossens, A. und Inzé, D. (2005). Methyl jasmonate stimulates the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *J Exp Bot* 56(419), 2327-2538..
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. und Turner, J.G. (1998). *COII*: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280, 1091-1094.
- Yamada, A., Tsutsumi, K., Tanimoto, S. und Ozeki, Y. (2003). Plant RelA/ApoT Homolog Confers Salt Tolerance in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell Physiol* 44(1), 3-9.
- Yano, D., Sato, M., Caito, C., Sato, M.H., Morita, M.T. und Tasaka, M. (2003). A SNARE complex containing SGR/AtVAM3 and ZIG/VTI11 in gravity-sensing cells is important for *Arabidopsis* shoot gravitropism. *Proc Natl Acad Sci* 100(14), 8589-8594.
- Zheng, H., Fischer von Mollard, G., Kovaleva, V., Stevens, T.H. und Raikhel, N.V. (1999). The Plant Vesicle-associated SNARE AtVTI1a Likely Mediates Vesicle Transport from the *Trans*-Golgi Network to the Prevacuolar Compartment. *Mol Biol Cell* 10, 2251-2264.
- Zhou, N., Tootle, T.L., Tsui, F., Klessing, D.F. und Glazebrook, J. (1998). *PAD4* functions upstream from salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1021-1030.
- Zimmermann, G., Bäumlein, H., Mock, H.-P., Himmelbach, A. und Schweizer, P. (2006). The Multigene Family Encoding Germin-Like Proteins of Barley. Regulation and Function in Basal Host Resistance. *Plant Physiol* 142, 181-192.

## 8 ANHANG

**Tab. A1: Liste der verwendeten Primer**

Aufgelistet sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer, deren Sequenz und *annealing*-Temperatur sowie die Organismen, für deren Material sie eingesetzt werden können. Die Nummern hinter den Primernamen geben die Stock-Nr. an (sofern vorhanden).

Gen	Primer	Organism	5' – 3' Sequenz	T [°C]
UBIQUITIN	HvUbi60deg_for	<i>Hv, Ta</i>	ACC CTC GCC GAC TAC AAC AT	60
	HvUbi60deg_rev	<i>Hv, Ta</i>	CAG TAG TGG CGG TCG AAG TG	60
PRI-Vorstufe	Ta_GBN004 L23for	<i>Hv, Ta</i>	CAG AGC TAC GCC AAC CAG AG	56
	Ta_GBN004 L23rev	<i>Hv, Ta</i>	GGC TCG TAG TTG CAG GTG AT	56
OPT6	PI006	<i>Hv, Ta</i>	TCA TCG GCC TTC TCG CAG AT	64
	PI006	<i>Hv, Ta</i>	TTG AGG TCG TCG GAG ATC CA	64
ARP	003_E06_5' [77]	<i>Hv, Ta</i>	GCA ACC ACC GCT AAA GAA GA	57, 52
	003_E06_3' [78]	<i>Hv, Ta</i>	CCA CCC ACA CGA GAG AAT TT	57, 52
GRP	001-J10_5' [58]	<i>Hv, Ta</i>	GGT GCA AGA TGT CAC AAT GG	57
	001-J10_3' [59]	<i>Hv</i>	GGC ACA CAG ATC TTC TCA TGT T	58
	Ta_glyri3' [105]	<i>Ta</i>	TCA AAG CCC ACT TAC AAT TT	51
CLATHRIN	004_A01_5' [73]	<i>Hv, Ta</i>	ACA CCA ATG AAG CTG TGA GG	57
	004_A01_3' [74]	<i>Hv</i>	TGC AAA ACG GTA TTT TTC CTT C	55
	Ta_clath3' [103]	<i>Ta</i>	TGG CAC AAA AGG AAA TAA AA	50
RelA	001_D10_5' [56]	<i>Hv</i>	AGT TGC GAT TTC CTC CAC AC	57
	001_D10_3' [57]	<i>Hv, Ta</i>	ACA CGT GCA GTT GGT ACC TG	59
	Ta_RelA5' [104]	<i>Ta</i>	AAC CTC CAC CCT GAC ATC TG	59
vSNARE11	003_B03_5' [64]	<i>Hv, Ta</i>	TGT GAG ATC AAG AGG GTC TCG	59
	003_B03_3' [65]	<i>Hv</i>	GAA TGG CTC AGG GGA AGA AG	59
	Ta_snare3' [101]	<i>Ta</i>	GGC AAG TGT CGC TAT ACA TC	57
DIM1	003_B08_5' [66]	<i>Hv, Ta</i>	TGG CAA TGA AAG ACA AGC AA	53
	003_B08_3' [66A]	<i>Hv</i>	GGT CTG TTT TCC CAG TCA TAC C	56
	Ta_Dim3' [102]	<i>Ta</i>	TCC TGT TTC AAA GGG TTA CA	53
mr-TF	003_O17_5'	<i>Hv, Ta</i>	GAG CAA CCA GAG TGT CAT GG	56
	003_O17_3'	<i>Hv, Ta</i>	CGA TCC TGA CAG CTT GAA CC	56
ANKYRIN	001_G02_5'	<i>Hv, Ta</i>	ATC ATC ACC CCT GAC AGC TC	56
	001_G02_3'	<i>Hv, Ta</i>	GGA GCA GGA CGT GTT CCT AT	56
SAP	004_A07_5'	<i>Hv, Ta</i>	GAT GGG CGC ATT ACA GAG AT	57
	004_A07_3'	<i>Hv, Ta</i>	TTA TGC TGC GAC GGA ACA C	56
JIP	004_B03_5' [75]	<i>Hv</i>	CCC GTG GAG TTT CAC CAG TA	59
	004_B03_3' [76]	<i>Hv</i>	CCC GAT CTT AGG AAA TGC AC	57
	Ta_jasmon_5' [206]	<i>Ta</i>	CAC AGC AAA GCA AGG CAT AA	56
	Ta_jasmon_3' [205]	<i>Ta</i>	AGG TTG TCG ACG AAG GTT TG	56
CRT3	5'-Calret_1 [50]	<i>Hv</i>	GCT GTG GGT TGC AAA TAA GG	57
	3'-Calret_1 [51]	<i>Hv</i>	AGC ACA TCG CTG ACC ATG TA	57
	Ta_CRT_5' [204]	<i>Ta</i>	GAA GGA TAC CGA ATC CAG CA	56
	Ta_CRT_3' [203]	<i>Ta</i>	GTT TCA TCG GCA ACC TGT TT	56
MAPK2	003_D20_5'	<i>Hv, Ta</i>	CAT GTG ACC AAC ATC TTG CAG	57
	003_D20_3'	<i>Hv, Ta</i>	TGA ATT CGC TTC AAC AGT TCT TT	57
put.	Hv_GBN003M19for	<i>Hv, Ta</i>	ATG CTG TTC CAG GTC CAA AG	56
CYANASE	Hv_GBN003M19rev	<i>Hv, Ta</i>	AAA GCC GCC AAT ATG ATG TC	56
T-DNA Insert	Lba1_5' [111]	<i>At</i>	TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G	57

<i>T-DNA Insert</i>	LBb1_lb_nest [112]	<i>At</i>	GCG TGG ACC GCT TGC TGC AAC T	57
<i>RelA</i>	RelA_LP [133]	<i>At</i>	CAG CAA CTC CTG ATC CAA AAG	57
	RelA_RP [134]	<i>At</i>	ACC AGA GAG TTT CAA TGG TGG	57
<i>vSNARE11</i>	v-SNARE11_LP [137]	<i>At</i>	TTG TCT GAA ATA AAA TCC GGG	57
	v-SNARE11_RP [138]	<i>At</i>	TAC GTG ACA CTT AGG CCG AAG	57
<i>vSNARE13</i>	v-SNARE13_LP [135]	<i>At</i>	AAA TGG GCA TTT GGT CTA GTG	57
	v-SNARE11_RP [136]	<i>At</i>	TGG AAT ATG GAA GTT TCA CCG	57
<i>MAPK</i>	MAPK1_LP [131]	<i>At</i>	AGA TGG TGA ATT GGT GAT GC	57
	MAPK1_RP [132]	<i>At</i>	GAT CAA CCA CAC ACC TGG AAC	57
<i>CLATHRIN</i>	Clathrin_LP [139]	<i>At</i>	ACC AAA GTC CAT CAT CTC GTC	57
	Clathrin_RP [140]	<i>At</i>	TTT CGC AGA ATA ATG CAA AGC	57
<i>2OG</i>	2OG_LP [145]	<i>At</i>	CAT CCC AAA GTC GAT GAT CAC	57
	2OG_RP [146]	<i>At</i>	GTT CTG GCC TGA TAT CTG CAG	57
<i>DAD2</i>	DAD2_LP [129]	<i>At</i>	AAA AGT AGC AGC AGC AGC AAC	57
	DAD2_RP [130]	<i>At</i>	TTC TCT CGT GTA TCG GGA CAG	57
<i>BI1</i>	BI-1_LP [189]	<i>At</i>	GCG ATA GCG TTT GTC TGT TTC	57
	BI-1_RP [190]	<i>At</i>	CGT TTG ACA AAA GGC TAA ACG	57
<i>GLP2A</i>	GLP2A_LP [165]	<i>At</i>	AAC GAG GAG CTT TTC CAA CTG	57
	GLP2A_RP [166]	<i>At</i>	TTT GCC ATA ATT GCT TTG GTC	57
<i>GLP4</i>	GLP4_LP [155]	<i>At</i>	TGC TTG CTT CTT ACG ACA AAA TC	57
	GLP4_RP [156]	<i>At</i>	TTT AAA TCA ATT TCA GTG GCT ACC	57
<i>GLP7</i>	GLP7_LP [167]	<i>At</i>	TTG CAG AAA AAC TCA ATT CGG	57
	GLP7_RP [168]	<i>At</i>	AAA CAT TGT GTT GCT TCT TCT G	57
<i>GLP6</i>	GLP6_LP [178]	<i>At</i>	TCT GTA AGG ATC CCA AGC AAG	57
	GLP6_RP [177]	<i>At</i>	TTT AGT GTT GAA ACC AAC GTC AG	57
<i>GLP8</i>	GLP8_LP [157]	<i>At</i>	GCA GCT TTG GTG TTT TGA AAC	57
	GLP8_RP [158]	<i>At</i>	GCA AAT GGT TAT CTC CAA TCA TC	57
<i>GLP10</i>	GLP10_LP [175]	<i>At</i>	CGA CGC GAT TTT TAG ACT TTC	57
	GLP10_RP [176]	<i>At</i>	TTC GGT TAA ACC AAG AAT TCT AGC	57
<i>PDR5-LIKE</i>	PDR5-like_LP [169]	<i>At</i>	AAG CAT CCA CTT CTG TGT CAG	57
	PDR5-like_RP [170]	<i>At</i>	TCT CTA GGA CAA AGC TTT TCC C	57
<i>PP1</i>	putper1_LP [171]	<i>At</i>	GTT TCA TGC GCT GAT CTT CTC	57
	putper1_RP [172]	<i>At</i>	AGA AAT AAA TAA GGG AAA GAA TAA CAT C	57
<i>PP2</i>	putper2_LP [173]	<i>At</i>	TAC TCA GGC ACA TGC CCT AAC	57
	putper2_LP [174]	<i>At</i>	AAT GTT ATC GAA CGC ATC AGG	57
<i>PER1</i>	PER1_LP [163]	<i>At</i>	GAG CGA GAA AGG AAA CGA GAG	57
	PER1_RP [164]	<i>At</i>	ACC TTG CTT CCG TGC TAT ATC	57
<i>CHIB1</i>	CHIB1_LP [179]	<i>At</i>	TTT GGC TAG CCA AAA TGG TAC	57
	CHIB1_RP [180]	<i>At</i>	AGC TCC TCA ATG TCC ATT TCC	57
<i>ABCtfp</i>	ABC-tfp_LP [159]	<i>At</i>	TAA TCA AGG AGC TAA GCC AGC	57
	ABC-tfp_RP [160]	<i>At</i>	ATA TCA CCG AAC TGT GAT GCG	57
<i>MDR</i>	MDR_LP [183]	<i>At</i>	TCC ATT ATT GCG AAA ATC GAG	57
	MDR_RP [184]	<i>At</i>	AAT GGC GTT ATC CTT CCA ATC	57
<i>EDR1</i>	edr1_LP [121]	<i>At</i>	AAA ACT CCT TGG TTC TTT GGC	57
	edr1_RP [122]	<i>At</i>	CTC GAT AAC CTC TGG GCT ACC	57
<i>JIN1</i>	jin1_LP [123]	<i>At</i>	GCA ACC GTC GTA TGA TTT CTC	57
	jin1_RP [124]	<i>At</i>	CTG CTA CTT CTT TCA CGA CGG	57
<i>COI1</i>	coi1_RP [125]	<i>At</i>	TTT TAA TCA CAT ATA AAG CAA CCA AAG	57
	coi1_LP [126]	<i>At</i>	TCA AAG TCT CAA GAT CAT CTG CTC	57



<i>AIMI</i>	aiml_LP [143]	<i>At</i>	GCT GCA GAG TGA ATC GAA ATC	57
	aiml_RP [144]	<i>At</i>	AGC AAG AAT GCA CAT ACA GCC	57
<i>Fg</i> -Nachweis	Fg16F [185]	<i>Fg</i>	CTC CGG ATA TGT TGC GTC AA	57
	Fg16R [186]	<i>Fg</i>	GGT AGG TAT CCG ACA TGG CAA	59

**Tab. A2: Expressionsdaten der *macroarray*-Analysen**

Hervorgehoben sind die mehr als 2,5-fachen Induktionen (↑, hellgrau hinterlegt) bzw. Repressionen (↓, dunkelgrau hinterlegt) der der mittels *cDNA-macroarray*-Analysen als differentiell identifizierten Klone in den drei durchgeführten Versuchen (2 biologische Wiederholungen mit cv. Nickel, 1 biologische Wiederholung mit cv. Maresi).

Expressionsdaten <i>macroarray</i> - Nickel (Versuch 1)								
Gen-Nr.	Vergleich 1		Vergleich 2		Vergleich 3		Vergleich 4	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
GNB001A01	3,12	0,32	0,00	259,62	1,03	0,97	0,01	85,95
GNB001D10	0,38	2,67	0,85	1,18	0,52	1,92	0,61	1,63
GNB001D12	0,24	4,22	0,59	1,71	0,34	2,97	0,41	2,42
GNB001E16	0,14	7,11	0,48	2,09	0,44	2,30	0,15	6,47
GNB001G02	0,35	2,86	1,07	0,94	0,41	2,47	0,92	1,08
GNB001H06	0,04	26,38	0,97	1,03	0,06	18,05	0,67	1,50
GNB001K24	0,09	10,75	0,67	1,49	0,15	6,75	0,42	2,38
GNB002A01	0,03	35,34	0,03	35,32	0,03	37,25	0,03	33,52
GNB002A02	1,53	0,66	0,35	2,89	0,75	1,34	0,71	1,41
GNB002C04	0,10	9,84	0,61	1,64	0,10	10,11	0,63	1,60
GNB002E18	0,19	5,24	0,85	1,18	0,35	2,87	0,46	2,15
GNB002G15	0,14	7,30	1,17	0,86	0,23	4,43	0,71	1,42
GNB002H15	0,03	38,64	2,48	0,40	0,07	14,10	0,90	1,11
GNB002H17	0,28	3,60	0,94	1,07	0,39	2,56	0,67	1,50
GNB002H21	0,11	9,17	1,10	0,91	0,23	4,28	0,51	1,95
GNB002H23	0,26	3,78	0,52	1,91	0,33	3,03	0,42	2,38
GNB002J19	0,09	10,60	1,08	0,93	0,22	4,47	0,46	2,20
GNB002K07	0,37	2,71	1,48	0,68	0,91	1,09	0,60	1,68
GNB002P07	0,68	1,48	3,98	0,25	2,21	0,45	1,22	0,82
GNB002P15	0,31	3,20	3,83	0,26	1,33	0,75	0,90	1,11
GNB003D18	0,32	3,13	0,59	1,68	0,39	2,55	0,48	2,07
GNB003D20	0,02	52,09	0,70	1,44	0,07	14,05	0,19	5,32
GNB003E06	2,06	0,49	33,17	0,03	0,85	1,17	80,12	0,01
GNB003E22	0,27	3,77	0,76	1,31	0,21	4,69	0,95	1,05
GNB003F19	0,08	12,78	0,41	2,42	0,16	6,20	0,20	4,99
GNB003H07	0,09	11,36	5,23	0,19	0,26	3,91	1,80	0,56
GNB003I10	0,86	1,17	3,24	0,31	1,02	0,98	2,72	0,37
GNB003J09	0,47	2,11	3,37	0,30	0,69	1,44	2,30	0,43
GNB003J10	0,73	1,36	3,14	0,32	1,04	0,96	2,23	0,45
GNB003K10	0,22	4,55	5,26	0,19	0,65	1,54	1,78	0,56
GNB003K14	0,24	4,25	1,20	0,84	0,30	3,30	0,93	1,08
GNB003N11	1,09	0,92	0,40	2,51	1,11	0,90	0,39	2,57
GNB003N12	0,31	3,27	6,77	0,15	0,99	1,01	2,09	0,48
GNB003O15	0,17	5,93	1,57	0,64	0,30	3,38	0,90	1,12
GNB003O20	0,03	35,97	4,38	0,23	0,07	14,67	1,79	0,56
GNB003P02	0,14	7,12	3,60	0,28	0,25	3,98	2,01	0,50
GNB004A02	2,33	0,43	0,41	2,43	1,10	0,91	0,87	1,15
GNB004A03	0,91	1,09	0,00	367,05	0,01	108,97	0,27	3,68
GNB004A07	0,36	2,75	0,28	3,52	0,35	2,85	0,29	3,39
GNB004B03	0,08	11,93	0,06	16,92	0,12	8,18	0,04	24,67
GNB004C05	0,38	2,64	0,76	1,31	0,42	2,35	0,68	1,47
GNB004G16	0,16	6,10	3,24	0,31	0,60	1,68	0,89	1,12
GNB004I17	0,05	20,41	0,46	2,19	0,15	6,53	0,15	6,84
GNB004I18	0,02	51,79	0,33	3,08	0,06	16,81	0,11	9,48
GNB004M16	0,76	1,32	3,03	0,33	1,17	0,85	1,97	0,51

## Expressionsdaten macroarray - Nickel (Versuch 2)

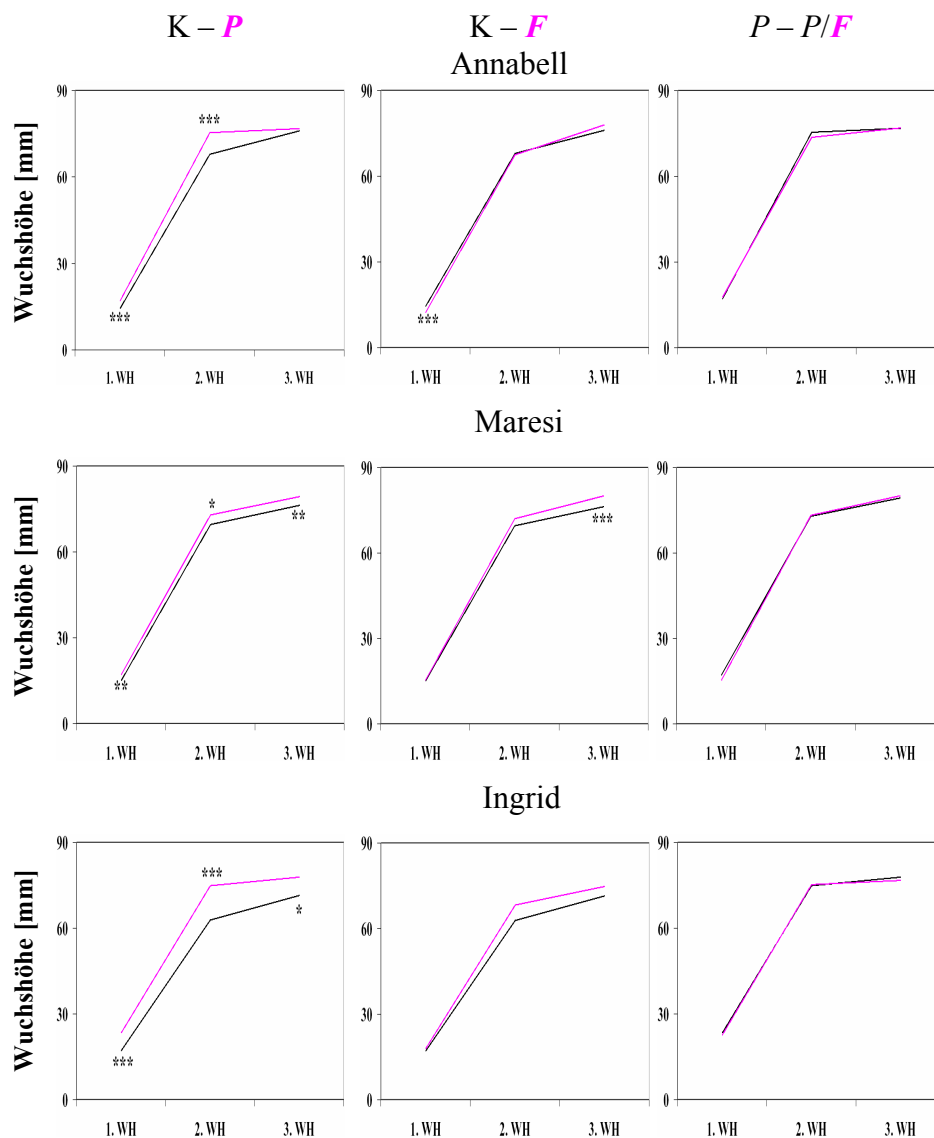
Gen-Nr.	Vergleich 1		Vergleich 2		Vergleich 3		Vergleich 4	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
GBN001C09	0,01	71,51	0,97	1,03	1,00	1,00	0,01	74,08
GBN001C13	35,91	0,03	0,97	1,03	35,03	0,03	0,99	1,01
GBN001D12	0,67	1,48	5,99	0,17	0,87	1,15	4,64	0,22
GBN001E16	0,13	7,96	8,26	0,12	0,39	2,59	2,69	0,37
GBN001F24	37,36	0,03	1,46	0,68	36,43	0,03	1,50	0,67
GBN001G02	0,22	4,59	1,62	0,62	0,29	3,49	1,23	0,81
GBN001G10	0,01	72,92	1,68	0,60	0,01	72,24	1,66	0,60
GBN001I17	0,55	1,82	31,04	0,03	2,53	0,40	6,73	0,15
GBN001J10	1,68	0,60	7,17	0,14	1,65	0,61	7,28	0,14
GBN001J24	10,56	0,09	9357,84	0,00	14,46	0,07	6834,77	0,00
GBN001K24	5,13	0,19	7062,68	0,00	12,97	0,08	2793,71	0,00
GBN001L08	44,35	0,02	1,25	0,80	44,35	0,02	1,25	0,80
GBN001O02	0,04	27,61	0,52	1,93	0,09	10,75	0,20	4,95
GBN002A01	42,60	0,02	4545,55	0,00	49,21	0,02	3934,22	0,00
GBN002A02	5,01	0,20	14,06	0,07	6,80	0,15	10,37	0,10
GBN002A18	1,05	0,95	902,64	0,00	1,03	0,97	925,16	0,00
GBN002B02	0,54	1,87	7,52	0,13	1,47	0,68	2,74	0,37
GBN002B18	1,05	0,95	476,43	0,00	1,03	0,97	488,32	0,00
GBN002C04	0,35	2,88	1,08	0,92	0,25	3,95	1,49	0,67
GBN002D18	7,84	0,13	95,82	0,01	12,75	0,08	58,96	0,02
GBN002E18	0,66	1,51	4,08	0,25	1,57	0,64	1,71	0,58
GBN002G15	0,87	1,15	47,02	0,02	2,00	0,50	20,54	0,05
GBN002H15	0,59	1,71	3,69	0,27	0,36	2,77	5,99	0,17
GBN002H21	5,97	0,17	56,06	0,02	4,09	0,24	81,71	0,01
GBN002I14	1,20	0,83	3,07	0,33	1,25	0,80	2,95	0,34
GBN002J19	2,62	0,38	13,20	0,08	1,52	0,66	22,73	0,04
GBN002K07	0,04	23,56	3,24	0,31	0,14	7,05	0,97	1,03
GBN002L11	2,77	0,36	7,57	0,13	2,22	0,45	9,44	0,11
GBN002P07	0,09	10,65	0,88	1,14	0,30	3,37	0,28	3,61
GBN002P15	0,67	1,48	0,71	1,41	0,17	5,87	2,79	0,36
GBN003A21	0,45	2,22	743,34	0,00	0,96	1,04	350,55	0,00
GBN003B02	2,13	0,47	4,79	0,21	1,25	0,80	8,20	0,12
GBN003B04	1,30	0,77	4,76	0,21	1,53	0,65	4,03	0,25
GBN003B06	7,56	0,13	58,72	0,02	6,29	0,16	70,56	0,01
GBN003B12	6,23	0,16	9,11	0,11	3,69	0,27	15,40	0,06
GBN003C07	3,63	0,28	88,54	0,01	3,09	0,32	104,06	0,01
GBN003D17	1,27	0,79	4,45	0,22	1,07	0,94	5,30	0,19
GBN003D20	1,16	0,86	4,45	0,22	1,63	0,61	3,17	0,32
GBN003E06	5,28	0,19	240,25	0,00	3,71	0,27	341,79	0,00
GBN003E22	3,41	0,29	4213,23	0,00	1,64	0,61	8746,67	0,00
GBN003F19	2,42	0,41	21,99	0,05	1,77	0,56	29,99	0,03
GBN003H07	0,03	37,11	1,21	0,83	0,03	31,10	1,01	0,99
GBN003I10	1,19	0,84	3,44	0,29	0,80	1,25	5,16	0,19
GBN003J09	0,88	1,13	3,83	0,26	0,30	3,28	11,10	0,09
GBN003J10	0,49	2,04	2,25	0,45	0,05	21,01	23,17	0,04
GBN003J11	0,55	1,80	3,06	0,33	0,42	2,40	4,07	0,25
GBN003K05	0,78	1,28	7793,60	0,00	0,86	1,17	7085,09	0,00
GBN003K10	0,37	2,72	1,18	0,85	0,22	4,53	1,96	0,51
GBN003K14	0,74	1,36	8,39	0,12	0,56	1,79	11,04	0,09
GBN003N12	5,38	0,19	1461,54	0,00	1,22	0,82	6441,55	0,00
GBN003O15	0,94	1,06	4,14	0,24	0,97	1,03	4,01	0,25
GBN003O20	2,62	0,38	12,41	0,08	0,64	1,56	50,85	0,02
GBN004A01	51,79	0,02	1,29	0,77	1,60	0,62	41,83	0,02
GBN004A02	1,96	0,51	3,35	0,30	0,27	3,73	24,47	0,04
GBN004A03	2,72	0,37	0,92	1,08	0,87	1,16	2,90	0,35
GBN004A07	0,47	2,13	0,30	3,29	0,42	2,36	0,34	2,97
GBN004B03	0,20	5,00	0,23	4,39	0,17	6,00	0,27	3,65
GBN004B19	1,08	0,93	2503,85	0,00	1,05	0,95	2566,32	0,00
GBN004C05	0,06	18,10	0,45	2,24	0,28	3,55	0,09	11,40
GBN004G16	1,62	0,62	193,52	0,01	1,64	0,61	191,52	0,01
GBN004I14	1,63	0,61	5,35	0,19	1,50	0,67	5,82	0,17
GBN004I18	0,12	8,04	15,79	0,06	0,27	3,75	7,36	0,14
GBN004M07	1,21	0,82	4,10	0,24	1,62	0,62	3,08	0,32
GBN004M16	0,87	1,15	5,14	0,19	0,40	2,47	11,09	0,09
GBN004M18	4,01	0,25	4,89	0,20	2,28	0,44	8,61	0,12
GBN004N06	399,60	0,00	0,90	1,11	399,60	0,00	0,90	1,11

## Expressionsdaten macroarray - Maresi

Gen-Nr.	Vergleich 1		Vergleich 2		Vergleich 3		Vergleich 4	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
GBN001A23	1,59	0,63	3,87	0,26	1,07	0,93	5,77	0,17
GBN001D12	6,59	0,15	7,28	0,14	14,74	0,07	3,25	0,31
GBN001D13	2,60	0,39	3,81	0,26	4,45	0,22	2,22	0,45
GBN001E18	7,75	0,13	3,39	0,30	4,40	0,23	5,96	0,17
GBN001F16	7,43	0,13	4,41	0,23	6,76	0,15	4,85	0,21
GBN001G02	23,81	0,04	4,39	0,23	54,07	0,02	1,93	0,52
GBN001H06	7,13	0,14	1,76	0,57	34,73	0,03	0,36	2,77
GBN001N10	3,39	0,29	4,26	0,23	5,72	0,17	2,53	0,40
GBN001N18	1,62	0,62	5,16	0,19	1,70	0,59	4,93	0,20
GBN001O20	1,57	0,64	3,67	0,27	0,96	1,04	5,96	0,17
GBN002A02	2,61	0,38	1,85	0,54	13,47	0,07	0,36	2,79
GBN002B01	2,55	0,39	1,90	0,53	11,72	0,09	0,41	2,42
GBN002B02	1,85	0,54	2,12	0,47	12,90	0,08	0,31	3,28
GBN002B05	4,14	0,24	8,05	0,12	19,93	0,05	1,67	0,60
GBN002C04	2,15	0,46	3,81	0,26	11,33	0,09	0,73	1,38
GBN002D18	11,10	0,09	28,61	0,03	8,81	0,11	36,07	0,03
GBN002E01	51,75	0,02	19,05	0,05	57,58	0,02	17,12	0,06
GBN002E02	2,09	0,48	2,28	0,44	5,41	0,18	0,88	1,13
GBN002E09	2,49	0,40	5,18	0,19	7,56	0,13	1,70	0,59
GBN002E18	364,92	0,00	443,27	0,00	322,43	0,00	501,68	0,00
GBN002E21	3,37	0,30	1,51	0,66	1,36	0,74	3,74	0,27
GBN002E22	3,08	0,32	5,01	0,20	1,83	0,55	8,45	0,12
GBN002F17	11,20	0,09	12,37	0,08	8,11	0,12	17,08	0,06
GBN002G15	4,36	0,23	4,61	0,22	4,44	0,23	4,53	0,22
GBN002G23	7,10	0,14	7,92	0,13	1,91	0,52	29,45	0,03
GBN002H15	5,69	0,18	18,71	0,05	6,20	0,16	17,17	0,06
GBN002H17	2,42	0,41	3,13	0,32	2,00	0,50	3,79	0,26
GBN002H20	3,44	0,29	6,90	0,14	2,31	0,43	10,29	0,10
GBN002H21	1,77	0,56	4,16	0,24	0,96	1,04	7,71	0,13
GBN002H23	2,77	0,36	4,88	0,20	1,20	0,83	11,26	0,09
GBN002J19	5,74	0,17	20,11	0,05	3,36	0,30	34,31	0,03
GBN002L07	2,58	0,39	3,36	0,30	3,82	0,26	2,28	0,44
GBN002L11	1,86	0,54	2,81	0,36	2,41	0,42	2,17	0,46
GBN002O18	2,72	0,37	12,78	0,08	3,38	0,30	10,27	0,10
GBN002P07	1,24	0,81	5,72	0,17	3,16	0,32	2,23	0,45
GBN003A02	2,90	0,34	3,06	0,33	8,49	0,12	1,05	0,96
GBN003B03	1,55	0,64	3,03	0,33	5,60	0,18	0,84	1,19
GBN003B04	1,24	0,80	3,05	0,33	7,73	0,13	0,49	2,03
GBN003B06	0,22	4,47	0,74	1,34	1,38	0,73	0,12	8,27
GBN003B08	1,57	0,64	3,80	0,26	4,63	0,22	1,29	0,78
GBN003C01	2,36	0,42	5,55	0,18	6,75	0,15	1,94	0,52
GBN003C06	2,34	0,43	4,66	0,21	5,79	0,17	1,88	0,53
GBN003D17	54,06	0,02	51,93	0,02	36,16	0,03	77,63	0,01
GBN003D18	2,02	0,50	3,84	0,26	1,95	0,51	3,99	0,25
GBN003D20	4,12	0,24	13,26	0,08	1,87	0,54	29,24	0,03
GBN003E22	10,08	0,10	21,45	0,05	4,23	0,24	51,15	0,02
GBN003F19	2,28	0,44	1,76	0,57	1,23	0,81	3,26	0,31
GBN003H07	6,97	0,14	9,30	0,11	20,16	0,05	3,22	0,31
GBN003I10	4,45	0,22	5,29	0,19	5,88	0,17	4,00	0,25
GBN003J07	3,35	0,30	3,49	0,29	5,16	0,19	2,27	0,44
GBN003J09	2,07	0,48	2,10	0,48	2,65	0,38	1,64	0,61
GBN003J10	21,68	0,05	19,03	0,05	29,53	0,03	13,97	0,07
GBN003K10	3,67	0,27	1,89	0,53	3,45	0,29	2,01	0,50
GBN003K14	14,41	0,07	44,54	0,02	16,15	0,06	39,73	0,03
GBN003L06	1,48	0,68	0,00	78744,30	0,00	38447,00	0,72	1,38
GBN003M02	5,11	0,20	2,11	0,47	12,76	0,08	0,85	1,18
GBN003M06	2,49	0,40	2,08	0,48	4,04	0,25	1,29	0,78
GBN003O17	3,91	0,26	4,86	0,21	3,91	0,26	4,85	0,21
GBN003O20	1,50	0,67	2,54	0,39	0,78	1,28	4,88	0,20
GBN003P02	7,39	0,14	4,62	0,22	29,94	0,03	1,14	0,88
GBN004A02	6,64	0,15	2,03	0,49	26,98	0,04	0,50	2,00
GBN004A07	2,46	0,41	3,32	0,30	17,92	0,06	0,46	2,19
GBN004B03	4,73	0,21	14,66	0,07	291,47	0,00	0,24	4,20
GBN004C18	1,95	0,51	2,64	0,38	1,68	0,59	3,06	0,33
GBN004E18	5,53	0,18	9,32	0,11	5,57	0,18	9,25	0,11
GBN004G01	5,39	0,19	4,57	0,22	16,01	0,06	1,54	0,65
GBN004G16	18,68	0,05	25,16	0,04	16,19	0,06	29,03	0,03
GBN004I02	6,88	0,15	3,21	0,31	13,74	0,07	1,61	0,62
GBN004I06	4,12	0,24	2,81	0,36	5,52	0,18	2,10	0,48
GBN004I17	3,16	0,32	6,92	0,14	2,51	0,40	8,71	0,11
GBN004I18	9,82	0,10	125,36	0,01	3,62	0,28	340,51	0,00
GBN004K02	6,70	0,15	4,50	0,22	30,11	0,03	1,00	1,00
GBN004M15	1,65	0,61	2,99	0,33	2,39	0,42	2,06	0,49
GBN004M16	2,26	0,44	20,41	0,05	3,24	0,31	14,25	0,07
GBN004M19	1,63	0,61	6,14	0,16	1,31	0,76	7,65	0,13

## ERTRAGSVERSUCH - II

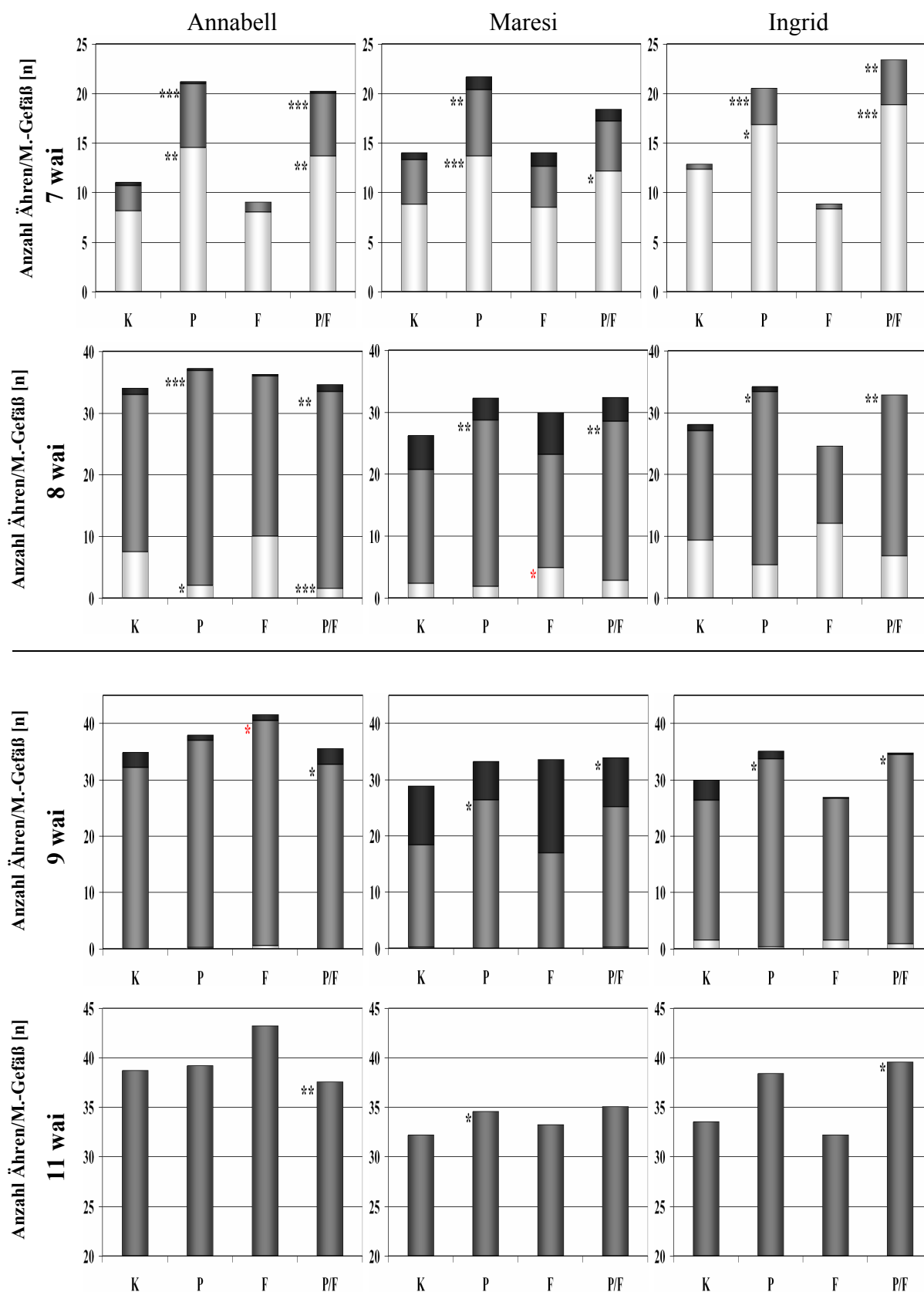
## Wuchshöhe



**Abb. A1: Wuchshöhen der verschiedenen Kultivare in Abhängigkeit der Infektion mit *P. indica* und/oder *F. graminearum*.**

Die Wuchshöhe der Pflanzen wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Zu den Zeitpunkten 6 und 8 Wochen nach Inokulation (wpi) wurde bis zum Fahnenblatt gemessen, zu den Zeitpunkten 10 bis zur Grannenspitze. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 36 Pflanzen. In dieser Abb. sind pro Kultivar drei Vergleiche dargestellt: In der ersten Spalte werden Kontrollpflanzen mit *Fg*-infizierten Pflanzen verglichen (K - *F*), Spalte zwei zeigt den Vergleich der Kontrollpflanzen mit *P. indica* (K - *P*) und die dritte Spalte zeigt den Vergleich *P* - *P/F*. Signifikante Unterschiede im jeweiligen Vergleich zu den einzelnen Zeitpunkten sind durch \* angezeigt (ungepaarter Student's t-Test, \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ , \*\*\* =  $P < 0,001$ ).

Entwicklung



**Abb. A2: Einfluss von *P. indica* und *F. graminearum* auf die Entwicklung in Gerste.**  
 Dargestellt sind die Entwicklungsstufen der Ähren in den drei untersuchten Kultivaren zu den Zeitpunkten 7, 8 und 9 Wochen nach Inokulation (wpi) mit *P. indica*. Darunter ist die Anzahl der Sprosse pro Gefäß 11 wpi abgebildet. Angegeben sind die Mittelwerte aus sechs Wiederholungen. 7 – 9 wpi sind folgende Klassen der Ährenentwicklung

dargestellt: Klasse 1: nur Grannen erkennbar (**hellgrau**), Klasse 2: Grannen und teilweise Korn sichtbar (**dunkelgrau**) und Klasse 3: vollständig entwickelte Ähre sichtbar (**schwarz**). Desweiteren sind die Anzahl der Sprosse/Gefäß 16 wai dargestellt. Signifikante Unterschiede bei den einzelnen Zeitpunkten sind durch \* angezeigt (ungepaarter Student's T-Test, \*= $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$ , \*\*\*= $P < 0,001$ ). Schwarz abgebildete Signifikanzen beziehen sich auf *P. indica*-bedingte Unterschiede (K – P bzw. F – P/F), rot abgebildete Sigifikanten beziehen sich auf *Fg*-bedingte Unterschiede (K – F bzw. P – P/F).

## DANKSAGUNGEN

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. K.-H. Kogel für die Bereitstellung des Themas sowie die langjährige freundliche Aufnahme am Institut.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Felle für die Übernahme des Referats und seine unkomplizierte Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Carin Jansen für ihre fachkundige und geduldige Betreuung insbesondere in ‚Ausnahmesituationen‘ meinerseits.

Bezüglich des Ertragsversuchs in Rauischholzhausen danke ich Beate für die unterhaltsamen Ausflüge und Gespräche sowie für die professionelle Einführung in die Geheimnisse von Excel. Bei Markus Kolmer und Mitarbeitern bedanke ich mich für die Betreuung der Pflanzen vor Ort, bei Herrn Prof. Dr. Dr. W. Friedt für die Möglichkeit, diese Versuche auf dem Versuchsgut durchführen zu können, und bei Dr. Jörn Pons-Kühnemann für seine Hilfe bei der Varianzanalyse.

Ein ganz lieber Dank geht an Martina, Gregor, Rebekka, Daggi, Holger, Petra, Bettina, Patrick, Elke, Sachin, Ruth, Frank und Ralph, die mir in verschiedenen Situationen tatkräftig zur Seite standen.

Ebenso bedanke ich mich bei meinen Büromitbewohnern Ingo, Alex und Steffie für ihren seelisch-moralischen Beistand vor allem während der letzten Wochen. Gleichmaßen ist das entspannende Wirken von Jutta hervorzuheben.

Für ein angenehmes Miteinander möchte ich mich weiterhin bei Christina, Jörg, Conny, Sebastian, Meike und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts bedanken.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung, indem sie mir stets sowohl eine offene Tür bieten, sobald ich einen Tapetenwechsel brauche, als auch vier offene Ohren, so dass ich mir alles von der Seele reden kann.

Schließlich möchte ich mich bei meinen langjährigen Freunden außerhalb des Instituts bedanken, mit denen ich viele fröhliche Stunden verbracht habe und auf die auch sonst immer Verlass ist.

Frank G.: Du holst dir meinen Dank bitte zu Hause ab! ;)

## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten**

Name	Sibylle von Rüden
Geburtstag	16. Mai 1977
Geburtsort	Lüdenscheid
Familienstand	ledig

### **Schulbildung**

1983-1987	Grundschule Brüninghausen
1987-1996	Geschwister-Scholl-Gymnasium Lüdenscheid

### **Studium**

10/1996	Beginn des Biologiestudiums an der JLU Gießen
08/2001-10/2002	Diplomarbeit bei Prof. Kogel am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der JLU Gießen Thema: Charakterisierung und Funktionsanalyse des chemisch induzierbaren Serin-Proteinaseinhibitors <i>Bci7</i> in <i>Hordeum vulgare</i> L.
11/2002-10/2006	Promotion am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der JLU Gießen