

**JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIEßEN**

Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie

**Untersuchung zum molekularen Mechanismus der  
chemisch Induzierten Resistenz  
in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gegenüber dem  
Echten Gerstenmehltaupilz  
(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 14.12.2005

vorgelegt von

Diplom-Biologin Bettina Kah

aus Koblenz

Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel

Prof. Dr. Aart J. E. van Bel

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Mayer



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Wirt-Pathogen-Interaktionen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Nichtwirt-Resistenz	2
1.1.2	Rassen-spezifische Resistenz	3
1.1.3	Induzierte Resistenz	5
1.1.3.1	SAR	5
1.1.3.2	Chemisch Induzierte Resistenz	8
1.1.4	SA-unabhängige Signaltransduktion	9
<b>1.2</b>	<b>Das Pathosystem Gerste-Echter Gerstenmehltaupilz</b>	<b>10</b>
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Pflanzenmaterial</b>	<b>15</b>
2.1.1	Pflanzenanzucht	15
2.1.2	Pathogene und Inokulation	17
2.1.3	Behandlung der Pflanzen	17
<b>2.2</b>	<b>Vektoren</b>	<b>18</b>
2.2.1	pGEM <sup>®</sup> -T	18
2.2.2	pGY-1	19
2.2.3	pCR <sup>®</sup> Blunt	20
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>20</b>
2.3.1	Southern Blot	21
2.3.1.1	DNA-Extraktion	21
2.3.1.2	DNA-Immobilisierung durch aufwärtsgerichteten Kapillartransfer	22
2.3.1.3	Sondenherstellung und Hybridisierung	22
2.3.2	Northern Blot	23
2.3.3	Western Analyse	23
<b>2.4</b>	<b>Transiente Transformation mittels Partikelbombardement</b>	<b>24</b>
2.4.1	Herstellung doppelsträngiger RNA	24
2.4.2	Vorbereitung und Beschichtung der <i>Microcarrier</i>	25
2.4.3	Mikroskopische Auswertung	26
<b>2.5</b>	<b>Präparation der <i>Dotblots</i></b>	<b>27</b>
<b>2.6</b>	<b>Hybridisierung von cDNA-Arrays</b>	<b>29</b>

2.6.1	Herstellung komplexer cDNA-Sonden.....	29
2.6.2	Hybridisierung mit komplexen cDNA-Sonden.....	32
2.6.3	Auswertung der Filter.....	32

### **3 ERGEBNISSE** **35**

---

#### **3.1 *Bci4*: Transgene Pflanzen**..... **35**

3.1.1	Nachweis des Transgens.....	35
3.1.1.1	PCR-Nachweis des Transgens.....	36
3.1.1.2	Western Analysen.....	37
3.1.1.3	Southern Analysen.....	39
3.1.2	Untersuchung des Resistenzverhaltens.....	39
3.1.2.1	Makroskopische Untersuchung der Resistenz.....	39
3.1.2.2	Mikroskopie und Northern Analyse.....	40

#### **3.2 Identifikation neuer chemisch induzierbarer Gene**..... **42**

3.2.1	Macroarray-Analysen.....	42
3.2.2	Dotblot Analysen.....	47
3.2.2.1	Behandlung mit BTH.....	47
3.2.2.2	Inokulation von IWe mit <i>Bgh</i> .....	49
3.2.2.3	Behandlung mit Methyljasmonat.....	50
3.2.3	Bestätigung der differentiellen Expression mittels <i>two step</i> RT-PCR.....	51

#### **3.3 Gen-Funktionsanalysen**..... **53**

3.3.1	Kandidatengene aus den Macroarray-Analysen.....	54
3.3.1.1	Funktionelle Charakterisierung einer Cysteinprotease -GAN003J15-.....	54
3.3.1.2	Funktionelle Charakterisierung eines Reticulon-ähnlichen Gens -GAN001D12-.....	56
3.3.1.3	Funktionelle Charakterisierung von GAN001K12.....	57
3.3.1.4	Funktionelle Charakterisierung von GAN001E14.....	58
3.3.1.5	Funktionelle Charakterisierung von GAN001L11.....	59
3.3.2	Funktionsanalysen weiterer Kandidatengene.....	60
3.3.2.1	Funktionelle Charakterisierung von <i>HvEds5</i> .....	60
3.3.2.2	Funktionelle Charakterisierung von <i>Bci2</i> .....	61
3.3.2.3	Funktionelle Charakterisierung von <i>Bci9</i> .....	64
3.3.2.4	Funktionelle Charakterisierung von <i>HvSgt1</i> in Abhängigkeit der chemisch Induzierten Resistenz.....	65

<b>4 DISKUSSION</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Untersuchung von <i>Bci4</i>-überexprimierenden Getreidepflanzen</b>	<b>67</b>
4.1.1 Nachweis des Transgens	69
4.1.2 Wirkung des Transgens auf die Resistenz gegen <i>Bgh/Bgt</i>	71
<b>4.2 Macroarray-Analysen zur Identifizierung neuer chemisch induzierter Gene</b>	<b>72</b>
<b>4.3 Dotblot Analysen zur Bestätigung chemisch induzierbarer Gene</b>	<b>76</b>
4.3.1 BTH-induzierbare Gene	76
4.3.2 Pathogenresponsivität der differentiell exprimiert identifizierten Gene	85
4.3.2.1 In der kompatiblen Interaktion mit <i>Bgh</i> induzierte Gene	86
4.3.2.2 In der kompatiblen Interaktion mit <i>Bgh</i> reprimierte Gene	86
4.3.3 MeJA-Responsivität der differentiell exprimiert identifizierten Gene	88
4.3.3.1 MeJA-induzierbare Gene	89
4.3.3.2 MeJA-reprimierte Gene	90
<b>4.4 Transiente Transformationsassays</b>	<b>91</b>
4.4.1 Cysteinprotease -GAN003J15-	92
4.4.2 Reticulon-like -GAN001D12-	93
4.4.3 GAN001K12	93
4.4.4 GAN001E14	94
4.4.5 GAN001L11	95
4.4.6 <i>Eds5</i> : MATE-Transporter	95
4.4.7 <i>Bci2</i> : Thionin	96
4.4.8 <i>Bci9</i> : Apyrase	97
4.4.9 <i>Sgt1</i>	99
<b>4.5 Abschließende Betrachtungen</b>	<b>100</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>103</b>
<b>6 SUMMARY</b>	<b>104</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>105</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>121</b>

# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -33P-dCTP	<sup>33</sup> Phosphor markiertes Deoxycytosintriphosphat
A. bide <sub>st</sub> <sub>DEPC</sub>	destilliertes Wasser behandelt mit Diethylpyrocarbonat
A. bide <sub>st</sub>	destilliertes Wasser
Acc. Nr.	Accession Nummer
A. thaliana	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
BCI/Bci	<i>barley chemical induced</i>
Bgh	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>
Bgt	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>
BTH	Acibenzolar-S-Methylester; Benzothiadiazol-S-Methylsäure; Bion <sup>®</sup>
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Calciumnitrat
Ci	Curie; 1 Ci = 3,7 x 10 <sup>10</sup> Zerfälle pro Sekunde
cIR	chemisch induzierte Resistenz
coil	<i>coronatine insensitive 1</i>
cv.	Kultivar
DCINA	2,6-Dichlorisonicotinsäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
eds1/5	<i>enhanced disease resistance 1/5</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ein2	<i>ethylene insensitive 2</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
ET	Ethylen
et al.	und andere
f. sp.	forma specialis
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
hai	<i>hours past inoculation</i> ; Stunden nach Inokulation
hat	<i>hours after treatment</i> ; Stunden nach Behandlung
HR	Hypersensitive Reaktion
hyg <sup>R</sup>	Hygromycinresistenzgen
ICS	Isochorismatsynthase
IR	Induzierte Resistenz
IWt	Ingrid Wildtyp; anfälliges Gerstenkultivar
IWe	Ingrid Weihenstephan; <i>Mlg</i> -tragendes Gerstenkultivar
kan <sup>R</sup>	Kanamycinresistenzgen
kb	Kilobasen

kD	Kilo-Dalton
M	molar
MATE	multidrug and toxin extrusion
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MeJA	Jasmonsäure-Methylester
<i>npr1</i>	<i>non-expresser of Pr-genes</i>
<i>pad4</i>	<i>phytoalexin deficient 4</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> ; pathogen-assoziierte Molekülmuster
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
<i>Pr</i>	pathogenesis related
PE	Penetrationseffizienz
pv.	Pathovar
<i>Rar</i>	<i>required form mla-mediated resistance</i>
R-Gen	Resistenzgen
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
SA	Salicylsäure
SAR	systemisch induzierte (oder aktivierte) Resistenz
Tab.	Tabelle
<i>Tr</i>	humaner Thyroid Rezeptor
u	<i>unit</i> = willkürlich festgelegte Einheit der Enzymaktivität
WG	wasserdispergierbares Granulat; Leerformulierung von BION®
w/v	Gewicht pro Volumen



---

# 1 Einleitung

Die Versorgung der ständig wachsenden Weltbevölkerung mit Nahrungsmitteln wird auch in Zukunft enorme Probleme aufwerfen. In den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts entsprach der Zuwachs in der Lebensmittelproduktion etwa dem Bevölkerungswachstum. In den letzten Jahren konnten die maximal möglichen Erträge im Reis- und Maisanbau auf optimalen Flächen jedoch nicht weiter erhöht werden, während die Bevölkerungszahl weiterhin stark ansteigt (CONWAY und TOENNIESSEN, 1999; GELDERMANN und KOGEL, 2002). Da zusätzlich jährlich etwa 1 % der landwirtschaftlich genutzten Flächen durch Versalzung, Bodenerosion etc. verloren gehen (OERKE et al., 1994), ist es von größter Bedeutung, die zur Verfügung stehenden Flächen effektiv und ressourcenschonend zu bewirtschaften. Neben konventionellen Pflanzenschutzmaßnahmen muss in zunehmendem Maße Wert auf alternative Pflanzenschutzkonzepte, wie eine Verbesserung des natürlichen Resistenzpotentials der Pflanzen, gelegt werden. Dafür ist es entscheidend die Grundlagen der natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanzen zu verstehen und zu verstärken. Durch gentechnische Veränderung von Nutzpflanzen könnte es in Zukunft möglich sein, bislang nicht oder nur bedingt landwirtschaftlich nutzbare Flächen, wie z. B. stark salzhaltige Böden, nutzen zu können und damit die potentiellen Anbauflächen stark zu vergrößern.

## 1.1 Wirt-Pathogen-Interaktionen

Pflanzen sind gegenüber einer Vielzahl von potentiellen Krankheitserregern resistent. Nur einem sehr kleinen Teil der Pathogene gelingt eine erfolgreiche Etablierung und Vermehrung auf der befallenen Pflanze. Kann der Erreger seinen Lebenszyklus oder Teile davon auf der Pflanze vollenden und hat er dabei einen schädigenden Effekt, spricht man von einer kompatiblen Interaktion zwischen Erreger und Pflanze (BUCHANAN *et al.*, 2002). Wird das Pathogen frühzeitig gehemmt oder sogar abgetötet, gilt der Wirt als resistent und man spricht von einer inkompatiblen Interaktion. Ein Sonderfall ist die so genannte Toleranz, bei der die Pflanze trotz massiven Befalls keine wesentlichen Schädigungen aufweist (SCHLÖSSER, 1997).

So genannte Elicitoren dienen als Auslöser für eine Immunantwort in Pflanzen. Diese Elicitoren sind einerseits Oberflächenmoleküle des Pathogens oder werden von diesem sekretiert. Andererseits werden während der Wirt-Pathogen-Interaktion, z. B. durch hydrolytische Enzyme, Bruchstücke der Pathogen- oder der Pflanzenzellwand freigesetzt, die als Elicitoren wirken können.

In Wirbeltieren ist die Unterscheidung zwischen eigenen und nichteigenen Substanzen die Grundlage zur Aktivierung der angeborenen, nicht-adaptiven Resistenz („*innate immunity*“). Ähnlich wie Wirbeltiere besitzen Pflanzen die Fähigkeit pathogen-assoziierte Molekülmuster (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) zu erkennen und auf diese zu reagieren (FELIX *et al.*, 1999). PAMPs sind per Definition durch ihren mikrobiellen Ursprung charakterisiert: sie kommen im potentiellen Wirt nicht vor und sind meist unabdingbar für das Pathogen, wie pilzliche Mannane, bakterielle Lipopolysaccharide (NÜRNBERGER *et al.*, 2004) oder Flagellin (GÓMEZ-GÓMEZ und BOLLER, 2002).

Während man bei Wirbeltieren angeborene und erworbene Resistenz unterscheidet und dem Immunsystem spezialisierte Zellen wie Lymphozyten oder Makrophagen zur Verfügung stehen, muss jede einzelne Pflanzenzelle in der Lage sein, Pathogene zu erkennen und eine entsprechende Abwehrreaktion durchzuführen. Außerdem fehlt der Pflanze ein System zur klonalen Rekombination, das es den Wirbeltieren ermöglicht eine Vielzahl von Antigen-spezifischen Rezeptoren, den Antikörpern, zu generieren. Die Erkennung von generellen Elicitoren durch LRR-Rezeptor-Kinasen (siehe Kapitel 1.1.2) und die Signaltransduktion über MAP-Kinase-Kaskaden erinnert jedoch stark an die angeborene Resistenz bei Tieren (ASAI *et al.*, 2002).

### **1.1.1 Nichtwirt-Resistenz**

Die am weitesten verbreitete Form der Resistenz, die Pflanzen gegen die Mehrzahl von potentiell pathogenen Mikroorganismen schützt, ist die Nichtwirt- oder Basisresistenz. Diese Resistenzform ist dadurch gekennzeichnet, dass alle Genotypen einer Pflanzenart dauerhaft und vollständig resistent gegenüber allen Genotypen eines Pathogens sind (HEATH, 2000). Als erste Linie der Verteidigung dienen präformierte Barrieren, wie die Zellwand oder sekundäre Metabolite der Pflanze. Aber auch fehlende Voraussetzungen auf der Seite des Wirtes können eine erfolgreiche Besiedelung verhindern. Für den obligat biotrophen Echten Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Bgh*) konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des Wachses auf der Blattoberfläche einen Einfluss auf die Ausbildung eines Appressoriums hat (TSUBA *et al.*, 2002). Eine weitere wichtige Rolle in der Nichtwirt-Resistenz scheinen die Aktinmikrofilamente des Cytoskeletts zu spielen. Durch spezifische Inhibierung der Aktinpolymerisation können Nichtwirt-Interaktionen zu kompatiblen Interaktionen werden (KOBAYASHI, 1997). Dies zeigt, dass neben passiven auch aktive pflanzliche Mechanismen an der Nichtwirt-Interaktion beteiligt sind.

Die Erkennung von generellen Elicitoren kann weitere Abwehrmechanismen induzieren bzw. bereits vorhandene verstärken (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Es kann zur lokalen Verstärkung der Zellwand am Ort des Penetrationsversuchs kommen, was zur Ausbildung einer Papille führt (THORDAL-CHRISTENSEN *et al.*, 2000; ZEYEN *et al.*, 2002). Aber auch die Neusynthese von antimikrobiell wirkenden Substanzen, wie den Phytoalexinen, gehört zu den induzierbaren Abwehrmechanismen (KIRANKUMAR und CHOONG-MIN, 2004).

Kann das Pathogen diese ersten Hindernisse jedoch überwinden, kann es zur Ausbildung einer Hypersensitiven Reaktion (HR) kommen, einem schnellen programmierten Zelltod, der auf die infizierte Zelle bzw. auf das darunter liegende Mesophyllgewebe begrenzt ist. Diese Reaktion verhindert die erfolgreiche Etablierung des Pathogens und gleicht in Teilen dem programmierten Zelltod in Tieren. Da die abgestorbenen Zellen hohe Konzentrationen von antimikrobiellen Molekülen enthalten, können sie nicht als Eintrittspforte für opportunistische nekrotrophe Pathogene dienen (BUCHANAN *et al.*, 2002).

### **1.1.2 Rassen-spezifische Resistenz**

Im Laufe der Evolution konnte die Nichtwirt-Resistenz von einzelnen Genotypen eines Pathogens gebrochen werden. Nach dem von FLOR (1971) vorgeschlagenen Gen-für-Gen-Modell zeichnen sich virulente Pathogene durch den Besitz so genannter Pathogenesefaktoren aus, die es dem Pathogen erlauben die Nichtwirt-Resistenz zu umgehen oder auszuschalten. Diese Pathogenesefaktoren sind die Produkte von Virulenzgenen. Durch Koevolution kann es bei den nun suszeptiblen Wirtspflanzen zur Entwicklung von korrespondierenden Resistenzgenen (*R*-Gene) kommen, die eine erfolgreiche Erkennung des Pathogenesefaktors ermöglichen. Der Pathogenesefaktor wird durch die erfolgreiche Erkennung durch den Wirt zu einem spezifischen Elicitor und sein Gen zum Avirulenzgen. Das Fehlen oder das Vorhandensein eines nichtfunktionalen Resistenz- oder Avirulenzgens führt zur Kompatibilität. Da nur einzelne Genotypen einer Pflanze gegenüber bestimmten Genotypen des potentiellen Pathogens suszeptibel sind, spricht man von einer Rassen-spezifischen oder vertikalen Resistenz. Da diese meist monogen determiniert ist, kann sie meist schnell durch das Pathogen gebrochen werden (HEATH, 1991).

Ein einfaches Modell für die *R*-Gen-vermittelte Resistenz geht davon aus, dass es sich bei dem *R*-Gen-Produkt um einen Rezeptor zur spezifischen Erkennung des Avirulenz-Genproduktes handelt. Die Erkennung führt zur Aktivierung von *downstream*-Elementen, die zur schnellen Induktion von Abwehrmechanismen führen. Dafür spricht, dass die meisten bisher isolierten *R*-Gene eine NBS-LRR-Struktur aufweisen (MEYERS *et al.*, 1999). Sie

bestehen aus einer Nukleotidbindestelle (NBS) und einer Leucin-reichen Region (*leucine rich repeat*, LRR). Die LRR-Domäne besteht aus Leucin oder anderen hydrophoben Aminosäuren, die sich im Abstand von etwa 24 Aminosäuren wiederholen. Sie bilden den hydrophoben Kern des Proteins, während die übrigen variablen Aminosäuren die exponierte Oberfläche bilden, an der die Ligandenerkennung stattfindet (BUCHANAN *et al.*, 2002). Die Nukleotidbindestelle dient der Bindung von ATP oder GTP und besitzt regulatorische Funktion. Oft sind *R*-Gene in komplexen Loci codiert, so dass durch eine erhöhte Rekombinationsrate eine relativ hohe genetische Variabilität entsteht (ELLIS *et al.*, 2000). Viele Abwehrreaktionen während der *R*-Gen-vermittelten Resistenz unterscheiden sich nicht von denen der Nichtwirt-Resistenz. Auch hier kommt es u. a. zur Papillenbildung und zum Auftreten von HR.

*R*-Gene gehören zu den wichtigsten Komponenten der Pathogenerkennung in Pflanzen. Es konnte bereits eine Vielzahl dieser Gene aus verschiedenen Pflanzenspezies isoliert und charakterisiert werden (DANGL und JONES, 2001). Für *Rpm1*, ein *R*-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, wird jedoch eine andere Funktion als die eines Rezeptors postuliert. RPM1 interagiert mit RIN4, das durch die Interaktion mit AvrRpm1 und AvrB phosphoryliert wird und dann als Pathogenitätsfaktor in der Pflanze wirkt. Ein Modell von MACKAY *et al.* (2002) geht davon aus, dass RPM1 die Pflanze vor diesem Pathogenitätsfaktor „schützt“.

Eine weitere wichtige Komponente der *R*-Gen-vermittelten Resistenz ist *HvRar1* aus Gerste, die ursprünglich isoliert wurde, weil sie für die vollständige *Mla6*- bzw. *Mla12*-*R*-Gen-vermittelte Resistenz benötigt wird (*Rar* = *required for mla-mediated resistance*; SHIRASU *et al.*, 1999). HvRAR1 besitzt zwei Zink-bindende Domänen, CHORD I und CHORD II (Cystein- und Histidin-reiche Domäne I und II). Diese dienen der Protein-Protein-Interaktion. Durch den Verlust von HvRAR1 in Gerste kann es nicht mehr zur Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) und zur Ausbildung von HR kommen (SHIRASU *et al.*, 1999). Die genaue Funktion des Proteins ist jedoch bislang unklar.

AZEVEDO *et al.* (2002) führten einen *yeast-two-hybrid-screen* durch, um mögliche Interaktionspartner des homologen AtRAR1 aus *A. thaliana* zu identifizieren. In *A. thaliana* konnten zwei auf Aminosäure-Ebene sehr ähnliche Proteine identifiziert werden. Aufgrund ihrer Homologie zu einem Protein aus Hefe wurden sie als AtSGT1a und AtSGT1b bezeichnet. In Gerste wurde nur eine Kopie des Gens gefunden. Da beide *Sgt1*-Gene in *A. thaliana* eine höhere Homologie zueinander aufweisen als zu *HvSgt1* geht man davon

aus, dass es in *A. thaliana* erst vor relativ kurzer Zeit zu einer Genduplikation gekommen ist (AZEVEDO *et al.*, 2002).

In Hefe wird *Sgt1* für den Fortlauf des Ubiquitin-abhängigen Zellzyklus benötigt. In Gerste konnte gezeigt werden, dass HvSGT1 in Assoziation mit HvRAR1 oder mit dem SCF Ubiquitin E3 Ligase Komplex und dem COP9 Signalosom (AZEVEDO *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2002) vorliegt. Eine mögliche Rolle von SGT1 in Pflanzen könnte die Ubiquitinierung, also Markierung von Proteinen sein, die als negative Regulatoren der Resistenz wirken. Die Ubiquitinierung führt zur Degradation der Zielproteine durch das 26S Proteasom über den spezifischen SCF Komplex. Da eine Interaktion von SGT1 und RAR1 mit HSP90 gezeigt werden konnte, wird außerdem die Funktion der beiden Proteine als Cochaperone von HSP90 diskutiert (HUBERT *et al.*, 2003; SHIRASU und SCHULZE-LEFERT, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 2003).

Durch transienten *knock down* konnte gezeigt werden, dass *Sgt1* eine wichtige Funktion bei der Ausbildung der *Mla6*-spezifischen Resistenz gegenüber *Bgh* hat (AZEVEDO *et al.*, 2002). In *A. thaliana* konnte unter Verwendung verschiedener Mutanten gezeigt werden, dass SGT1 ebenso wie RAR1 zur RPP5-abhängigen Resistenz gegenüber *Peronospora parasitica* beiträgt (AUSTIN *et al.*, 2002). TAKAHASHI *et al.* (2003) konnten in einem *yeast-two-hybrid-screen* zeigen, dass sowohl RAR1 als auch SGT1 mit HSP90 (Heat Shock Protein 90), einem Chaperon interagieren, was auf eine mögliche Funktion von RAR1 und SGT1 als Cochaperone von HSP90 hindeutet.

### **1.1.3 Induzierte Resistenz**

Neben den bereits erwähnten präformierten Barrieren hat die Pflanze nach der Erkennung des Pathogens auch die Möglichkeit bestehende physikalische und chemische Barrieren verstärken oder induzierbare Abwehrmechanismen zu aktivieren.

#### **1.1.3.2 SAR**

Eine besondere Form der Induzierten Resistenz (IR) ist die Systemisch Aktivierte Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR). SAR wird natürlicherweise durch Pathogene verursacht, die eine nekrotische Reaktion der Pflanze hervorrufen, wobei eine lokale Infektion eine systemische Resistenz des gesamten Blattanteils der Pflanze bewirkt (ROSS, 1961). Diese Resistenzantwort ist durch eine lang anhaltende, breite Resistenz gegenüber viralen, bakteriellen und pilzlichen Infektionen charakterisiert.

SAR ist abhängig von der Akkumulation des Signalmoleküls Salicylsäure (SA; MALAMY *et al.*, 1990; MÉTRAUX *et al.*, 1990; UKNES *et al.*, 1993) und wird durch ein typisches Expressionsmuster von *Pr*-Genen (*Pr* = *Pathogenesis related*) charakterisiert (VAN LOON und VAN KAMMEN, 1970). Obwohl einige PR-Proteine antimikrobielle Wirkung *in vitro* aufweisen (VAN LOON und VAN STRIEN, 1999), ist ihre Rolle in der Abwehrreaktion nicht für alle PR-Proteine eindeutig geklärt, sie dienen aber als zuverlässige molekulare Marker für die Aktivierung der SAR (SCHULTHEISS *et al.*, 2003).

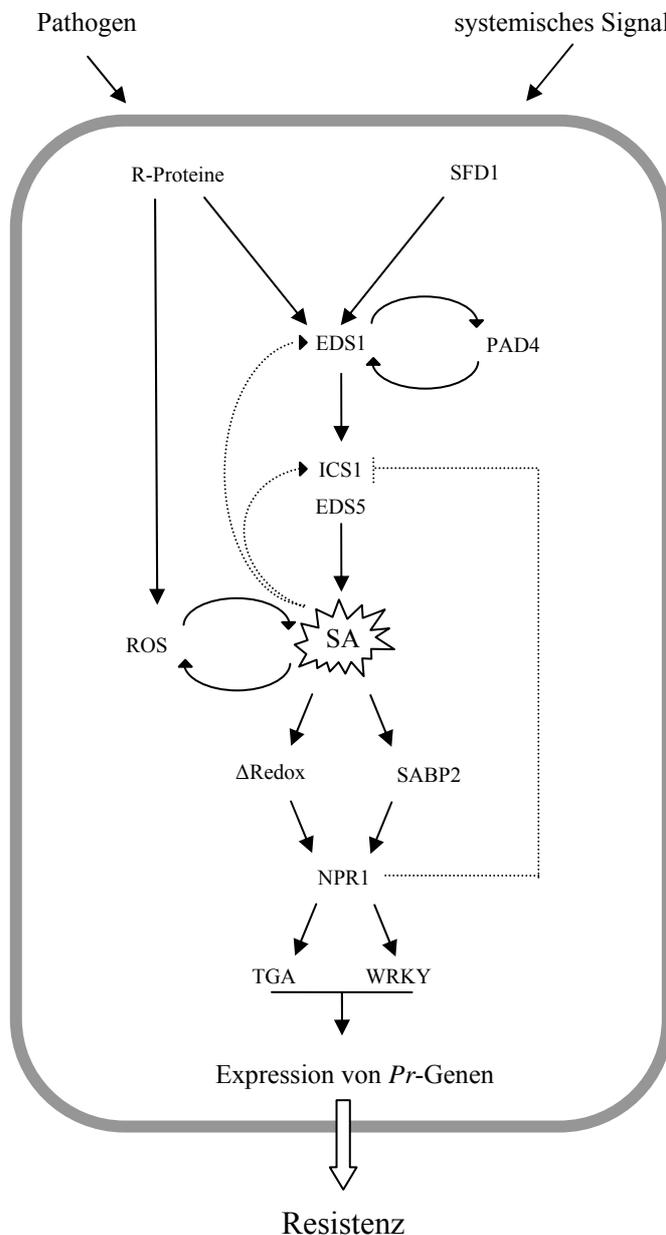
Mit Hilfe von verschiedenen Mutanten der Modellpflanze *A. thaliana* konnte der Signaltransduktionsweg der SAR bereits recht gut aufgeklärt werden. So wurden die Mutanten *pad4* (*phytoalexin deficient 4*) und *eds1* (*enhanced disease susceptibility 1*) bei der Suche nach suszeptiblen Mutanten identifiziert (GLAZEBROOK *et al.*, 1996; PARKER *et al.*, 1996). Beide Gene codieren für Lipase-ähnliche Proteine (FALK, *et al.*, 1999; JIRAGE *et al.*, 1999) und beeinflussen ebenfalls die Resistenz, die durch *R*-Gene eines bestimmten Typs vermittelt wird (FEYS *et al.*, 2001). EDS1 und PAD4 wirken *upstream* von SA, indem sie die Akkumulation von SA beeinflussen oder steuern (NAWRATH *et al.*, 2002).

Die Bedeutung von SA bei der Ausprägung der SAR konnte durch Verwendung transgener *nahG*-Pflanzen gezeigt werden. Sie exprimieren eine Salicylathydroxylase, die SA zu Katechol abbaut und damit eine Akkumulation verhindert. Transgene Tabak- und Arabidopsis-Pflanzen akkumulieren nach Pathogeninfektion weder SA noch PR-Proteine und sind somit in der Ausbildung der SAR beeinträchtigt (GAFFNEY *et al.*, 1993; DELANEY *et al.*, 1994). Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass der Verlust der Resistenz bedingt ist durch die Produkte, die beim Abbau von SA zu Katechol entstehen (VAN WEES und GLAZEBROOK, 2002).

Die Produktion der für die Ausprägung der SAR wichtigen SA findet über den Isochorismat-Stoffwechsel im Chloroplasten statt und nicht wie bislang angenommen über den Phenylpropanoidweg (WILDERMUTH *et al.*, 2001). WILDERMUTH *et al.* nehmen an, dass der Phenylpropanoidweg für die schnelle SA-Synthese, die mit HR assoziiert ist, verantwortlich ist, während der Isochorismat-Stoffwechsel für die anhaltende SA-Produktion während der Ausbildung der SAR zuständig ist. Eine Verstärkung des SA-Signals findet über eine positive Rückkopplung mit der Akkumulation von ROS statt (SHIRASU *et al.*, 1997).

Durch die SA-Akkumulation kommt es in *A. thaliana* und Tabak zur Änderung des Redoxpotentials der Zelle, was wiederum zu einer Konformationsänderung des NPR1-Proteins (*non-expresser of Pr-genes*) führt. Die Klonierung des Gens zeigte, dass es sich

um ein Protein mit Ankyrin-reichen Wiederholungen handelt, für das eine Rolle als Transkriptionsregulator postuliert wird (CAO *et. al.*, 1997).



**Abb 1.1: Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges der SAR in *A. thaliana*.**

Die Erkennung eines Pathogens durch R-Proteine bzw. die Perzeption eines bislang unbekanntes systemischen Signals über SFD1, einer Dihydroxyacetonphosphat-Reduktase, führt über PAD4 (*phytoalexin deficient 4*) und EDS1 (*enhanced disease susceptibility 1*) zur SA-Akkumulation. Diese ist abhängig von ICS1 (Isochorismatsynthase 1; SID2) und EDS5. Sie wird außerdem verstärkt durch eine positive Rückkopplung mit ROS, die durch Erkennung des Pathogens über R-Proteine verstärkt akkumuliert werden. Die SA-Akkumulation führt zur Änderung des Redoxpotentials der Zelle. Zusammen mit der Bindung von SA an das SA-bindende Protein 2 (SABP2) führt das zur Translokalisierung von NPR1 in den Kern. Die nachfolgende NPR1-, TGA und WRKY-Transkriptionsfaktor abhängige Expression von *Pr*-Genen und anderen resistenzassoziierten Genen führt zur Ausbildung der Resistenz.

(verändert nach DURRANT und DONG, 2004)

Im nichtreduzierten Zustand liegt NPR1 als hochmolekularer Proteinkomplex vor, während es durch Zugabe von reduzierendem DTT zur Monomerisierung kommt (DESPRÉS *et al.*, 2003; MOU *et al.*, 2003;). Die monomere Form wird in den Nukleus transportiert (KINKEMA *et al.*, 2000) und interagiert dort mit TGA Transkriptionsfaktoren (ZHANG *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 2000). Gemeinsam wirken sie als positive Regulatoren der Expression von zahlreichen Abwehrgenen. *npr1*-Mutanten können zwar SA akkumulieren, dieses Signal kann jedoch nicht perzipiert oder weitergeleitet werden (DELANEY *et al.*, 1995).

*npr1*-Mutanten sind außerdem hypersuszeptibel gegenüber Pathogenen und die Applikation von SA führt nicht zu einer Induktion von PR1, PR2 und PR5.

Eine weitere wichtige Komponente der SA-Signalkette ist EDS5. In der *eds5*-Mutante wird nach Pathogeninfektion keine SA akkumuliert (NAWRATH *et al.*, 2002). EDS5 codiert für ein Protein, das hohe Homologie zu MATE-Transportern (*multidrug and toxin extrusion*) aufweist. MATE-Transporter wurden zuerst in Bakterien identifiziert und pumpen antimikrobielle Substanzen im Austausch gegen Natrium-Ionen aus den Zellen (MORITA *et al.*, 1998). Sie könnten am Transport von SA oder einer phenolischen Vorstufe aus dem Plastiden beteiligt sein (MÉTRAUX, 2002). Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Signaltransduktionskette der SAR mit den bisher identifizierten beteiligten Genen.

Durch die relativ neue Methode der *Microarray*-Analysen können transkriptionelle Veränderungen, die z. B. während der SAR stattfinden oder durch Pathogeninfektion ausgelöst werden, in größerem Maßstab untersucht werden. MALECK *et al.* haben 2001 etwa 7000 verschiedene ESTs (*expressed sequence tag*) von *A. thaliana*, was etwa 25-30% der gesamten Gene entspricht, auf ihre Expression während der SAR, bzw. SAR-ähnlichen Bedingungen überprüft. 417 der überprüften ESTs zeigten nach mindestens zwei der 14 angewendeten SAR-auslösenden Behandlungen im Vergleich zur Kontrollbehandlung eine um den Faktor 2,5 veränderte Expression, was etwa 1,5 % der untersuchten ESTs entspricht. Durch *Cluster*-Analysen konnten sie zeigen, dass während der biologisch induzierten Resistenz Transkriptionsveränderungen ähnlich denen der frühen der Phase der chemisch induzierten SAR. Die spätere Phase der chemisch induzierten SAR entspricht transkriptionell der Expression der *cim*-Mutanten (*constitutive immunity*, BOWLING *et al.*, 1994) entspricht.

### 1.1.3.2 Chemisch Induzierte Resistenz

Bereits bevor die Rolle der SA bei der SAR erkannt wurde, zeigte WHITE (1979), dass die exogene Applikation von SA Resistenz erzeugt und die Expression von *Pr*-Genen induziert. Man nennt dieses Phänomen auch chemisch Induzierte Resistenz (cIR).

Später wurden die Funktionsanaloga von SA wie 2,6-Dichlorisonicotinsäure (DCINA) und Acibenzolar-S-Methylester (BTH) entdeckt (MÉTRAUX *et al.*, 1991; KUNZ *et al.*, 1997). Beide können die gleichen bzw. aufgrund ihrer geringeren Phytotoxizität sogar noch stärkere Effekte als SA auslösen. BTH wurde unter dem Namen BION<sup>®</sup> in Deutschland von Syngenta Agro GmbH (Maintal) als Resistenzaktivator vertrieben. Beide Resistenzak-

tivatoren besitzen *in vitro* keine antimikrobielle Wirkung, das heißt sie wirken nicht direkt toxisch auf das Pathogen.

Das Auftreten von biotisch auslösbarer SAR ist in Gerste und Weizen nicht eindeutig bewiesen, nur wenige Arbeitsgruppen beschrieben lokale und systemisch aktivierte Resistenzen verursacht durch vorhergehende Pathogeninokulationen (KESSMANN *et al.*, 1994; STICHER *et al.*, 1997). Zudem kommt es nach der Infektion von Gerste mit Echem Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh) nicht zu einer Akkumulation von SA (VALLÉLIAN-BINDSCHEDLER *et al.*, 1998; HÜCKELHOVEN *et al.*, 1999), was in dikotylen Pflanzen die Voraussetzung zur Ausbildung der SAR ist. Die Resistenzaktivierung von DCINA und BTH in Gerste und Weizen (KOGEL *et al.*, 1994; GÖRLACH *et al.*, 1996) konnte jedoch gezeigt werden. Deshalb scheint es in Getreide sinnvoller anstelle von SAR besser von cIR zu sprechen.

Durch subtraktive Suppressionshybridisierung konnten Gene identifiziert werden, deren Expression in Gerste durch den Resistenzinduktoren DCINA und BTH verändert wird (BEBER *et al.*, 2000). Neben bereits als chemisch induzierbar bekannten Genen wie Lipoxygenase (*Bci1*, VÖRÖS *et al.*, 1998) und Thionin (*Bci2*, GAUSING, 1987), konnten auch Gene identifiziert werden, deren Beteiligung an der cIR bis dahin nicht bekannt war, unter anderem Saure Phosphatasen (*Bci3* und *Bci6*), ein Serin-Proteinase-Inhibitor (*Bci7*) und eine Apyrase (*Bci9*).

#### **1.1.4 SA-unabhängige Signaltransduktion**

Im Modellorganismus *A. thaliana* spielen neben SA auch die Signalmoleküle Jasmonat (JA) und Ethylen (ET) eine wichtige Rolle im komplexen Signaltransduktionsnetzwerk, das die Abwehrreaktionen von Pflanzen gegenüber Pathogenen steuert. Allerdings spielen diese Moleküle im Gegensatz zu SA eher eine Rolle bei der Abwehr von nekrotrophen Pathogenen (HAMMOND-KOSACK und PARKER, 2003) bzw. sind beteiligt an der wundinduzierten und an der durch apathogene Rhizobakterien verursachten induzierten Resistenz (ISR, VAN LOON *et al.*, 1998).

Die Mutation eines F-Box-Proteins, das verantwortlich ist für die Ubiquitin-vermittelte Degradation von Proteinen, COI1 (*coronatine insensitive 1*, XIE *et al.*, 1998) blockiert den JA-Signaltransduktionsweg (FEYS *et al.*, 1994). Zur Blockade der ET-vermittelten Signalkaskade führt eine Mutation in *Ein2* (*ethylene insensitive 2*) einem Mitglied der Nrmp Familie der Metall-Ionen Transporter (ALONSO *et al.*, 1999). Beide Gene sind notwendig für die Abwehr-induzierte Expression eines Thionins (Thi2.1, EPPLE *et al.*, 1995), eines

Defensins (PDF1.2, PENNINGCKX *et al.*, 1996) und eines Hevein-like Proteins (HEL, PR4, NORMAN-SETTERBLAD *et al.*, 2000). Die Expression eines vegetativen Speicherproteins (VSP) ist jedoch nicht von ET, sondern nur von JA abhängig (NORMAN-SETTERBLAD *et al.*, 2000), was eine Interaktion der beiden Signaltransduktionswege nahe legt, jedoch nicht ihre vollständige Übereinstimmung.

Es gibt viele Hinweise, dass SA- und JA-Signaltransduktionsweg sich gegenseitig hemmen. Die Mutation der MAP Kinase 4 z. B. blockiert die JA-induzierbare Expression von PDF1.2 und bewirkt die konstitutive Aktivierung des SA-Signalweges (PETERSEN *et al.*, 2000). Das lässt zwei mögliche Schlussfolgerungen zu: die Blockierung der JA-Signalkette hebt die Suppression des SA-Signaltransduktionsweges auf oder aber seine Aktivierung blockiert die JA-Signalkette.

Da es jedoch Gene gibt, die sowohl durch SA als auch durch JA induziert werden können, postulieren SCHENK *et al.* (2000), dass SA und JA auch gemeinsam wirken können.

Zwischen den verschiedenen Signaltransduktionswegen gibt es also zahlreiche positive, aber auch negative Wechselwirkungen, die bislang nicht bis ins Detail aufgeklärt sind. Die Verflechtungen legen jedoch ein komplexes regulatorisches Netzwerk nahe, dass es der Pflanze ermöglicht auf verschiedene Pathogeneinflüsse differenziert zu reagieren.

## 1.2 Das Pathosystem Gerste-Echter Gerstenmehltaupilz

Die Gerste (*Hordeum vulgare*) gehört zu den ältesten Kulturpflanzen und nimmt nach Weizen, Reis und Mais den vierten Rang in der Weltgetreideproduktion ein. In den Industrieländern wird Sommergerste hauptsächlich zur Bierherstellung verwendet, während die proteinreichere Wintergerste als Viehfutter dient. Da die Gerste über ein diploides Genom mit 5,4 Milliarden Basen verfügt, ist sie im Gegensatz zum hexaploiden Weizen besser als genetisches Modell für monokotyle Nutzpflanzen geeignet.

In den gemäßigten Breiten gehört der *Bgh*, ein biotropher, filamentöser Ascomycet, zu den wichtigsten Krankheitserregern der Gerste. Das Schadbild des Echten Mehltaupilzes äußert sich in der Ausbildung von weißen Pusteln auf Blättern, Halmen und Ähren. Die Pusteln bestehen aus Pilzmyzel und Sporenträgern mit Konidiosporen, die der vegetativen Vermehrung des Pilzes dienen. Die Ausbreitung des Pathogens findet durch die Windverbreitung der Konidien statt. Die Ascosporen spielen für die Epidemiologie keine oder eine untergeordnete Rolle.

Der Infektionszyklus von *Blumeria graminis* beginnt mit der Landung einer Spore auf der Blattoberfläche. Etwa 15 Minuten später bildet sie einen primären Keimschlauch aus, der

ihrer Verankerung auf der Blattoberfläche und der Wasseraufnahme dient (KUNOH *et al.*, 1979; CARVER und BUSHNELL, 1983). Etwa drei Stunden nach der Inokulation kommt es zur Ausbildung eines appressorialen Keimschlauchs. Ungefähr 12 Stunden nach Beginn der Infektion ist das Appressorium voll ausgebildet und der Pilz versucht, ausgehend vom Appressorium, einen Penetrationskeil durch die pflanzliche Zellwand zu treiben. Nach erfolgter Penetration kommt es dann etwa 16 bis 20 Stunden nach der Inokulation zur Ausbildung eines Haustoriums mit fingerförmigen Ausläufern innerhalb der Epidermiszelle und zum Wachstum von sekundären Hyphen auf der Blattoberfläche. Das Haustorium dient der Ernährung des Pilzes und ist umgeben von der eingestülpten, noch intakten Cytoplasmamembran der Wirtszelle. Diese wird, da sie sich im Aufbau und in der Zusammensetzung von der normalen Cytoplasmamembran unterscheidet, als extrahaustoriale Membran bezeichnet (CUTLER *et al.*, 2000). Nach etwa fünf bis sieben Tagen ist der asexuelle Entwicklungszyklus des Pilzes abgeschlossen. Er bildet Konidienträger aus, von denen sich einzelne Konidien abschnüren, die durch den Wind verbreitet werden. (BECKHOVE *et al.*, 2000).

Die geschlechtliche Fortpflanzung von *Bgh* erfolgt in alternden Myzelien gegen Ende der Vegetationsperiode. Dabei bilden sich schwarzbraune dickwandige Kleistothecien, die Asci mit jeweils acht Sporen enthalten. Diese stellen zusammen mit Myzel auf Winter- und Ausfallgetreide die Überwinterungsform des Pilzes dar. Durch Wasseraufnahme werden die Kleistothecien gesprengt, die Ascosporen werden ausgeschleudert und können erneut auskeimen (AGRIOS, 1997; SCHLÖSSER, 1997).

Bereits während der Bildung des primären Keimschlauches durch den Pilz kommt es zu Cytoplasma-Aggregationen unterhalb des Keimschlauches, die zur Papillenbildung führen (BECKHOVE *et al.*, 1996; HEITEFUSS, 2001). Diese ist häufig nicht effektiv und wird vom Penetrationskeil des Pilzes durchdrungen. Resistente Pflanzen zeigen verschiedene Abwehrreaktionen, darunter die Ausbildung einer effektiven Papille, die das Eindringen des Pilzes in die Zelle verhindert (z. B. bei Pflanzen mit dem rezessiven R-Gen *mlo*), oder das aktive Absterben der attackierten Zelle bzw. des umliegenden Gewebes (HR, z. B. bei Pflanzen mit R-Genen vom *Mla*-Typ), so dass dem biotrophen Pilz die Ernährungsgrundlage entzogen wird.

Ein Vorteil dieses Pathosystems ist, dass man relativ leicht auf Einzelzell-Ebene die Unterscheidung zwischen kompatibler und inkompatibler Interaktion treffen kann. Auf dieser Grundlage wurde von NIELSEN *et al.* (1999) und SCHWEIZER *et al.* (1999) ein transienter Transformationsassay entwickelt. Ein Kandidatengen bzw. die doppelsträngige RNA eines

Kandidatengen wird zusammen mit einem Reportergen, z. B. GFP (grün fluoreszierendes Protein) via Partikelbombardement in Gersten-Epidermiszellen eingebracht. Ist das Reportergen in einer Zelle nachweisbar, wird in dieser Zelle mit hoher Wahrscheinlichkeit auch das Kandidatengen überexprimiert bzw. seine Expression durch den Mechanismus der RNA Interferenz stark vermindert. Bestimmt man nun die Penetrationsrate in den Zellen, die mit dem Kandidatengen beschossen wurden im Vergleich zu einer Kontrolle, kann man eine Aussage über die Beteiligung des Gens an der Resistenzausprägung machen.

Ein Nachteil dieses Pathosystems ist jedoch, dass es sich bei *Bgh* um ein obligat biotrophes Pathogen handelt, das nicht in axenischer Kultur gehalten werden kann und das nicht bzw. nur schwer transformierbar ist. Im Vergleich zu *Ustilago maydis*, dem Erreger des Maisbeulenbrandes (KRONSTAD, 2003), gibt es deshalb vom Pathogen *Bgh* kaum molekularbiologische Erkenntnisse.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die chemisch induzierte Resistenz in Gerste ist ein unter Laborbedingungen sehr gut etabliertes Instrument der Resistenzhöhung gegenüber *Blumeria graminis* f. sp. *graminis* (*Bgh*). Durch die Applikation chemischer Resistenzinduktoren wie DCINA oder BTH kann eine lang anhaltende, breit wirksame Resistenz von Getreide gegenüber verschiedenen Rassen des Pathogens erzeugt werden. Allerdings gibt es bei der Anwendung im Freiland noch Probleme mit der Effizienz dieser Resistenzinduktoren. Ziel dieser Arbeit ist, in Gerste die genetischen Grundlagen dieser Form der Resistenz genauer zu untersuchen.

Ein Fokus dieser Arbeit liegt auf der Identifizierung neuer chemisch induzierbarer Gene in Gerste. Dazu werden so genannte *Macroarrays* verwendet: Nylonmembranen, auf die 1536 PCR-Produkte verschiedener Genfragmente aufgebracht wurden. Durch Hybridisierung mit komplexen cDNA-Sonden kann die Wirkung einer bestimmten Behandlung auf die Expression dieser Gene untersucht werden. Die als differentiell exprimiert gefundenen Gene sollen zusammen mit bereits bekannten Genen sowohl aus Gerste, als auch aus anderen Pflanzen bezüglich ihres Einflusses auf die Resistenzausprägung der Gerste gegenüber *Bgh* untersucht werden. Zu diesen Genen gehören verschiedene chemisch induzierbare Gerstengene (*Bci*-Gene), sowie sequenzhomologe Gerstengene verschiedener an der SAR beteiligter Gene aus *A. thaliana*, wie *Eds5* und *Sgt1*. Der Einfluss der transienten Überexpression bzw. des transienten *knock downs* der verschiedenen Gene soll mittels Partikelbombardement untersucht werden.

Zur funktionellen Überprüfung des *Bci4*-Gens in Getreide stehen putativ stabil transgene T<sub>0</sub>-Gersten- und Weizenpflanzen zur Verfügung, die *Bci4* konstitutiv überexprimieren. Das Resistenzverhalten dieser Pflanzen, besonders gegenüber *Bgh*, untersucht werden, soll in Abhängigkeit ihres transgenen Status überprüft werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung von Genen, die an der Ausbildung der chemisch induzierten Resistenz ursächlich beteiligt sind. Dies führt zu einem besseren Verständnis der induzierten Resistenz in Getreide. Die Gene können als Kandidaten für stabile Transformationen dienen, mit dem Ziel einer deutlichen Erhöhung der Resistenz der Pflanzen gegenüber verschiedenen Pathogenen.



---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

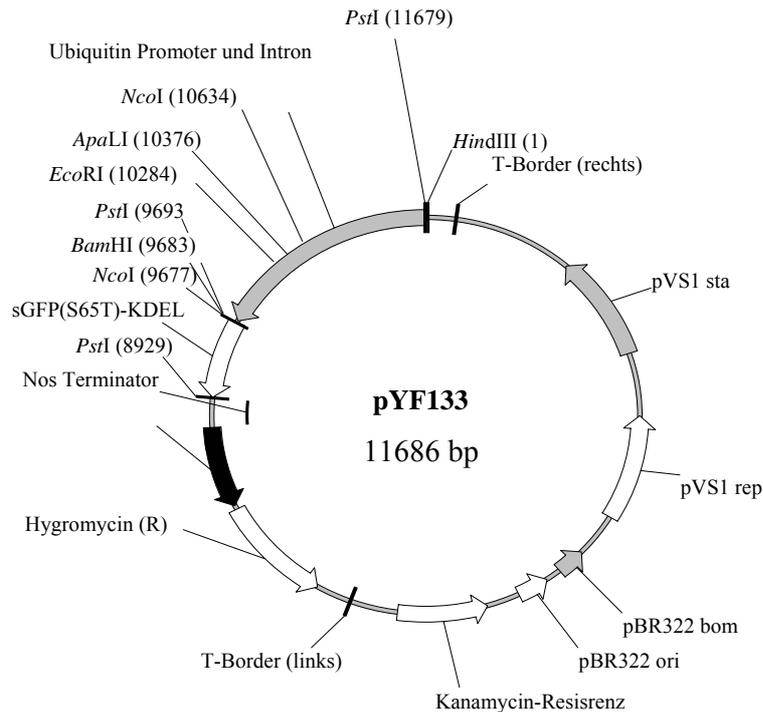
Bei den in dieser Arbeit verwendeten anfälligen Gerstensorten handelte es sich um Ingrid Wildtyp (IngridWt, zur Verfügung gestellt von James McKey, University of Uppsala, Schweden), Pallas (Lisa Munk, Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen, Dänemark) und Golden Promise (zur Verfügung gestellt von Fredi Altpeter, IPK Gatersleben). Die verwendeten anfälligen Weizensorten waren Kanzler (Saatzucht Engelen-Büchling oHG, Büchlingen/Oberschneiding) und Bobwhite (ebenso wie Golden Promise zur Verfügung gestellt von Fredi Altpeter, IPK Gatersleben).

Das verwendete transgene Saatgut wurde von Fredi Altpeter (IPK Gatersleben) generiert und zur Verfügung gestellt. Transformiert wurden die Gerstensorte Golden Promise mittels Agrobakterium-vermittelter Transformation und die Weizensorte Bobwhite durch Partikelbombardement. Die Abbildung 2.1 zeigt den Vektor pYF133, der zur Transformation von Gerste verwendet wurde.

Zur biolistischen Erzeugung von transgenem Weizen wurde der Vektor pJFnpt II (ALTPETER und XU, 2000) verwendet. Er enthält das Resistenzgen Neomycin Phosphotransferase (*npt II*) unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus *Zea mays*. Der Vektor wurde mit einem Konstrukt, das *Bci4* unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors (*nos*-Terminator) enthält, kotransformiert.

#### 2.1.1 Pflanzenanzucht

Gersten- und Weizenpflanzen, die für Expressionsstudien verwendet werden sollten, wurden für 48 Stunden auf einem feuchten Filterpapier in Petrischalen bei Raumtemperatur und im Dunkeln vorgekeimt. Einheitlich gekeimte Samen wurden in Einheitserde Typ ED 73 (Einheitserde- und Humuswerke Gebr. Patzer GmbH + Co. KG, Sinntal-Jossa) jeweils zu fünft in eine Reihe an den Rand des Topfes (Vierkanttopf 7x 7 cm, etwa 200 ml Topfvolumen) gelegt und mit einer dünnen Erdschicht bedeckt. Die Pflanzen wuchsen dann für weitere fünf Tage in einem Klimaschrank (Percival Scientific, CLF Laborgeräte, Emersacker, 16-18 °C, 50-60 % Luftfeuchte, 16 Stunden Lichtperiode mit ca.  $33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und wurden regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Pflanzen für den



**Abb. 2.1: Vektorkarte von pYF133.** Der Vektor pYF133 wurde für den Agrobakterium-vermittelten Gentransfer in Gerste verwendet. Die Modifikation des Vektors erfolgte indem *GFP* durch *Bci4* ersetzt wurde. Als Selektionsmarker dient das Gen Hygromycin B Phosphotransferase unter der Kontrolle des CaMV35S Promotors. Die Expression von *Bci4* wird durch den konstitutiven Ubiquitin-Promotor aus *Zea mays* gesteuert.

transienten Transformationsassay, die vor dem Beschuss mit Acibenzolar-S-Methylester (BTH, Syngenta; Maintal; siehe Kapitel 2.1.3) bzw. der Leerformulierung WG (wasserdispergierbares Granulat) behandelt wurden, wurden in 7x 7cm große Töpfe gepflanzt, während unbehandelte Pflanzen in 11x 11 cm großen Vierkantöpfen angezogen, wurden. Auf das Vorkeimen wurde in diesem Fall verzichtet, 30 bis 50 bzw. 100 bis 150 Körner wurden direkt in den Vierkantopf gegeben und bei höheren Lichtintensitäten ( $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bei 20 °C im VB1514 Klimaschrank der Firma Voetsch Industrietechnik, Balingen-Frommern angezogen. BTH- bzw. WG-behandelte Pflanzen wurden nach der Behandlung im Klimaschrank von Percival Scientific weiterkultiviert.

Für die Vermehrung der transgenen Pflanzen wurden die Körner wie oben beschrieben vorgekeimt und für etwa 14 Tage in kleinen Töpfen ( $\varnothing$  5,5cm) bei 16-18 °C, 50-60 % Luftfeuchte und  $33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. Dann wurden ein bis zwei Pflanzen in größere Töpfe ( $\varnothing$  21 cm) in Fruhstorfer Erde, Topferde Typ 3 (Archut Industrie-Erdenwerk GmbH & Co. KG, Lauterbach-Wallenrod) umgetopft und in einer Gewächshauskabine kultiviert (Temperatur  $\geq 18$  °C, da keine aktive Kühlung vorhanden war). Es wurde Wert darauf

gelegt die Vermehrung der Pflanzen im zeitigen Frühjahr zu beginnen, um in frühen Wachstumsstadien hohe Temperaturen zu vermeiden. Durch zusätzliche Beleuchtung wurden mindestens  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  erzeugt. Eine eventuelle Fremdbefruchtung wurde verhindert, indem die Einzelähren zu Beginn des Ährenschiebens in Tüten gesteckt wurden. Die Pflanzen wurden regelmäßig mit Leitungswasser gegossen.

### **2.1.2 Pathogene und Inokulation**

Der in dieser Arbeit verwendete Gerstenmehltaupilz, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*), Rasse A6, besitzt u. a. die zu den Resistenzgenen *Mlg* und *Mla12* korrespondierenden Avirulenzgene und wurde von Jörn Pons-Kühnemann, Institut für Biometrie, JLU Gießen, zur Verfügung gestellt. Bei dem verwendeten Weizenmehltaupilz, *B. graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*), handelte es sich um ein Feldisolat, das 1995 von Ulrich Beckhove (IPAZ Gießen) in Aachen isoliert wurde.

Die Erhaltung des Pilzes fand auf entsprechenden suszeptiblen Sorten, wie IngridWt bzw. Pallas oder Kanzler statt. Die Nachzucht des Pathogens erfolgte in Klimakammern (16-18 °C, 60 % relative Luftfeuchte, 16 h Lichtperiode mit ca.  $60 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ). Sieben Tage alte Pflanzen wurden unter einem Inokulationsturm inokuliert und konnten nach sieben Tagen zur erneuten Inokulation verwendet werden.

Zur Sondenherstellung wurden sieben Tage alte Gerstenkeimlinge mit etwa 20 Konidien pro  $\text{mm}^2$  Blattfläche inokuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Für makroskopische Untersuchungen wurde eine Sporendichte von etwa drei bis fünf Sporen pro  $\text{mm}^2$  verwendet. Alle Inokulationen wurden unter Verwendung eines Inokulationsturms durchgeführt.

### **2.1.3 Behandlung der Pflanzen**

Die Behandlung der Pflanzen mit Jasmonsäure-Methylester (MeJA) erfolgte durch *floaten* von Blattsegmenten sieben Tage alter Gerstenpflanzen auf MeJA-Lösung (45  $\mu\text{M}$ ) bzw. Leitungswasser (Kontrollbehandlung).

Für Kinetiken wurde 20 ppm BTH bezogen auf das Bodenvolumen über den Boden appliziert. Die Kontrollpflanzen wurden mit der entsprechenden Menge WG behandelt. Die Pflanzen wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach der Behandlung geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C aufbewahrt. Für die Untersuchung verschiedener Blattgewebe wurde zu verschiedenen Erntezeitpunkten die Epidermis der abaxialen Blattspreite von Gerstenprimärblättern abgezogen und getrennt vom restlichen Blattgewebe

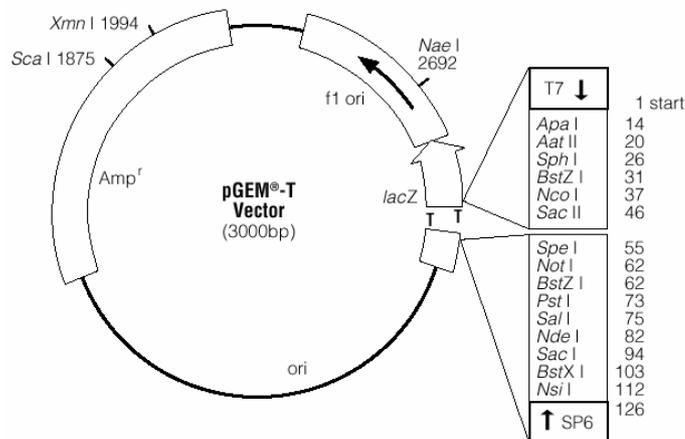
(Mesophyll und Epidermis der adaxialen Blattspreite) entsprechend eingefroren und aufbewahrt.

Für transiente Transformationsassays wurden die Pflanzen 48 Stunden vor dem Bombardement mit 60 ppm BION<sup>®</sup> behandelt.

## 2.2 Vektoren

### 2.2.1 pGEM<sup>®</sup>-T

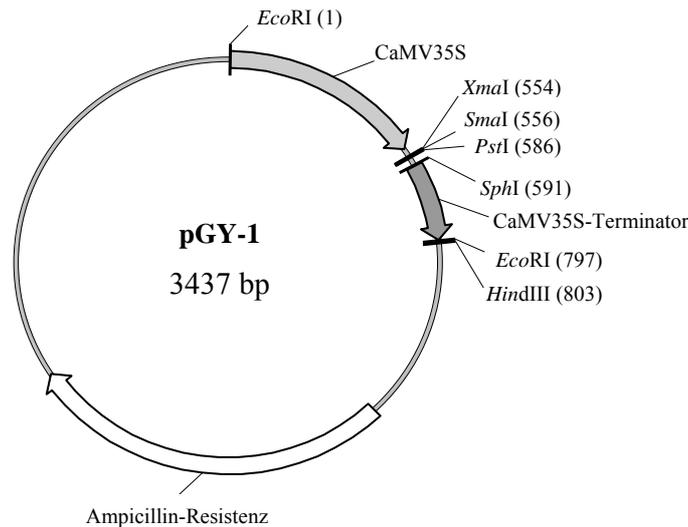
Dieser Vektor ist Bestandteil des Kits pGEM<sup>®</sup>-T Vector Systems von Promega, Madison, USA. Er ist besonders zur Klonierung von PCR-Produkten geeignet, weil er für T/A-Klonierungen eingesetzt werden kann. Er enthält ein  $\beta$ -Lactamase-Gen, das Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin verleiht und besitzt unter anderem zur Herstellung doppelsträngiger RNA (dsRNA; siehe Kapitel 2.4.1) jeweils auf einer Seite des Polylinkers einen Promotor für die RNA-Polymerasen SP6 bzw. T7. Die Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* (MCS) können für weitere Klonierungen verwendet werden. Abbildung 2.2 zeigt die Vektorkarte von pGEM<sup>®</sup>-T.



**Abb. 2.2:** Vektorkarte von pGEM<sup>®</sup>-T (Promega, Madison, USA). Dargestellt ist das Gen für Ampicillinresistenz ( $Amp^r$ ), das *lacZ*-Fragment und zwei Replikationsstartpunkte (*ori*). Rechts ist die MCS mit den vorhandenen Restriktionsschnittstellen schematisch dargestellt.

### 2.2.2 pGY-1

Der Vektor pGY-1 ist ein auf pUC18 basierender Pflanzentransformationsvektor (SCHWEIZER *et al.*, 1999). Die Selektion in Bakterien ist über Ampicillin möglich, da das entsprechende Resistenzgen vorhanden ist. Die Karte des Vektors ist in Abbildung 2.3 gezeigt.

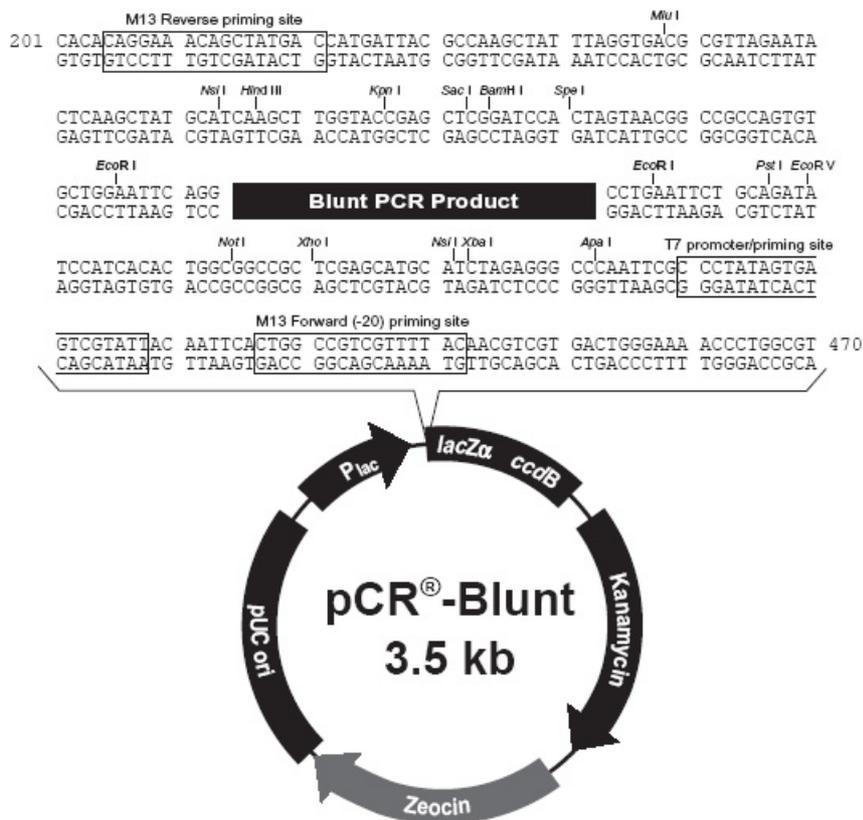


**Abb. 2.3:** Vektorkarte des Pflanzenexpressionsvektors pGY-1. Der Vektor besitzt einen CaMV35S-Promotor und -Terminator. Diese flankieren die MCS, die zum Einklonieren von Genen verwendet wird. Zur Selektion besitzt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen.

Das Plasmid enthält den konstitutiven 35S Promotor aus dem *Cauliflower mosaic virus* (CaMV35S) und den entsprechenden Terminator. In die MCS zwischen diesen beiden Elementen kann ein Kandidatengen kloniert werden. Zur Verwendung des Plasmids als Reporter im transienten *Assay* wurde anstelle des Kandidatengens das Gen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) einkloniert. Das Plasmid wurde von Patrick Schweizer, IPK Gatersleben, zur Verfügung gestellt.

### 2.2.3 pCR<sup>®</sup> Blunt

Der Vektor pCR<sup>®</sup> Blunt (invitrogen, Karlsruhe) wurde verwendet, um die für die *Macroarrays* isolierten cDNAs zu klonieren (siehe SCHÄFER, 2003). Die normalisierten cDNAs wurden über die *NotI*-Schnittstelle in den Vektor eingefügt. Die transformierten Bakterien wurden vom IPK Gatersleben als Glycerolstocks in HMFM-Medium (siehe Kapitel 2.8) zur Verfügung gestellt. Abbildung 2.4 zeigt die Vektorkarte von pCR<sup>®</sup> Blunt zusammen mit einem Teil der MCS-Sequenz.



**Abb. 2.4:** Vektorkarte des Vektors pCR<sup>®</sup>-Blunt (invitrogen, Karlsruhe). Das Plasmid enthält ein Kanamycinresistenzgen zur Selektion in Bakterien. Die cDNAs für die *Macroarrays* wurden über die *NotI*-Schnittstelle einliigert.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), Restriktionsverdau, Ligation, Plasmidpräparation etc. wurden falls nicht anders angegeben nach SAMBROOK *et al.* (1989) bzw. AUSUBEL *et al.* (1999) oder entsprechend der Herstel-

lerangaben durchgeführt. Im Folgenden werden nur spezielle Anwendungen detailliert beschrieben.

### **2.3.1 Southern Blot**

Als "*blotten*" bezeichnet man eine Technik, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Nukleinsäuren oder Proteine von einem Gel auf eine Filtermembran übertragen und dort durch adsorptive oder kovalente Bindung immobilisiert werden. Auf dieser Membran können die Nukleinsäuren oder Proteine dann verschiedenen Nachweisreaktionen unterzogen werden. Diese Methode wurde von SOUTHERN (1975) zur Untersuchung von DNA entwickelt (Southern Blot) und später auch für RNA (Northern Blot) und Proteine (Western Blot) adaptiert.

Die Methode des Southern Blottings dient der Bestimmung der Kopienzahl eines bestimmten Gens in einem Genom. Bei transgenen Pflanzen lässt sich die Häufigkeit der Integration des Transgens in das Wirtsgenom überprüfen.

#### **2.3.1.1 DNA-Extraktion**

Mit Hilfe von flüssigem Stickstoff homogenisiertes Pflanzenmaterial wurde in 6 ml vorgewärmtem DNA-Extraktionspuffer gelöst und für eine Stunde bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden 6 ml Chloroform/Isoamylalkohol/Ethanol (80:4:16) zugegeben und beides durch Invertieren gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch fünfminütige Zentrifugation bei 3000 g des Gemischs bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und zur Präzipitation mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Das DNA-Pellet wurde nach dem Waschen mit 70 % Ethanol in 1 ml TE-Puffer aufgenommen. Zur Entfernung von RNA-Kontaminationen wurde der DNA-Lösung 0,1 µg RNase zugeetzt und diese für mindestens 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Fällung der DNA wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen eiskaltes Ethanol zugegeben. Nach dem Mischen wurde die Lösung bei -20 °C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wird das DNA-Pellet in ein frisches Gefäß überführt, erneut mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500 µl TE-Puffer (siehe SAMBROOK *et al.*, 1989) gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch und wurde im Agarose-Gel unter Verwendung einer DNA-Lösung mit bekannter Konzentration überprüft.

- DNA-Extraktionspuffer

100 mM	Tris HCl pH 8,0
20 mM	EDTA
500 mM	NaCl
1,5 %	SDS

Alternativ wurde zur Extraktion von genomischer DNA das Kit „nucleon PhytoPure“ von Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg nach Angaben des Herstellers verwendet.

### **2.3.1.2 DNA-Immobilisierung durch aufwärtsgerichteten Kapillartransfer**

Vor der Auftrennung im Agarose-Gel wurden jeweils 25 µg DNA mit 30 u der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) über Nacht bei 37 °C verdaut. Die Proben wurden wie in Kapitel 2.3.3.1 beschrieben gefällt, gewaschen und anschließend in 40 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden über Nacht in einem 0,8 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Vor dem Blotten wurde die DNA im Gel durch 20minütiges Inkubieren in 0,25 M HCl depuriniert. Die Denaturierung der DNA erfolgte durch 45minütiges Schütteln des Gels in einer Lösung aus 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH. Anschließend wurde das Gel gründlich mit A. bidest gewaschen und zur Renaturierung der DNA für 45 Minuten in einem Puffer aus 1 M Tris-HCl (pH 7,4) und 1,5 M NaCl inkubiert. Der Puffer wurde während der Inkubation einmal gewechselt. Zum Blotten der DNA auf eine Hybond N+-Membran (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) wurde 20x SSC verwendet und ein Aufbau gewählt, wie von AUSUBEL *et al.* (1999) gezeigt. Das Blotten erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

### **2.3.1.3 Sondenherstellung und Hybridisierung**

Zur Sondenherstellung wurden Ready-To-Go DNA Labelling Beads von Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Sonde wurde mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (10 µCi/µl; Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) markiert und nach der Synthese mit Hilfe einer MicroSpin G-25 Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) aufgereinigt. Die Hybridisierung der Filter erfolgte für vier Stunden bei 65 °C unter Verwendung des Rapid-hyb Puffers von Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg. Nach der Hybridisierung wurde der Filter für 20 Minuten bei 65 °C mit 2x SSC mit 0,1 % SDS und anschließend für 20 Minuten bei 65 °C mit 0,5x SSC mit 0,1 % SDS gewaschen. Die Exposition der Filter erfolgte über

Nacht auf Fuji BAS-MS 2025 screens. Diese wurden mit einem Molecular Imager FX phosphoimager (BIO-RAD, München) ausgelesen.

### 2.3.2 Northern Blot

Mit Hilfe der Northern Analyse können RNA-Moleküle aus der Gesamt-RNA eines Gewebes spezifisch nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des Transgens in verschiedenen transgenen Linien überprüft.

Etwa 200 mg fein gemörstertes Pflanzenmaterial wurden in 1,5 ml RNA-Extraktionspuffer homogenisiert. Dann wurden 200 µl Chlorform zugegeben und der Ansatz gut durchmischt. Die Mischung wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und dabei mehrfach gut durchmischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4 °C und 20000 g. Der Überstand wurde zu 850 µl Chloroform gegeben, gut durchmischt und erneut bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Der Überstand wird mit einem Volumen Isopropanal versetzt, gut gemischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Zur Präzipitation wird die Mischung bei 4 °C und 20000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in 900 µl 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl A. bidest<sub>DEPC</sub> aufgenommen. Die Auftrennung der RNA im denaturierenden Agarose-Gel, die Immobilisierung der RNA auf eine Nylonmembran und die anschließende Hybridisierung erfolgten wie von BEBER *et al.* (2000) beschrieben.

- RNA-Extraktionspuffer

- 35 % Phenol
- 0,8 M Guanidiniumthiocyanat
- 0,4 M Ammoniumthiocyanat
- 0,1 % Natriumacetat (pH 5,0)
- 5 % Glycerol

### 2.3.3 Western Analyse

Mit Hilfe des Western Blots können selbst geringe Mengen eines bestimmten Proteins immunologisch nachgewiesen werden. Dies erfolgt mittels Bindung eines spezifischen Antikörpers an das auf einer Membran fixierte Protein. Die Detektion erfolgt meist über einen zweiten Antikörper, der gegen den konstanten Bereich des ersten Antikörpers gerichtet ist und an den eine Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Dieses Enzym bewirkt eine Reak-

tion des Substrates 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat/Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT) zu einem violetten Farbstoff, der auf der Membran sichtbar wird.

Die Western Analyse erfolgte wie von BEBER (2001) beschrieben. Zum Nachweis des BCI4-Proteins wurde ein nicht aufgereinigtes Serum eines Kaninchens verwendet, das mit heterolog exprimiertem BCI4-Protein immunisiert wurde (Serum SA8458, Eurogentec, Herstal, Belgien).

## 2.4 Transiente Transformation mittels Partikelbombardement

Zur Überprüfung der Funktion verschiedener Gene in der Interaktion Gerste/Echter Gerstenmehltaupilz wurde das von NIELSEN *et al.*, (1999) und SCHWEIZER *et al.* (1999) entwickelte und von SCHULTHEISS *et al.* (2002) und SCHULTHEISS (2003) für Gerste optimierte Protokoll für die transiente Transformation verwendet. Für Überexpressionsexperimente wurde ein Plasmid, welches das zu untersuchende Gen unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors (CaMV35S) enthält zusammen mit dem Reportergen GFP in Epidermiszellen geschossen. Zur Analyse des Ausfalls bzw. *knock down* eines Gens wurde die dsRNA des Kandidatengens zusammen mit dem Reportergen GFP in dem Vektor pGY1 für die Transformation verwendet (siehe Kapitel 2.2.2).

### 2.4.1 Herstellung doppelsträngiger RNA

Die zu untersuchenden Gene bzw. Genfragmente wurden in pGEM<sup>®</sup>-T (siehe Kapitel 2.2.1) einkloniert, da dieser Vektor zwei verschiedene, die MCS flankierende Promotoren enthält, die von den verwendeten RNA-Polymerasen benötigt werden. Für die Herstellung der beiden einzelsträngigen RNAs durch *run off*-Transkription werden zwei unterschiedlich linearisierte Plasmide benötigt. Die Restriktionsansätze wurden mit Enzymen durchgeführt, die nicht im *Insert* schneiden, aber jeweils hinter dem *Insert* vom jeweiligen RNA-Polymerase-Promoter (T7- und SP6-RNA-Polymerase) aus gesehen liegen.

#### • Verdau der Plasmide

10,0 µg	Plasmid
3,0 µl	10x Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
1,5 µl	Restriktionsenzym (10 u/µl, MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

---

ad 30,0 µl A. bidest<sub>DEPC</sub>

Die Ansätze wurden für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Mit einem 2 µl Aliquot wurde die Vollständigkeit des Verdauens in einem Agarose-Gel überprüft. Der restliche Ansatz

wurde mit 170  $\mu\text{l}$  A. bidest und 200  $\mu\text{l}$  Roti<sup>®</sup>-Phenol/Chloroform (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) versetzt und für 10 Minuten bei 21000 g und 4 °C zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 100 %igem Ethanol versetzt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 21000 g und 4 °C präzipitiert. Der Ethanol wurde abgenommen und das trockene Pellet in 10  $\mu\text{l}$  A. bidest<sub>DEPC</sub> aufgenommen. Die anschließende *in vitro*-Transkription generierte die beiden RNA-Einzelstränge (*sense* und *antisense*).

• in vitro-Transkription

2,0 $\mu\text{l}$	linearisiertes Plasmid
8,0 $\mu\text{l}$	5x Transkriptionspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
1,0 $\mu\text{l}$	RNase-Inhibitor (40 u/ $\mu\text{l}$ , MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
5,0 $\mu\text{l}$	10 mM NTPs
2,0 $\mu\text{l}$	RNA-Polymerase (T7 oder SP6; 20 u/ $\mu\text{l}$ , MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

---

ad 40,0  $\mu\text{l}$  A. bidest<sub>DEPC</sub>

Die Ansätze wurden für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Von jedem Ansatz wurden 2  $\mu\text{l}$  abgenommen und für eine spätere Überprüfung im Agarose-Gel aufbewahrt. Die restlichen Ansätze wurden vereinigt, für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend durch langsames Abkühlen zur Bildung eines RNA-Dopplestranges gebracht. Dieser wurde zusammen mit den beiden Einzelsträngen aus der *in vitro*-Transkription auf einem Agarose-Gel überprüft.

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung der dsRNA wurden 4  $\mu\text{l}$  des Ansatzes mit 6  $\mu\text{l}$  A. bidest<sub>DEPC</sub>, 1  $\mu\text{l}$  3 M Natriumacetat und 25  $\mu\text{l}$  Etanol zusammengegeben, 10 min bei 21000 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 400  $\mu\text{l}$  A. bidest<sub>DEPC</sub> resuspendiert.

#### 2.4.2 Vorbereitung und Beschichtung der *Microcarrier*

Als *Microcarrier* wurden Wolframpartikel (M17; Ø 1,1  $\mu\text{m}$ ; BioRad; München) verwendet. 55  $\mu\text{g}$  dieser Partikel wurden zweimal mit jeweils 1 ml A. bidest und einmal mit 1 ml 100 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden 2 ml 50 %iges Glycerol hinzugegeben und die Partikel anschließend mit DEPC behandelt. Sie wurden dann bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Vor Gebrauch wurden die Wolframpartikel gut durchmischt und für zehn Minuten im Ultraschallbad sonifiziert. Dann wurden das zu transformierende Testgen bzw. die dsRNA

mit dem Reporterplasmid zugesetzt. In den RNAi-Experimenten diente dsRNA des humanen Thyroidrezeptors (TR) als Kontrolle (SCHULTHEISS *et al.*, 2002) Anschließend wurde tropfenweise 1 M Calciumnitrat (pH 10) zugegeben.

- Microcarrier-Beschichtung für RNAi (pro Schuss)

12,5 µl Wolframpartikel  
 0,5 µg pGY1-*GFP*  
 2,0 µg dsRNA des Testgens bzw. des *TR*  
 12,5 µl 1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, pH10

- Microcarrier-Beschichtung für Überexpression (pro Schuss)

12,5 µl Wolframpartikel  
 0,5 µg pGY1-*GFP*  
 0,8 µg pGY1-Testgen bzw. pGY1  
 12,5 µl 1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, pH10

Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf Eis (RNAi) oder bei Raumtemperatur (Überexpression) inkubiert, kurz zentrifugiert und so viel Überstand abgenommen, dass pro Schuss 6 µl verbleiben. Etwa 4 cm lange Blattsegmente von sieben Tage alten Gerstenpflanzen der Sorten Pallas oder IngridWt wurden in Petrischalen (Ø 6,0 cm) mit 0,5 %igem Phytagar (GIBCO BRL Life Technologies oder BD Biosciences, Karlsruhe) ausgelegt. Pro Ansatz wurden 6 Schalen vorbereitet. Die Blätter wurden mit einer Plastikschiablone in der Petrischale fixiert, die dann auf den Boden einer Vakuumkammer gestellt wurde. Der an der Kammerdecke angebrachte *Macrocarrier* (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde mit den präparierten Wolframpartikeln beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe wurde der Druck in der Kammer um 0,9 bar reduziert und die Partikel mit 9 bar Heliumgasdruck durch ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des *Macrocarriers*) auf die Blätter geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet.

Vier oder 24 Stunden nach dem Bombardement wurden die beschossenen Segmente mit etwa 100 Konidien pro mm<sup>2</sup> Gerstenmehltaupilz der Rasse A6 inokuliert.

### 2.4.3 Mikroskopische Auswertung

48 Stunden nach der Inokulation erfolgte die mikroskopische Auswertung der Versuche mit Hilfe eines Auflichtfluoreszenzmikroskops (Axioplan, Zeiss, Jena). Die pilzlichen

Strukturen auf der Blattoberfläche wurden durch etwa 30sekündiges Eintauchen in eine 0,3 %ige Calcofluorlösung (*Fluorescent Brightener 28*, Sigma) angefärbt. Überschüssiges Calcofluor wurde durch kurzes Eintauchen der Blätter in Wasser entfernt. Danach wurden die Blattsegmente mit der adaxialen Seite nach oben auf einen Objektträger gebracht und nach Zugabe von 50 %igem Glycerol mit einem Deckglas luftblasenfrei abgeschlossen. Unter Fluoreszenzanregung (Quecksilberhochdrucklampe, HBO 50 W, Osram) wurden die Präparate bei 100facher Vergrößerung und mit Hilfe eines GFP-Filters (Anregungsfilter 420 nm, Farbteiler 493 nm, Sperrfilter 505– 530 nm) zunächst nach GFP-Zellen abgesucht. Interaktionen transformierter Zellen mit dem Pilz wurden mit 400facher Vergrößerung und unter Verwendung eines Calcofluorfilters (365 nm/395 nm/420 nm) bzw. des Durchlichts (Halogenlampe, 12 V, 100 W) charakterisiert. Die Penetrationsrate wurde als Quotient der Summe der penetrierten Zellen und der Summe aller Interaktionsstellen errechnet.

## 2.5 Präparation der *Dotblots*

Bei so genannten *Dotblots* handelt es sich um auf Nylonmembranen, auf die PCR-Produkte verschiedener Gene aufgebracht wurden. Im Gegensatz zu *Micro-* oder *Macroarrays* handelt es sich nur um eine relativ kleine Anzahl von PCR-Produkten, in diesem Fall 96. Da die Herstellung einfach ist, können sie leicht in größerer Anzahl individuell hergestellt werden. In dieser Arbeit wurden sie zur Überprüfung der Expressionsmuster von Kandidatengen verwendet. Zur Gewinnung der entsprechenden Plasmide wurden die vom IPK Gatersleben zur Verfügung gestellten Klone (siehe Kapitel 2.2.3) verwendet. Diese befinden sich in 386 well Mikrotiter-Platten und werden bei -70 °C in HMFM-Medium aufbewahrt. Zur Mini-Präparation wurde das NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Zur Amplifikation wurde 1 µl Plasmid in die unten beschriebene PCR-Reaktion eingesetzt. Die Liste der gespotteten Klone findet sich in Tabelle 8.3 im Anhang.

### • PCR-Ansatz

10,0 µl	10x PCR-Puffer
10,0 µl	dNTP-Mix (2mM)
10,0 µl	U/R-Primer-Mix
0,2 µl	SupraTherm Taq-Polymerase (5 u/µl, Genecraft, Münster)
1,0 µl	Plasmid

---

ad 100,0 µl A. bidest.

Die Reaktion wird im GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 von Applied Biosystems (Foster City, USA) nach dem folgenden Programm durchgeführt.

3 min	94 °C	35 Zyklen
40 sec	94 °C	
40 sec	56 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	

Ein Volumen von 5 µl wurde zur Überprüfung der Reaktion in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Zu dem restlichen Volumen wurden 200 µl 6x SSC und 2 µl 5x DNA-Ladepuffer gegeben. Vor dem Aufbringen auf die Membran wurde das PCR-Produkt für 10 Minuten bei 96 °C denaturiert. Die PCR-Produkte wurden mittels eines Bio-Dot<sup>®</sup> Microfiltration Apparatus (BIO-RAD, München) auf Hybond N<sup>+</sup> Membran (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) aufgebracht. Die Verwendung erfolgte laut Anleitung des Herstellers. Die Membran wurde mit 6x SSC angefeuchtet, in die Bio-Dot<sup>®</sup>-Apparatur eingelegt und nach deren Zusammenbau mit 50 µl 6x SSC gewaschen. Dann wurde die denaturierte DNA durch Applikation eines Vakuums auf die Membran gebracht. Diese wurde anschließend nochmals mit 200 µl 6x SSC gewaschen. Vor der Hybridisierung wurde die DNA durch UV-*cross-linking* (2x 125 mJoule) mit dem GS Gene Linker (BIO-RAD, München) auf der Membran fixiert.

Die Hybridisierung und Auswertung erfolgte in Kapitel 2.6 beschrieben.

- 5x DNA-Ladepuffer

Der 5x DNA-Ladepuffer setzt sich aus einem Volumen 10x Farbmarker und einem Volumen 10x TBE (SAMBROOK *et al.*, 1989) zusammen.

- 10x Farbmarker

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

---

- HMFM-Medium

900,0 ml LB-Medium  
79,2 ml Lösung A  
19,8 ml Lösung B  
1,0 ml Kanamycin (50 mg/ml, sterilfiltriert)

---

ad 1000,0 ml A. bidest

- LB-Medium

10,0 g Trypton  
5,0 g Hefe-Extrakt  
5,0 g NaCl

---

ad 1000,0 ml A. bidest; pH 7,0 einstellen

- Lösung A

0,90 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
4,25 g Natriumcitrat  $\times 2 \text{H}_2\text{O}$   
9,00 g  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$   
632,00 g Glycerin (87%)

---

ad 1000,0 ml A. bidest

- Lösung B

18,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
47,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

---

ad 1000,0 ml A. bidest

LB-Medium, Lösung A und Lösung B wurden autoklaviert und wie oben beschrieben kurz vor Gebrauch steril zusammengegeben.

## 2.6 Hybridisierung von cDNA-Arrays

### 2.6.1 Herstellung komplexer cDNA-Sonden

Zur Isolierung von mRNA wurde etwa 300 mg unter flüssigem Stickstoff gemörseretes Pflanzenmaterial in 1,5 ml Lysis-Puffer homogenisiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Probe beim Auftauen komplett mit dem Puffer bedeckt war. Die aufgetaute Probe wurde zweimal für fünf Minuten bei 21000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils in ein frisches Reaktionsgefäß überführt bzw. nach dem zweiten Zentrifugations-

schritt zu 125  $\mu\text{l}$  in Lysis-Puffer äquilibrierten Dynabeads<sup>®</sup> Oligo(dT)<sub>25</sub> (DynaL Biotech, Oslo, Norwegen) gegeben. Die Isolierung der mRNA erfolgt über die Bindung des polyA-Endes an den Oligo(dT)<sub>25</sub>-Schwanz der Dynabeads<sup>®</sup>. Um diese Bindung zu ermöglichen wurden die Dynabeads<sup>®</sup> mit dem Pflanzenextrakt für fünf Minuten bei Raumtemperatur über Kopf geschwenkt. Nach der magnetischen Trennung wurde der Überstand verworfen und die Dynabeads<sup>®</sup> dreimal mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  Wasch-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie dreimal mit jeweils 250  $\mu\text{l}$  RT-Puffer gewaschen. Die Erststrangsynthese wurde unter Verwendung der AMV Reverse Transcriptase von Promega, Madison, USA durchgeführt.

10 $\mu\text{l}$	5x AMV RT-Puffer
0,5 $\mu\text{l}$	DTT (100 mM)
12,5 $\mu\text{l}$	dNTP-Mix (2mM)
1,5 $\mu\text{l}$	RNase-Inhibitor (30 u/ $\mu\text{l}$ , MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
3,0 $\mu\text{l}$	AMV Reverse Transcriptase (10 u/ $\mu\text{l}$ )
<hr/>	
ad 50,0 $\mu\text{l}$	A. bidest

Dieser Ansatz wurde zu den Dynabeads<sup>®</sup> pipettiert und dann für eine Stunde bei 42 °C inkubiert, wobei der Ansatz alle zehn Minuten gemischt wurde. Nach magnetischer Trennung wurden die Dynabeads<sup>®</sup> zweimal mit jeweils 250  $\mu\text{l}$  RT-Puffer gewaschen. Zur Entfernung der mRNA wurden die Dynabeads<sup>®</sup> zusammen mit 50  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer für zwei Minuten bei 95 °C inkubiert. Der Überstand wurde nach der magnetischen Trennung sofort abgenommen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die Dynabeads<sup>®</sup> zweimal mit 250  $\mu\text{l}$  A. bidest gewaschen. Zur radioaktiven Markierung wurde  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ; Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verwendet. Der verwendete Puffer und der Primerlösung wurden dem Megaprime DNA Labeling Kit von Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg entnommen. Als Polymerase diente das große Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow Enzym) von USB, Cleveland, USA. Der folgende Ansatz wurde zu den gewaschenen Dynabeads<sup>®</sup> gegeben.

35,0 µl	A. bidest
5,0 µl	Primerlösung (dN) <sub>6</sub> -Random Primer
3 Minuten bei 95 °C inkubieren	
10,0 µl	Labelling Puffer
5,0 µl	α-33P-dCTP (10 µCi/µl)
1,0 µl	Klenow-Polymerase (10 u/µl)

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und dabei alle zehn Minuten gut durchmischt. Der Überstand wurde nach der magnetischen Trennung entfernt und die Dynabeads<sup>®</sup> mit 150 µl Elutionspuffer gewaschen. Die Sonde wurde von den Dynabeads<sup>®</sup> eluiert, indem diese mit 150 µl Elutionspuffer für drei Minuten bei 95 °C inkubiert wurden und der Überstand sofort nach der magnetischen Trennung abgenommen wurde. Die Elution wurde einmal wiederholt. Der vereinigte Überstand wird über 0,2 µm Anopore<sup>™</sup>-Säulchen von Whatman, Maidstone, England aufgereinigt. Die Aktivität der Sonde wurde mit dem *Multi-Purpose Scintillation Counter* von Beckmann Coulter, Krefeld bestimmt, um gleiche Aktivitäten der zu vergleichenden Sonden einsetzen zu können.

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

• Lysis-Puffer

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

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8,0 eingestellt. DTT wurde erst nach dem Autoklavieren und kurz vor der Sonden-Synthese zugesetzt.

• Wasch-Puffer

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

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8,0 eingestellt. LiDS wurde erst nach dem Autoklavieren und kurz vor der Sonden-Synthese zugesetzt.

- RT-Puffer

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

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8,3 eingestellt. Es wurde eine fünffach konzentrierte Stammlösung angesetzt, die kurz vor der Sonden-Synthese entsprechend verdünnt wurde.

- Elutionspuffer

2 mM EDTA

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

Die zu hybridisierenden Filter wurden mit 6x SSC angefeuchtet und dann in Hybridisierungsröhren bei 65 °C in 5x Denhardt/6x SSC/0,5% SDS + Lachssperma (10 mg/l) prähybridisiert. Nach zwei Stunden wurde die Prähybridisierungslösung entfernt und durch 10 ml frisches 5x Denhardt/6x SSC/0,5% SDS + Lachssperma, dem die denaturierte Sonde (zehn Minuten bei 95 °C) zugegeben wurde, ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C.

Am folgenden Tag wurden die Filter zuerst für 15 Minuten bei 65 °C mit 15 ml 0,2x SSC/0,1 % SDS und dann für 15 Minuten mit 0,1 SSC /0,1 %SDS gewaschen. Anschließend wurden die Filter auf mit 0,2x 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.

## **2.6.3 Auswertung der Filter**

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 und außerdem den lokalen Hintergrund um die einzelnen Signale bzw. „Signalgruppen“. Die Rohdaten wurden mit dem Statistikprogramm R (<http://www.r-project.org>) weiter ausgewertet. Das Programm normalisiert die Signalstär-

ken über den Median der Signalstärken der verschiedenen Filter. Dann werden Signale ausgeschlossen, die nicht mindestens fünffach über dem lokalen Hintergrund liegen oder deren Replikate sich um mehr als 1,5 voneinander unterscheiden. Aus den verbleibenden Signalen wurden dann diejenigen ausgewählt, die eine Veränderung in der Signalintensität größer als 2,5 zeigten.

Für die *Dotblots* wurden diese Berechnungen mit Microsoft Excel durchgeführt.



---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 *Bci4*: transgene Pflanzen

Das Gen *Bci4* wurde durch eine subtraktive Suppressionshybridisierung von BEBER *et al.* (2000) isoliert und als chemisch induzierbar charakterisiert. Das BCI4-Protein enthält ein einzelnes *EF-hand*-Motiv. *EF-hand*-Motive dienen in anderen Proteinen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung, für *Bci4* konnte sie bislang jedoch nicht bestätigt werden. Expressionsstudien zeigten, dass das Gen nicht durch Pathogene, Verwundung oder Hormone induziert wird, sondern nur durch Applikation von SA oder deren Funktionsanaloga BTH und DCINA. Deshalb eignet es sich gut als molekularer Marker für die chemisch induzierte Resistenz in Gerste (BEBER *et al.*, 2000). Erste transiente Transformationen zeigten, dass *Bci4* einen Einfluss auf die Penetrationsrate von *Bgh* in Gerste hat (BEBER, 2001; EICHMANN, unveröffentlichte Daten). Aufgrund der Ergebnisse der transienten Transformationen wurden stabil transgene Gersten- und Weizenpflanzen hergestellt, die *Bci4* überexprimieren (Fred Altpeter, IPK Gatersleben). Diese Pflanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

#### 3.1.1 Nachweis des Transgens

Es standen jeweils 11 putativ transgene Gersten- und Weizenlinien (cv. Golden Promise und Bobwhite), die *Bci4* konstitutiv überexprimieren sollen, zur Verfügung. Da mittels Agrobakterium-vermitteltem Gentransfer transformierte Gerstenpflanzen häufig nur jeweils eine Kopie des Transgens enthalten, wird in Gerste in der Nachkommenschaft eine Aufspaltung im Verhältnis 3:1 in Bezug auf das Transgen erwartet, so dass nur eine von vier Nachkommen homozygot im Bezug auf das Transgen sein sollte. Durch die wahrscheinlich höhere Kopienzahl des Transgens, die durch Partikelbombardement erzeugt wird, kommt es in Weizen auch durch Aufspaltung nicht zwingend zum Verlust des Transgens, allerdings kann es zum *Silencen* des Transgens aufgrund der höheren Kopienzahl kommen. Deshalb sollte vor einem Test auf veränderte Resistenzeigenschaften abgeklärt werden, ob die putativ transgene Pflanze das Transgen enthält und ob dieses translatiert wird. Da pro transgener  $T_0$ -Linie nur jeweils 20  $T_1$ -Körner zur Verfügung standen, war die Durchführung größerer Versuchsreihen zur statistischen Absicherung der Ergebnisse jedoch kaum möglich.

### 3.1.1.1 PCR-Nachweis des Transgens

Unter anderem wurde von einzelnen transgenen T<sub>1</sub>-Samen eine so genannte *Half-Seed*-PCR nach MCCARTHY *et al.* (2001) durchgeführt. Dafür wird der Samen mit einem sterilen Skalpell quer halbiert. Die embryofreie Hälfte wurde zur DNA-Extraktion und anschließenden PCR verwendet, während die Hälfte mit dem Embryo zum Keimen gebracht wurde und dann für Versuche bzw. zur Vermehrung verwendet wurde. Es wurden aber auch andere Standardmethoden zur Extraktion von DNA aus Blättern verwendet (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Zur Amplifikation und zum Nachweis der Selektionsmarkergene und des Transgens wurden die Primer HYGRO1 und HYGRO2, kan1 und kan2 und ORFStart und ORFStop verwendet (alle Primer siehe Tabelle 8.1 im Anhang). Die PCR-Produkte der Resistenzgene sollen 550 bzw. 500 bp groß sein. Bei *Bci4* konnten zumindest in den Gerstenlinien zwei Produkte erwartet werden: genomisches Wildtyp-*Bci4* mit einer Größe von etwa 2,8 kb und das Transgen mit einer Größe von 692 bp. PCR-Produkte des Hygromycinresistenzgens (*hyg<sup>R</sup>*) sollten nur in den transgenen Gerstenpflanzen auftreten, während das Gen für Kanamycinresistenz (*kan<sup>R</sup>*) nur in transgenem Weizen zu finden sein sollte.

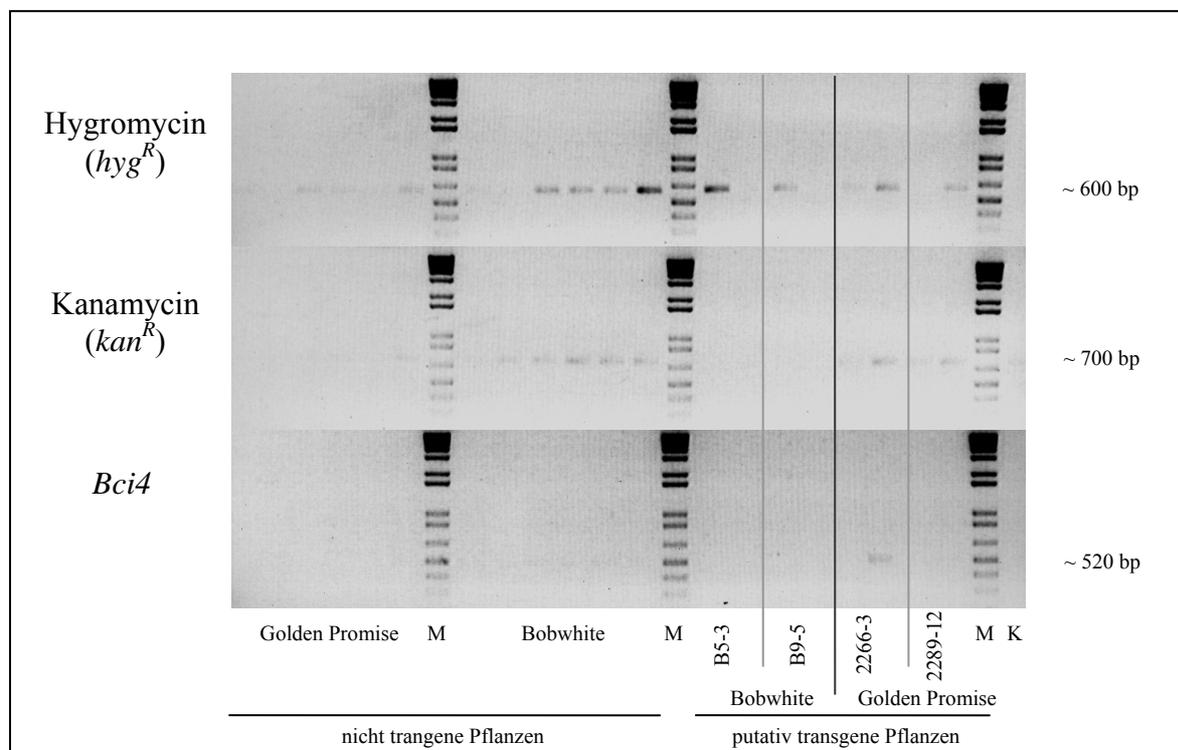


Abb 3.1: PCR-Nachweis von *hyg<sup>R</sup>*, *kan<sup>R</sup>* und des *Bci4*-Gens in Samen von nicht transgenen und putativ transgenen Pflanzen. Legende siehe nächste Seite.

**Abb 3.1: PCR-Nachweis von *hyg<sup>R</sup>*, *kan<sup>R</sup>* und des *Bci4*-Gens in Samen von nicht transgenen und putativ transgenen Pflanzen.** Aus halbierten Samen wurde DNA extrahiert, die als *template* für die PCR-Reaktion eingesetzt wurde. Als Größenstandard (M) wurde 1kb+ von Invitrogen Life Technologies GmbH (Karlsruhe) verwendet. Um Kontaminationen auszuschließen wurde eine Kontrollreaktion (K) mit Wasser als *template* durchgeführt.

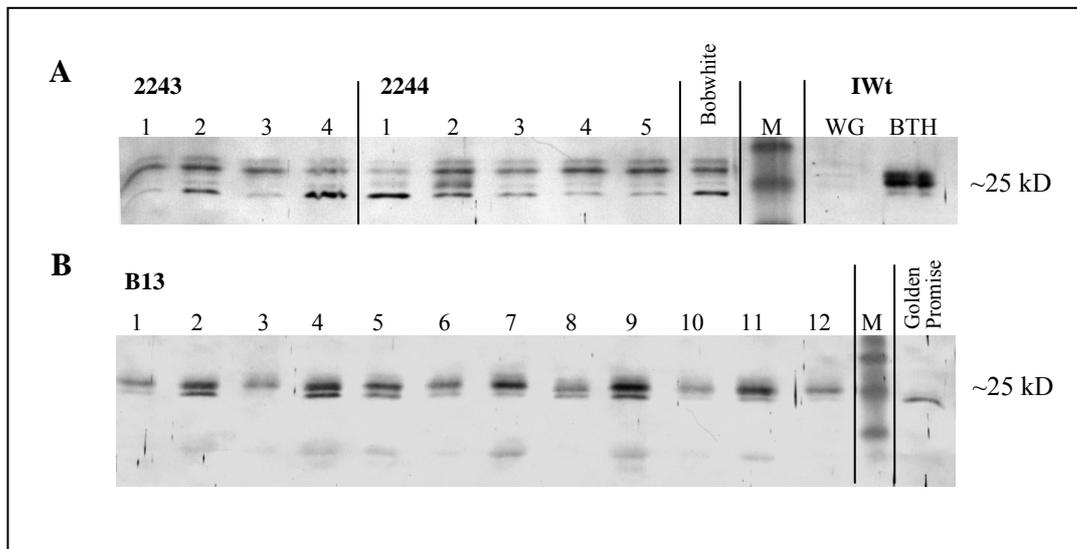
Abbildung 3.1 zeigt, dass durch Anwendung der Methode der *Half-Seed*-PCR auch aus der genomischen DNA der nicht transgenen Wildtyppflanzen mit den verwendeten Primern für die Gene für Hygromycin und Kanamycin-Resistenz Produkte amplifiziert werden konnten. Diese Produkte wurden jedoch nicht sequenziert, so dass es sich auch um unspezifische Produkte handeln könnte. Dafür spricht auch, dass die Größen der PCR-Produkte nicht exakt den erwarteten Produkten entsprachen. Kontaminationen können ausgeschlossen werden, da die durchgeführten Kontrollen keine Signale zeigten. Die Primer für *Bci4* lieferten nur in einer transgenen Linie ein schwaches Signal, allerdings nicht in der erwarteten Größe. Dieser Versuch wurde mit anderen Primern, die die gleichen Gene amplifizieren sollten, wiederholt, lieferte jedoch gleiche Ergebnisse.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde die Methode nicht weiter zum Nachweis der Transgene in weiteren Linien angewendet. Auch DNA, die mittels anderer Extraktionsmethoden gewonnen wurde, führte zu Kontaminationsproblemen.

### 3.1.1.2 Western Analysen

Zur Detektion des Proteins BCI4 stand ein Antiserum aus Kaninchen zur Verfügung, die mit rekombinantem BCI4-Protein immunisiert wurden (BEBER, 2001). Um die Translation des Transgens nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen unter der Verwendung dieses Antiserums durchgeführt. Es wurde Blattmaterial von jeweils fünf Pflanzen pro Linie verwendet, von dem mit Hilfe einer Pflanzenpresse ein Blattextrakt von jeweils zwei bis drei Blättern von etwa zwei Monate alten Pflanzen hergestellt wurde. Aus diesem wurde unter Verwendung von 1x PBS (SAMBROOK *et al.*, 1989) als Extraktionspuffer ein Proteinextrakt hergestellt, der nach Auftrennung in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel und anschließender Immobilisierung auf einer Nylonmembran mit dem Antiserum inkubiert wurde. Es wurden pro Spur 20 µg Gesamt-Protein aufgetragen. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte über einen zweiten Antikörper, an den Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Dieses Enzym bewirkt den Niederschlag des Substrates NBT/BCIP, der als violetter Farbstoff auf der Membran sichtbar wurde (siehe Kapitel 2.3.3). Es wurden T<sub>1</sub>-Nachkommen von jeweils sieben putativ transgenen Gersten- und Weizenlinien mit Western Analysen überprüft. In Abbildung 3.2 sind die Ergebnisse der Western Analysen

exemplarisch an zwei putativ transgenen Weizenlinien (A) und einer Gerstenlinie gezeigt (B).



**Abb 3.2: Western Blot Analyse zum Nachweis von BCI4 am Beispiel von zwei transgenen Weizen- und einer transgenen Gerstenlinie.** A zeigt den Western Blot von zwei verschiedenen transgenen Weizenlinien, als negative Kontrolle diente das Proteinextrakt einer nicht transgenen Bobwhite-Pflanze. Zur Positivkontrolle wurden Extrakte von neun Tage alten IngridWt-Pflanzen (IWt) aufgetragen, die 48 h vor der Ernte mit 20 ppm WG bzw. BTH (Bodenapplikation) behandelt wurden. In B wurden Extrakte von 12 verschiedenen Pflanzen der transgenen Golden Promise-Linie B13 aufgetragen. Hier diente das Proteinextrakt einer nicht transgenen Golden Promise-Pflanze als negative Kontrolle.

Abbildung 3.2 A zeigt ein deutliches Signal in der Positivkontrolle, einem Proteinextrakt aus sieben Tage alten Gerstenkeimlingen des Kultivars IngridWt, die 48 Stunden nach der Behandlung mit 20 ppm BTH geerntet wurden. Die entsprechende mit WG behandelte Negativkontrolle weist kein Signal auf. Die Signale der transgenen Pflanzen entsprechen in ihrer Größe nicht derjenigen der Positivkontrolle. Sie sind etwas größer bzw. kleiner, und außerdem finden sich identische Signale sowohl in Extrakten von putativ transgenen Pflanzen als auch in der nicht transgenen Kontrolle. In Weizen kommt es also zu unspezifischen Hybridisierungen des verwendeten Antiserums.

Die in Abbildung 3.2 B verwendete Negativkontrolle stammt von Pflanzen, die wie die putativ transgenen Pflanzen etwa zwei Monate alt waren. Hier ist ebenfalls ein Signal zu erkennen. Dieses entspricht in seiner Größe einer Bande, die in den Extrakten der transgenen Pflanzen zu erkennen ist. In den transgenen Linien ist jedoch zusätzlich eine etwas größere Bande erkennbar. Während diese Bande in allen transgenen Pflanzenextrakten deutlich sichtbar ist, ist die kleinere Bande in den Pflanzen 3, 10 und 12 nur schwer auszumachen. Nach BEBER (2001) handelt es sich bei dem größeren Protein um BCI4, wäh-

rend das kleinere unspezifisch durch einen Antikörper des nicht aufgereinigten Serums erkannt wird. Das würde bedeuten, dass alle transgenen Pflanzen das Gen *Bci4* translatieren, die unspezifische Bande aus der Kontrolle jedoch nicht in allen Pflanzen detektiert wird.

Die Western Analysen der übrigen überprüften putativ transgenen Gerstenlinien zeigten ebenfalls kein eindeutiges Bild.

### **3.1.1.3 Southern Analysen**

Die Southern Analysen zum Nachweis und zur Bestimmung der Kopienzahl des Transgens lieferten keine eindeutigen Ergebnisse, da die Extraktion der genomischen DNA aus älteren Blättern schwierig ist, sie sich nicht sauber im Gel auftrennen lässt und dadurch bei der Hybridisierung keine eindeutigen Signale liefert. Die ersten und zweiten Blätter der Pflanzen dienten Resistenztests und dadurch konnten frühestens die dritten Blätter zur DNA-Extraktion verwendet werden.

## **3.1.2 Untersuchung des Resistenzverhaltens**

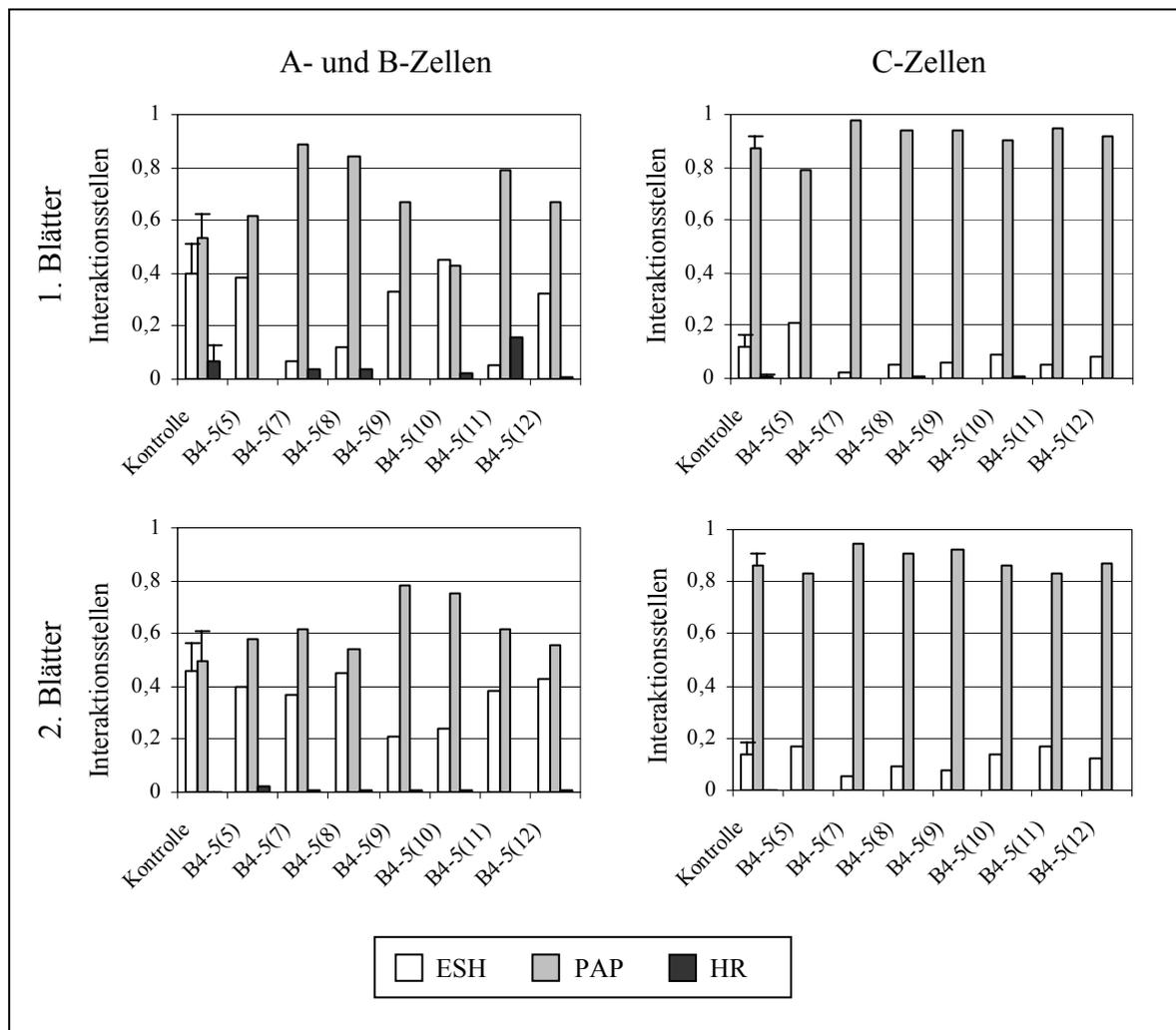
Da keine abschließende Aussage über das Vorhandensein, die Expression und die Translation des Transgens in der T<sub>1</sub>-Generation möglich war, sollte über ein möglicherweise verändertes Resistenzverhalten der Pflanzen ein Rückschluss auf eine genetische Veränderung ermöglicht werden.

### **3.1.2.1 Makroskopische Untersuchung der Resistenz**

Um für die makroskopische Untersuchung eine größere Anzahl von Pflanzen zur Verfügung zu haben, wurden T<sub>1</sub>-Pflanzen im Gewächshaus vermehrt. Von jeder der jeweils 11 Gersten- und Weizenlinien wurden 15 T<sub>2</sub>-Samen vorgekeimt. Das erste und zweite Blatt der 14 Tage alten Keimlinge wurde mit *Bgh* der Rasse A6 bzw. mit einem Mischisolat von *Bgt* inokuliert. Die Sporendichte betrug etwa 3-5 Sporen pro mm<sup>2</sup>, so dass eine Zahl von etwa 50-150 Pusteln pro Blatt erzielt wurde. Die Auswertung der Symptome erfolgte ein Woche später visuell. Es konnten keine Unterschiede in der Pustelzahl zwischen putativ transgenen Pflanzen und den nicht transgenen Kontrollpflanzen festgestellt werden (ohne Abbildung).

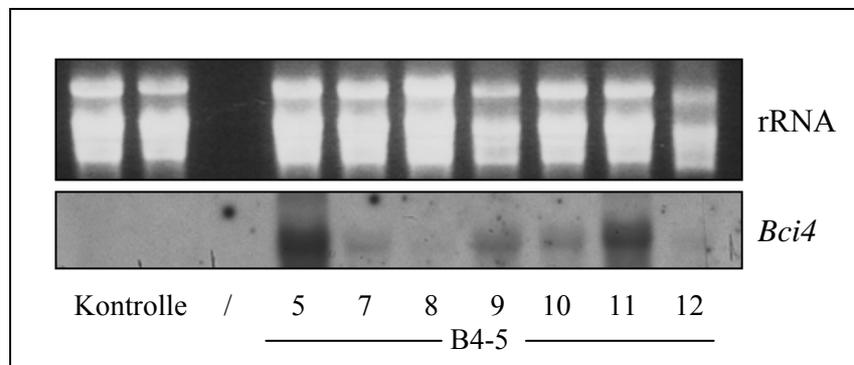
### 3.1.2.2 Mikroskopie und Northern Analyse

Das erste und zweite Blatt von 14 Tage alten Keimlingen wurden in einem Blattsegmenttest mit *Bgh* der Rasse A6 inokuliert und 48 Stunden nach der Inokulation entfärbt und fixiert. Für die mikroskopische Auswertung wurde der Pilz mit essigsaurer Tinte angefärbt. Pro Blatt wurden je 100 Interaktionsstellen ausgewertet.



**Abb 3.3: Qualitative und quantitative mikroskopische Auswertung der Interaktion zwischen einer putativ transgenen Gerstenlinie und *Bgh* der Rasse A6.** Blattsegmente von 14 Tage alten Gerstenkeimlingen des Kultivars Golden Promise (Kontrolle) bzw. der putativ transgenen Linie B4-5 wurden mit auf der adaxialen Blattseite mit *Bgh* mit einer Dichte von etwa 20 Sporen pro mm<sup>2</sup> inokuliert. Es wurden pro Blatt jeweils 100 Interaktionsstellen auf A- und B-Zellen und auf C-Zellen ausgewertet. Die Interaktionsstellen auf A- und B-Zellen wurden getrennt von den Interaktionsstellen auf C-Zellen bewertet (Lokalisation der verschiedenen Zelltypen nach KOGA *et al.*, 1990). Die Interaktionen wurden unterschieden in erfolgreiche Penetrationen mit der Ausbildung von verlängerten Sekundärhyphen (ESH) und Abwehr des Pathogens durch effektive Papillenbildung (PAP) oder Hypersensitive Reaktion (HR). Der Fehlerbalken der Kontrollen gibt den Standardfehler über vier untersuchte Blätter an.

Dabei wurde zwischen erfolgreicher Besiedlung, sichtbar durch die Ausbildung von sekundären Hyphen auf der Blattoberfläche (ESH, *elongated secondary hyphae*) und inkompatiblen Interaktionen (PAP, durch Zellwandapposition gestoppter Penetrationsversuch oder HR, Hypersensitiver Zelltod) unterschieden. Zusätzlich wurde das dritte Blatt geerntet, um Gesamt-RNA für Northern Analysen zu extrahieren. Northern Analysen dienen der Überprüfung der Expressionsrate eines Gens. Die Ergebnisse beider Experimente zeigen die Veränderung der Penetrationsrate in Abhängigkeit von der Expression des Transgens. Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse der Mikroskopie der ersten und zweiten Blätter einer ausgewählten Linie nach Inokulation mit *Bgh* und in Abbildung 3.4 ist das Ergebnis der Northern Analyse der entsprechenden Linie gezeigt.



**Abb 3.4:** Transkriptakkumulation von *Bci4* in dritten Blättern einer ausgewählten putativ transgenen Gerstenlinie. Die dritten Blätter der putativ transgenen Gerstenlinie B4-5 und von zwei nicht transgenen Kontrollpflanzen der Sorte Golden Promise wurden zur Extraktion von Gesamt-RNA verwendet. Von jeder Probe wurden 10 µg RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen immobilisiert. Der Nachweis des *Bci4*-Transkripts erfolgte durch Hybridisierung mit einer DIG-markierten RNA-Sonde und anschließender Detektion über einen Immuno-Chemilumineszenz-Assay. Die Überprüfung der Lademengen erfolgte durch Ethidiumbromid-vermittelte Fluoreszenz der rRNA nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarose-Gel.

Die Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen mikroskopischen Auswertung am Beispiel der putativ transgenen Gerstenlinie B4-5. Als Kontrolle dienten jeweils vier erste und zweite Blätter von nicht transgenen Pflanzen des Kultivars Golden Promise. Pro Blatt wurden jeweils 100 Interaktionen auf A- und B-Zellen bzw. auf C-Zellen ausgewertet. Im Mittel zeigt die nicht transgene Kontrolle eine Penetrationsrate von 40 % auf den ersten Blättern und von 46 % auf den zweiten Blättern in den A- und B-Zellen. C-Zellen zeigen mit 12 % auf ersten Blättern bzw. bei 14 % auf den zweiten Blättern eine deutlich niedrigere Penetrationsrate.

Die transgenen Pflanzen B4-5(7), (8), und (11) zeigen auf den ersten Blättern eine Reduktion der ESH, verbunden mit einem Anstieg der Zahl der durch Papillen gestoppte Penetrationsversuche, während sich die Zahl der Zellen, die eine HR durchlaufen, nur auf dem Blatt der Linie B4-5(11) von 7 % in der Kontrolle auf 16 % erhöht. Die C-Zellen der ersten Blätter zeigen bis auf die Linie B4-5(5) eine Reduktion der Interaktionen mit ESH, wobei die Linien B4-5(10) und (12) eine schwächere Reduktion zeigen als z. B. die Linie B4-5(7).

Auf den zweiten Blättern zeigen nur die Linien B4-5(9) und (10) eine deutliche Reduktion der Penetrationsrate auf A- und B-Zellen. Die C-Zellen der zweiten Blätter der Linien B4-5(7), (8) und (9) zeigen eine deutliche Reduktion der Penetrationsrate, während die Linien B4-5(5) und (11) eine um 26 % höhere Penetrationsrate als die Kontrolle zeigen.

Vergleicht man die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung mit denen der Northern Analyse (siehe Abbildung 3.4), erkennt man, dass die beiden Linien B4-5(5) und (11) die höchste Transkriptionsrate aufweisen, während die Expressionsrate in den übrigen transgenen Linien sehr gering ist. Allerdings zeigen alle transgenen Linien zumindest eine schwache Transkriptakkumulation, obwohl in den Blättern gleichen Alters der nicht transgenen Kontrolle keine Signale sichtbar sind. Besonders auffallend ist, dass die Linie B4-5(5) die höchste Transkriptakkumulation von *Bci4* aufweist, jedoch fast keine Veränderung im Resistenzverhalten gegenüber *Bgh* zeigt. B4-5(11) zeigt ebenfalls eine hohe Expressionsrate von *Bci4* und zeigt gleichzeitig auf den ersten Blättern eine starke Reduktion der Penetrationsrate, die auf A- und B-Zellen durch einen hohen Anteil von HR an der Abwehrreaktion verursacht wird. Durch die statistische Nichtwiederholbarkeit dieser Versuche aufgrund der Aufspaltung der Nachkommenschaft, sind diese Ergebnisse jedoch nicht wirklich aussagekräftig.

## **3.2 Identifikation neuer chemisch induzierbarer Gene**

### **3.2.1 Macroarray-Analysen**

Die Methode der *Macroarray*-Analyse dient der Untersuchung der Expression einer größeren Anzahl von Genen. In dieser Arbeit wurden Nylonmembranen verwendet, auf die jeweils zwei Replikationen von 1536 Genfragmenten aufgebracht wurden. Die Fragmente wurden von Patrick Schäfer in Zusammenarbeit mit dem IPK Gatersleben aus epidermale Gewebe von BTH-induzierten Gerstenblättern der Sorte IngridWt isoliert. Der größte Teil der cDNA-Klone war zum Zeitpunkt der Hybridisierungen bereits sequenziert, von

Vektorsequenzen bereinigt (SCHÄFER, 2003) und durch Sequenzvergleiche charakterisiert. Die Fragmente wurden zusammen mit bereits bekannten Genen bzw. Genfragmenten des IPAZ in einem 3x3 Format auf die Membranen gespottet. Der mittlere Spot blieb jeweils leer und diente als Hintergrundkontrolle (SCHÄFER, 2003).

Die Filter wurden mit radioaktiv markierten komplexen cDNA-Sonden hybridisiert, die aus Primärblättern von Gerstenpflanzen der Sorte IngridWt isoliert wurden (siehe Kapitel 2.6). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben und nach fünf Tagen wurden sie mit 20 ppm BTH oder zur Kontrolle mit der entsprechenden Menge der Leerformulierung WG behandelt. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte 48 Stunden nach der Behandlung. Bevor das Pflanzenmaterial zu Sondenherstellung verwendet wurde, wurde eine Überprüfung der BTH-Induktion durchgeführt. Zuerst wurden Pflanzen aus dem gleichen Experiment im Blattsegmenttest auf ihre Anfälligkeit gegenüber *Bgh* untersucht. Zeigten die BTH-behandelten Blätter eine Reduktion der Pustelzahl im Vergleich zur WG-behandelten Kontrolle, wurde in Northern Analysen oder durch *two-step* RT-PCR die Expression von *Bci4* untersucht. Das Pflanzenmaterial wurde nur dann verwendet, wenn eine deutlich Reduktion der Pustelzahl auf den BTH-behandelten Blättern im Vergleich zu Kontrollblättern auftrat und gleichzeitig eine Induktion von *Bci4* nachweisbar war.

Die Hybridisierungen wurden mit Sonden aus zwei unterschiedlichen biologischen Experimenten durchgeführt. Eine biologische Wiederholung wurde jeweils technisch wiederholt, wobei die gleichen Sonden für zwei neue Filter verwendet wurden. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms Array Vision 7.0 bzw. 8.0 (Imaging Research Inc., St. Catharines, Kanada). Es bestimmte die Intensitäten der verschiedenen Signale und des lokalen Hintergrunds um die jeweiligen *spotting groups*, der von der Signalstärke der aufgetragenen Fragmente subtrahiert wurde. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit einem Makro für das Programm R, welches von Lothar Altschmidt, IPK Gatersleben, zur Verfügung gestellt wurde, bearbeitet. Dieses Makro selektiert die Werte nach vom Nutzer ausgewählten Bedingungen (siehe Kapitel 2.6.3). Die Signale der ausgewählten Klone wurden mit Microsoft Excel weiterbearbeitet, indem die Signalstärke eines cDNA-Fragments auf dem BTH-Filter durch die Signalstärke im Kontrollfilter dividiert wurde. Der erhaltene Wert gibt die Induktion eines Gens durch die Behandlung an. Um die Repression eines Gens zu ermitteln, wird der Kehrwert des Wertes berechnet. Tabelle 3.1 zeigt Gene, die in den *Macroarray*-Analysen nach BTH-Behandlung differentiell exprimiert waren. Die Sequenzen der als induziert gefundenen Klone, die zum Zeitpunkt der Auswertung noch nicht

bekannt waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit sequenziert und sind entsprechend gekennzeichnet. Detailliertere Daten der *Macroarray*-Analysen und zu den verschiedenen Klonen finden sich in Tabelle 8.2 und 8.4 im Anhang.

**Tab. 3.1: Expressionsdaten der *Macroarray*-Analysen mit BTH-induzierten Primärblättern.** Angegeben ist die relative Induktion bzw. Repression der differentiellen Klone. Rot unterlegt sind die Werte der Klone, die mindestens 2,5-fach induziert waren, während die mindestens 2,5-fach reprimierten grün hinterlegt sind. Die Sequenzen der GAN Klone sind hinterlegt in der Gabi PD Datenbank (<https://gabi.rzpd.de>).

Klon <sup>1</sup>	höchste Homologie zu <sup>2</sup>	relative Expression <sup>3</sup>			
GAN001A04*	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase	30,68	1,8	0,39	2,63
GAN001A10*	SOUL-like Protein [ <i>A. thaliana</i> ]	5,2	0,19	0,61	3,98
GAN001A24*	threonyl-tRNA synthetase [ <i>Oryza sativa</i> ]	5,93	0,38	0,48	5,1
GAN001B19*	<i>Bci6</i> + unbekannte Funktion	66,31	4,85	2,58	10,94
GAN001B20*	unbekannte Funktion	6,84	0,44	0,49	2,65
GAN001D07*	ATP-abhängiger Transporter + unbekannte Funktion	4,98	3,44	1,05	3,72
GAN001D12*	Reticulon like Protein + Cysteinprotease	51,04	3,86	1,02	3,68
GAN001E14*	unbekannte Funktion	11,55	2,22	0,83	2,65
GAN001F11	Golgi Transportkomplex Untereinheit	1,09	3,06	0,03	0,4
GAN001F12*	putative golgi transport complex protein	43,29	10,89	0,2	1,47
GAN001F21*	Polyubiquitin [ <i>O. sativa</i> ]	10,01	3,73	0,58	1,89
GAN001G20	unbekannte Funktion	2,25	1,87	1,46	5,37
GAN001G22*	Importin beta-like Protein [ <i>O. sativa</i> ]	1,36	1,13	15,86	296,17
GAN001H20*	Cysteinprotease	52,57	18,78	17,27	33,18
GAN001J09*	$\gamma$ -Hydroxybutyrat Dehydrogenase-like [ <i>O. sativa</i> ]	2,93	3,4	1,82	6,54
GAN001K12*	unbekannte Funktion	1,61	3,29	0,96	6,06
GAN001K15	nicht sequenziert	3,36	1,9	0	1,74
GAN001L11*	unbekannte Funktion	44,88	2,28	0,64	2,87
GAN001L21*	unbekannte Funktion	0,89	6,24	0,68	2,94
GAN001M04*	Vitellogenin [ <i>Gallus gallus</i> ]	6,32	7,15	1,15	14,11
GAN001M22	nicht sequenziert	18,57	2,18	0,88	1
GAN001N20*	unbekannte Funktion + Glycin-Decarboxylase	3,6	64,01	0,55	1,42
GAN001O16*	<i>ternary complex factor-like</i> [ <i>Oryza sativa</i> ]	7	16,44	2,65	11,78
GAN001P03*	unbekannte Funktion	0,65	153,41	0,2	5,9
GAN002B01	hypothetisches Protein: <i>C. elegans</i>	7,91	0,68	0,17	3,87
GAN002B02	Phospoglycerat Kinase	4,31	0,39	0,57	13,06
GAN002C11	unbekannte Funktion + Adenosine 5'-Phosphosulfat Reduktase	199,38	10,57	0,68	2,79
GAN002D07	keine Homologie	4,25	2,24	0,46	2,14
GAN002E03	Onecut 3	8,17	6,93	1,09	2,07
GAN002E16	Cysteinprotease	1433	89,41	213,4	312,1
GAN002G10	keine Homologie	1,44	1,69	0,24	2,9
GAN002G16	Glycoprotein-like + Glucosidaseisoenzym + GADPH	4,82	3,82	0,4	1,63
GAN002I09	Jasmonat induzierbares Protein (JIP 37)	23,5	10,96	249,5	717,7

Klon <sup>1</sup>	höchste Homologie zu <sup>2</sup>	relative Expression <sup>3</sup>			
GAN002K21	keine Homologie	0,58	1,31	1,45	2,82
GAN002K24	keine Homologie	2,35	3,3	0,84	2,34
GAN002L09	Chlorophyll a/b-bindendes Protein [ <i>T. aestivum</i> ]	14,8	6,9	0,01	1,5
GAN002M10	hesB-like domain-containing protein	3,53	4,48	0,42	1,38
GAN002O03	keine Homologie	0,58	3,38	0,2	0,81
GAN002P08	Cysteinprotease	142,2	62,72	2,96	83,86
GAN003A19	extrazelluläre Invertase	9,01	0,72	2,48	21,88
GAN003B09	<i>Leucine-rich repeat</i> Protein	7,99	1,47	0,72	2,78
GAN003B13	Cysteinprotease	42,17	5,76	5,78	22,89
GAN003B20	Photosystem I Reaktionszentrum	0,6	1,03	0,84	3,82
GAN003C03	unbekannte Funktion	40,77	4,2	0,69	5,42
GAN003C04	unbekannte Funktion	19,32	2,64	0,7	4,26
GAN003C09	Cysteinprotease	117,35	29,89	34,77	72,58
GAN003D20	Cysteinprotease	29,5	8,48	5,99	10,98
GAN003E17	Auxin-reprimiertes Gen	1,65	1,27	1,75	151,58
GAN003E18	keine Homologie	1,51	1,05	0,73	11,5
GAN003F10	Arylsulfatase + Chlorophyll a/b bindendes Protein	1,4	19,6	0,05	5,6
GAN003F17	hypothetisches Protein: <i>S. cerevisiae</i>	1,55	1,3	1,27	246,02
GAN003F18	λ-Phage: Replikationsprotein	1,11	1,19	0,72	4,42
GAN003G19	Photosystem I Untereinheit + Histon H3	0,81	2,46	95,02	2,83
GAN003H02	Cysteinprotease	209,5	101,88	39,24	59,77
GAN003H10	Cysteinprotease	2609	159,7	112,3	455,2
GAN003H11	keine Homologie	1,06	1,41	0,72	2,68
GAN003J15*	<i>fruit bromelain</i> Cysteinprotease	179200	5075	2018	19540
GAN003K16	hypothetisches Protein: <i>S. aureus</i>	0,46	1,42	0,29	4,24
GAN003L07	Pyruvatdehydrogenase: <i>Nostoc sp.</i>	1,39	1,29	1,5	9,03
GAN003L11	keine Homologie	0,6	1,04	0,49	1,02
GAN003L15	keine Homologie	0,49	1,29	0,37	3,04
GAN003L21	keine Homologie	1,76	4,58	2,16	15,2
GAN003M16	keine Homologie	3,73	1,03	1,67	0,17
GAN003M18	Remorin	3,2	8,79	0,94	3,96
GAN003N15	hypothetisches Protein: <i>C. elegans</i>	0,07	1,66	0,06	16,85
GAN003N16	keine Homologie	0,35	1,46	0,19	2,6
GAN003N17	unbekannte Funktion	1,87	5,99	0,72	4,03
GAN003P02	keine Homologie	1,21	5,59	0,44	1,17
GAN003P09	unbekannte Funktion	1,36	3,74	0,44	1,24
GAN003P23	keine Homologie	0,39	12,39	0,29	0,14
GAN004A14	hypothetisches Protein: <i>C. elegans</i>	17,36	0,15	0,08	9,88
GAN004A20	licht-induziertes Protein	30,77	0,17	0,32	7,7
Hv0366GL	Lycopene β-cyclase	419,42	23,6	0,48	1,62
Hv0456GL	<i>BciI</i> Lipoxygenase	176784	178240	432524	439300
Hv1005GL	<i>BciI</i> : LOX2Hv1, Lipoxygenase	176272	10240,96	2071,99	103900
Ta0016EX	Pr1-1: <i>T. aestivum</i>	421,04	2,1	0,03	7,09
HvD00154	keine Homologie	24,73	1,64	0,46	1,17

Klon <sup>1</sup>	höchste Homologie zu <sup>2</sup>	relative Expression <sup>3</sup>			
GAN004C05	Cysteinprotease	10910	334,77	996,9	2267
GAN004C15	keine Homologie	2,98	0,63	0,75	2,12
Hv0462GL	<i>Bci4</i> EF-hand Protein	22725,38	14237,63	118,89	278,32
HvD00125	keine Homologie	85,96	34,9	16,59	15,08
HvD00191	keine Homologie	4294,49	139,5	0,39	5,23
HvD00122	Lipid Transfer Protein	0,47	1,04	1	1,05
GAN004E10	extrazelluläre Invertase	9,45	3,8	23,88	108,54
Hv0029GL	<i>Bci2</i> :Thionin	115,18	36,52	66,02	167,16
HvD00126	keine Homologie	6,68	1,4	1,6	4,95
Hvbas1	Thioredoxin-abhängige Peroxidreduktase	0,8	0,47	0,11	10,08
HvD00195	Ubiquitin	30,22	5,31	1,25	4,07
GAN004G04	keine Homologie	3,33	2,46	0,29	0,92
Hv0002EX	basisches <i>Pr1</i> : <i>H. vulgare</i>	2,04	2,24	1,55	8,23
Hv53MK	EPSP-synthase	37,47	4,35	0,48	1,21
HvD00192	unbekannte Funktion	2,2	2,39	0,91	2,52
GAN004I15	keine Homologie	0,94	1,79	0,56	1,4
Hv0312GL	<i>Bci9</i> : Apyrase	30010	6308,42	20,83	54,17
Hv20MK	keine Homologie	1062,44	2,29	0,58	1,21
HvD00138	Lipid-Transferprotein	1,18	2,43	0,76	2,5
GAN004K21	Peptid Methionin Sulfoxid Reductase	0,85	2,98	0,97	9,95
GAN004K22	Sperm protamine P1	1,56	3,03	1,86	8,26
GAN004K24	<i>oryzain alpha precursor</i> Cysteinprotease	396,4	58,24	9,47	30,15
GAN004M17	Sorbitol transporter	0,65	2,63	0,16	3,14
GAN004M18	keine Homologie	0,27	2,16	0,29	3,41
Hv0403GL	putative Chloroplasten protein, <i>O. sativa</i>	0,18	14,17	0,23	1,82
Hv0005EX	GAPDH	3,43	14,13	0,28	1,16
Hv57MK	EPSP-Synthase	21,04	4,88	0,6	0,93
Hv17MK	keine Homologie	0,72	0,93	0,01	1,4
HvD00174	unbekannte Funktion	0,67	3,15	0,51	1,43

Die Sequenzen der gelb hinterlegten Klone finden sich in Tabelle 8.4 im Anhang. Sie wurden zur weiteren Überprüfung in Dotblot Analysen verwendet.

<sup>1</sup> Name des Klons in der GAN-cDNA-Bank bzw. in der Datenbank des IPAZ

<sup>2</sup> Gen, mit der höchsten Homologie zum Genfragment

<sup>3</sup> berechnet als Quotient der Signalstärke des BTH-Filters durch die Signalstärke des Kontrollfilters

\* Die Sequenzen dieser Klone wurden im Rahmen dieser Arbeit selbst ermittelt.

Tabelle 3.1 zeigt die durch das Programm R ausgewählten Genfragmente. Diese entsprechen den gewählten Bedingungen und zeigen eine Veränderung in der Expressionsrate  $\geq 2,5$ . Jedoch war die Expression der verschiedenen Gene in den verschiedenen Bedingungen sehr schwankend. Nur wenige Gene waren in allen vier Hybridisierungen mehr als 2,5-fach induziert. Viele Gene waren nur in einer, in zwei oder in drei Hybridisierungen indu-

ziert bzw. reprimiert. In den *Macroarray*-Studien konnte kein durch die BTH-Behandlung eindeutig reprimiertes Gen identifiziert werden, da keines der Gene in mehr als zwei Hybridisierungen eine Repression zeigte und die detektierten Repressionen nur sehr schwach waren. Auffallend war auch, dass eine große Anzahl von Cysteinproteasen gefunden wurde, die nach einem Sequenzvergleich als verschiedene Fragmente eines Gens identifiziert werden konnten.

Da eine Durchführung weiterer Hybridisierungen zur Absicherung der Ergebnisse aufgrund der begrenzten Anzahl der zur Verfügung stehenden Filter nicht möglich war, wurden aus den angegebenen Genen bzw. Genfragmenten diejenigen ausgewählt, die in mindestens zwei der vier Hybridisierungen mehr als 2,5 induziert waren (in Tabelle 3.1 gelb hinterlegt). Die Sequenzen dieser Klone wurden dann erneut einzeln von Kontaminationen mit Vektorsequenzen überprüft und von diesen befreit. Anschließend wurde ihre Sequenzhomologie zu bereits bekannten Genen in den entsprechenden Datenbanken überprüft (siehe Tabelle 8.4 im Anhang).

Zur weiteren Bestätigung dieser Gene wurden *Dotblot* Analysen durchgeführt.

### **3.2.2 Dotblot Analysen**

Von 52 Genen, die in den *Macroarray*-Analysen in mindestens zwei Hybridisierungen mehr als 2,5 induziert waren und von *Bci1* und *Bci4*, die als Positivkontrollen dienten, wurden von entsprechenden Glycerolstocks (siehe Kapitel 2.5) durch Mini-Präparation Plasmide isoliert. Die integrierten Genfragmente wurden mittels PCR unter Verwendung der Primer M13fw(-40) und M13rev (siehe Kapitel 2.5 und Tabelle 8.1) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben im 96-Microtiter-Plattenformat auf Nylonmembranen aufgebracht (*Spotting*-Schema siehe Tabelle 8.3). Die so erhaltenen Filter wurden zur Hybridisierung mit verschiedenen Sonden verwendet.

#### **3.2.2.1 Behandlung mit BTH**

Zur weiteren Bestätigung der Induzierbarkeit der Gene durch BTH, wurden die hergestellten Filter mit Sonden von Primärblättern sieben Tage alter BTH- bzw. WG-behandelter IngridWt-Pflanzen (20 ppm BTH Bodenapplikation, siehe Kapitel 3.2.1) hybridisiert. Das Pflanzenmaterial wurde 48 Stunden nach der BTH-Behandlung geerntet und stammte aus zwei weiteren unabhängigen Experimenten. Eine Überprüfung des verwendeten Pflanzenmaterials fand wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben statt.

Zur Auswertung wurde wiederum das Programm Array Vision 7.0 bzw. 8.0 verwendet. Die ausgegebenen Rohdaten wurden nach den bereits für die *Macroarrays* beschriebenen Kriterien (siehe Kapitel 2.9.3) unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel ausgewertet.

**Tabelle 3.2: Überprüfung der Expression der BTH-induzierbaren Gene mittels Dotblot Analyse.** Dargestellt sind die Gene, deren Expression nach der BTH-Behandlung mindestens 2,5-fach induziert war. Zahlen der rechten Spalte geben die Induktion der Gene nach der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle an.

<b>Klon</b>	<b>höchste Homologie zu</b>	<b>Induktion</b>
<b>GAN001A04</b>	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase	4,3x
<b>GAN001A10</b>	SOUL-like Protein [ <i>A. thaliana</i> ]	4x
<b>GAN001B19</b>	<i>Bci6</i> + unbekannte Funktion	12x
<b>GAN001B20</b>	unbekannte Funktion	3,1x
<b>GAN001D07</b>	ATP-abhängiger Transporter + unbekannte Funktion	100x
<b>GAN001D12</b>	Reticulon like Protein + Cysteinprotease	142x
<b>GAN001E14</b>	unbekannte Funktion	2,9x
<b>GAN001F12</b>	putatives Golgi Transport-Komplex Protein	3,3x
<b>GAN001H20</b>	Importin beta-like Protein [ <i>O. sativa</i> ]	12x
<b>GAN001J09</b>	$\gamma$ -Hydroxybutyrat Dehydrogenase-like [ <i>O. sativa</i> ]	42x
<b>GAN001K12</b>	unbekannte Funktion	370x
<b>GAN001L11</b>	unbekannte Funktion	220x
<b>GAN001O16</b>	<i>ternary complex factor-like</i> [ <i>Oryza sativa</i> ]	2,7x
<b>GAN002B02</b>	Phosphoglycerat Kinase	5,5x
<b>GAN002C11</b>	unbekannte Funktion + Adenosin 5'-Phosphosulfat Reduktase	3,5x
<b>GAN002E03</b>	Onecut 3	2,5x
<b>GAN002G16</b>	Glycoprotein-like + Glucan-endo-1,3- $\beta$ -Glucosidaseisoenzym + GADPH	3x
<b>GAN002I09</b>	Jasmonat induzierbares Protein (JIP 37)	2,5x
<b>GAN003A19</b>	extrazelluläre Invertase	4,1x
<b>GAN003E17</b>	Auxin-reprimiertes Gen	3,7x
<b>GAN003E18</b>	keine Homologie	4,2x
<b>GAN003J15</b>	<i>fruit bromelain</i> Cysteinprotease	3,8x
<b>GAN003M18</b>	Remorin	3,5x
<b>GAN003N17</b>	unbekannte Funktion	2,8x

Klon	höchste Homologie zu	Induktion
HvD00195	Ubiquitin	3,4x
GAN004K21	Peptid Methionin Sulfoxid Reductase	3,8x
GAN004K24	<i>oryzain alpha precursor</i> Cysteinprotease	3,9x
Hv0005EX	GAPDH	2,5x

Insgesamt 28 der 52 überprüften Gene konnten durch die *Dotblot* Analysen als BTH-induzierbar bestätigt werden. Die übrigen 26 zeigten keine Induktion größer oder gleich 2,5. Die beiden Positivkontrollen Hv462GL (*Bci4*) und Hv456GL (*Bci1*) zeigten eine starke Induktion. Die vollständigen Daten finden sich in Tabelle 8.5 im Anhang.

### 3.2.2.2 Inokulation von IWe mit *Bgh*

Mit Hilfe der *Dotblot*-Analysen wurden die BTH-induzierbaren Gene auch hinsichtlich ihrer Expression in der inkompatiblen Interaktion Ingrid Weihenstephan (IWe, *Mlg*-tragend) mit *Bgh*, Rasse A6, überprüft. Für diese Untersuchung wurden Sonden aus dem Blattmaterial von zwei unabhängigen Experimenten verwendet. Die sieben Tage alten Keimlinge wurden mit 20 Sporen pro mm<sup>2</sup> des Gerstenmehltaupilzes der Rasse A6 inokuliert. Nach 8, 16, 24 und 48 Stunden wurden jeweils Blattproben geerntet. Für die Sondenherstellung wurde das Blattmaterial der verschiedenen Erntezeitpunkte vereinigt. Die Hybridisierung und Auswertung der Filter erfolgte wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Die Rohdaten aus der Analyse mit Array Vision wurden mit Microsoft Excel weiter ausgewertet. Einen Überblick über die differentiell exprimierten Gene liefert Tabelle 3.3. Die vollständigen Daten finden sich in Tabelle 8.6 im Anhang.

**Tabelle 3.3: Expression der BTH-induzierbaren Gene in der kompatiblen Interaktion IWe mit *Bgh* der Rasse A6.** Gezeigt werden die Gene, deren Expression nach der Behandlung mindestens 2,5fach von der Expression der Kontrolle abwich. Zahlen der rechten Spalte geben die x-fache Induktion bzw. Repression der Gene nach der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle an.

Klon	höchste Homologie zu	Induktion
HvD00126	keine Homologie	3x
Hv0456GL	<i>Bci1</i> : Lipoxygenase	2,6x

Klon	höchste Homologie zu	Repression
GAN001A04	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase	2,6x
GAN001E14	unbekannte Funktion	2,9x
GAN002L09	Chlorophyll a/b bindendes Protein	2,7x
Hv53MK	EPSP-Synthase	2,9x

Zwei Gene wurden durch das Pathogen induziert. Für vier der insgesamt 54 Gene konnte gezeigt werden, dass sie nach der Inokulation mit *Bgh* reprimiert wurden. Allerdings handelte es sich um vergleichsweise schwache Änderungen der Expression.

### 3.2.2.3 Behandlung mit Methyljasmonat

Die in den *Macroarrays* identifizierten BTH-induzierten Gene wurden hinsichtlich ihrer Expressionsveränderung durch Methyljasmonat (MeJA) untersucht. Um das Blattmaterial für die Sondenherstellung zu gewinnen, lässt man Primärblätter von sieben Tage alten IngridWt-Pflanzen für 24 Stunden auf einer Lösung von 45  $\mu$ M Methyljasmonat schwimmen. Für die Kontrolle wurden Primärblätter gleichen Alters auf Wasser *gefloated*. Die Hybridisierung und Auswertung der Filter erfolgte wie oben beschrieben. In Tabelle 3.4 sind die als differentiell exprimiert gefundenen Gene gezeigt. Detailliertere Daten finden sich in Tabelle 8.7 im Anhang.

**Tabelle 3.4: Expression der BTH-induzierbaren Gene nach der Behandlung mit MeJA.** Gezeigt werden die Gene, deren Expression nach der Behandlung mindestens 2,5fach von der Expression der Kontrolle abwich. Zahlen der rechten Spalte geben die x-fache Induktion bzw. Repression der Gene nach der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle an.

Klon	höchste Homologie zu	Induktion
GAN001B19	<i>Bci6</i> + unbekannte Funktion	94x
GAN002I09	Jasmonat induzierbares Protein (JIP 37)	37000x

Klon	höchste Homologie zu	Repression
GAN001D07	ATP-abhängiger Transporter + unbekannte Funktion	35x
GAN001M04	unbekannte Funktion	7,4x
GAN001P03	unbekannte Funktion	36x
GAN002G16	Glycoprotein-like + Glucan-endo-1,3- $\beta$ -Glucosidaseisoenzym + GADPH	1850x
GAN002L09	Chlorophyll a/b bindendes Protein	2300x

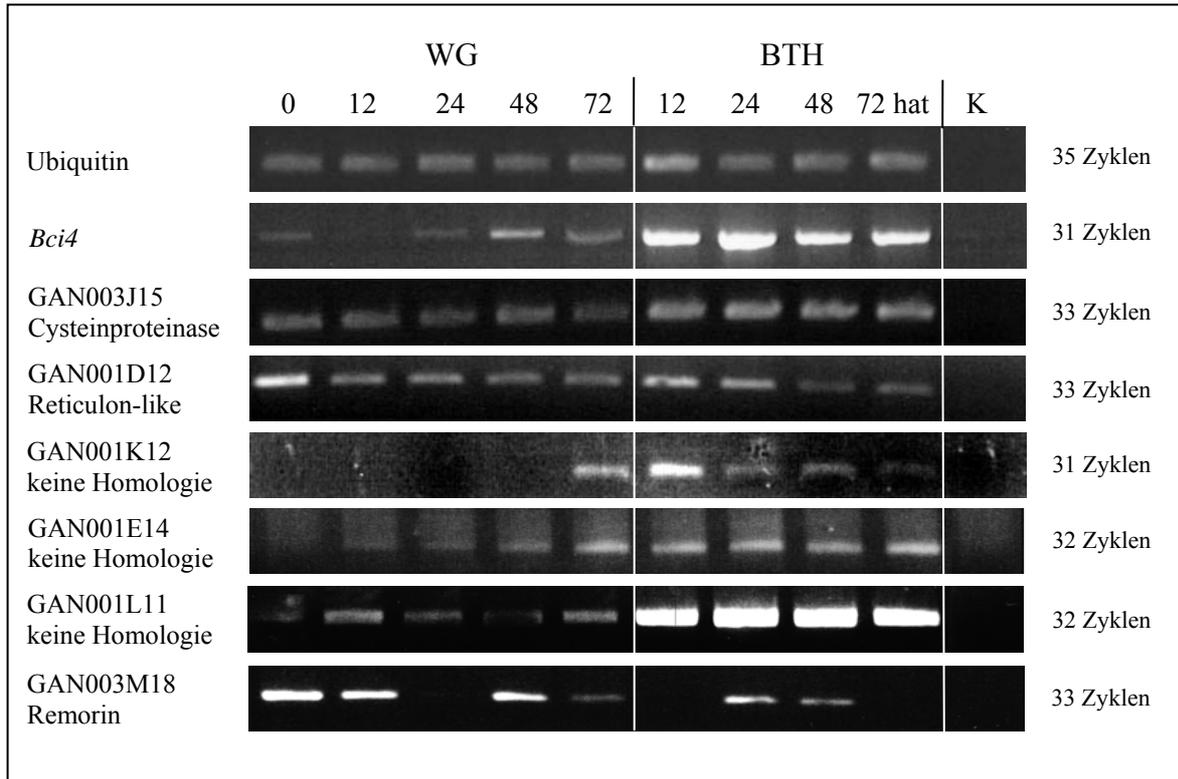
<b>Klon</b>	<b>höchste Homologie zu</b>	<b>Repression</b>
<b>GAN003B09</b>	unbekannte Funktion	4,9x
<b>GAN003E17</b>	Auxin-reprimiertes Gen	67x
<b>GAN003F10</b>	Arylsulfatase	11x
<b>GAN004K22</b>	unbekannte Funktion	11x
<b>Hv196rh</b>	<i>Hvbas1</i>	37x
<b>HvD00126</b>	keine Homologie	3x

Zwei der insgesamt 54 Gene auf dem Filter wurden durch das *Floaten* auf MeJA induziert: JIP 37 wurde nach der MeJA-Behandlung 37.000fach stärker exprimiert als in der Kontrolle, das PCR-Fragment, das sich aus *Bci6* und einem unbekanntem Gen zusammensetzt, zeigte eine um den Faktor 94 stärkere Expression.

Elf Gene zeigten eine deutliche Repression durch das *Floaten* auf MeJA. Besonders stark reprimiert waren die Klone GAN002G16 und GAN002L09. Beide Klone besitzen mehr als ein *Insert*.

### 3.2.3 Bestätigung der differentiellen Expression mittels *two step* RT-PCR

Die in den *Macroarray* und *Dotblot*-Analysen als BTH-induzierbar identifizierten Gene sollten in einem letzten Schritt durch die unabhängige Methode der semiquantitativen *two-step* RT-PCR bestätigt werden. Sieben Tage alte IngridWt-Pflanzen wurden mit 20 ppm BTH bzw. mit der entsprechenden Menge WG behandelt. Zum Zeitpunkt 0 und 12, 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung wurden jeweils Blattproben geerntet. Aus dem unter flüssigem Stickstoff gemörserten Material wurde die Gesamt-RNA extrahiert. Daraus wurde unter Verwendung der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reversen Transcriptase von MBI Fermentas, St. Leon-Rot cDNA hergestellt. Diese diente dann als Matrize für PCR-Reaktionen. Zur Überprüfung gleicher Lademengen von cDNA wurde die Expression eines konstitutiv exprimierten Ubiquitin-Gens nachgewiesen. Zur Überprüfung der chemischen Induktion durch BTH wurde das *Bci4*-Gen verwendet. Dieses Gen ist bislang einer der besten Marker für chemisch induzierte Resistenz in Gerste (BEBER *et al.*, 2000). 13 der 28 Gene mit differentiellen Signalen in den *Dotblot*-Analysen wurden mittels RT-PCR auf ihre Expression überprüft. Wie Abbildung 3.5 zeigt, konnte für fünf der 13 Gene auch durch RT-PCR eine Regulation durch BTH bestätigt werden.



**Abb. 3.5: Transkriptakkumulation verschiedener Gene nach der Behandlung mit BTH.** Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge der Sorte IngridWt wurden mit 20 ppm BTH bzw. der entsprechenden Menge WG behandelt (Bodenapplikation) und 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung wurden die Blätter geerntet. Die aus den Blättern extrahierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben, die als *template* für PCRs mit genspezifischen Primern diente. Zur Überprüfung gleicher Lademengen diente das konstitutiv exprimierte Gen Ubiquitin, *Bci4* diente als Marker gen für die chemisch induzierte Resistenz. K war eine Negativkontrolle ohne cDNA. Zusätzlich ist die Zyklenzahl angegeben, die zur Amplifikation der Gene verwendet wurde.

Die RT-PCRs wurden für die gezeigten Gene mindestens einmal wiederholt, um die Ergebnisse zu bestätigen. Die Amplifikation des Ubiquitin-Gens zeigt eine gleichmäßige Einstellung der cDNA-Konzentrationen der verschiedenen Proben. *Bci4*, als Marker für die chemisch induzierte Resistenz in Gerste, zeigt eine starke Induktion der Expression bereits 12 Stunden nach der Behandlung.

Die Cysteinprotease zeigt einen Anstieg der Expressionsrate durch die Behandlung mit BTH. Allerdings ist dieser nicht so deutlich wie die Ergebnisse der *Macroarray* und *Dotblot* Analysen erwarten ließen.

Das Reticulon-like Gen zeigt eine verstärkte Expression 12 und 24 Stunden nach der BTH-Behandlung, die Expression fällt danach jedoch auf das Niveau der WG-behandelten Kontrolle zurück. GAN001K12, dem bislang keine Homologie zugeordnet werden konnte,

wurde 12 Stunden nach der BTH-Behandlung stärker exprimiert als zum gleichen Zeitpunkt nach der Kontrollbehandlung. Dann nimmt die Expressionsstärke ab und zeigt 72 Stunden nach der Behandlung eine geringere Expressionsrate als die Kontrolle.

GAN001E14 zeigte eine leichte Geninduktion durch WG. Deutlich früher und stärker war die Induktion nach der Behandlung mit BTH im Vergleich zur Kontrolle. Bereits nach 12 Stunden ist eine deutliche Expression zu erkennen, während erst 48 Stunden nach der WG-Behandlung eine schwache Expression zu erkennen ist.

GAN001L11, ein Gen ohne Homologie zu einem Gen bekannter Funktion, zeigt in allen Zeitpunkten einen sehr starken Anstieg der Expression nach der BTH-Behandlung.

Ein Gen mit Homologie zu einem Remorin, GAN003M18, zeigte ein überraschendes Expressionsmuster. Zu den Kontrollzeitpunkten 0, 12 und 48 Stunden wurde es stark exprimiert, nach 24 Stunden war keine Expression nachweisbar und 72 Stunden nach der Kontrollbehandlung war eine schwache Expression des Gens zu beobachten. 12 und 24 Stunden nach der BTH-Behandlung war eine schwache Expression des Gens zu erkennen, während zu den übrigen Zeitpunkten keine Transkriptakkumulation nachweisbar war. Da dieses Gen zum speziell zum in den *Macroarrays* untersuchten Zeitpunkt 48 Stunden nach der jeweiligen Behandlung nicht induziert war, wurde es nicht für die Überprüfung seiner Funktion im transienten Transformationsassay verwendet.

Des Weiteren wurden die Klone GAN001A04, GAN001A10, GAN001E14, GAN002B02, GAN003A19, GAN004K21 und HvD00195 überprüft. Sie zeigten unter Anwendung der Methode der semiquantitativen RT-PCR keine differentielle Expression nach BTH-Induktion. Für den Klon GAN001B19, der sich aus *Bci6* und einem Gen mit unbekannter Funktion zusammensetzt, konnte gezeigt werden, dass die Induzierbarkeit durch *Bci6* und nicht durch das Gen mit unbekannter Funktion bedingt wird.

### 3.3 Gen-Funktionsanalysen

Der Einfluss einiger ausgewählter Gene auf die Interaktion von Gerste mit *Bgh* wurde mit Hilfe eines transienten Transformationssystems untersucht (NIELSEN *et al.*, 1999; SCHWEIZER *et al.* 1999). In einzelnen Epidermiszellen ein Kandidatengen entweder überexprimiert oder durch RNA Interferenz ausgeschaltet. Dazu wurden die Primärblätter mittels Partikelbombardement transient mit dem Kandidatengen unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors oder mit der doppelsträngigen RNA des Gens beschossen.

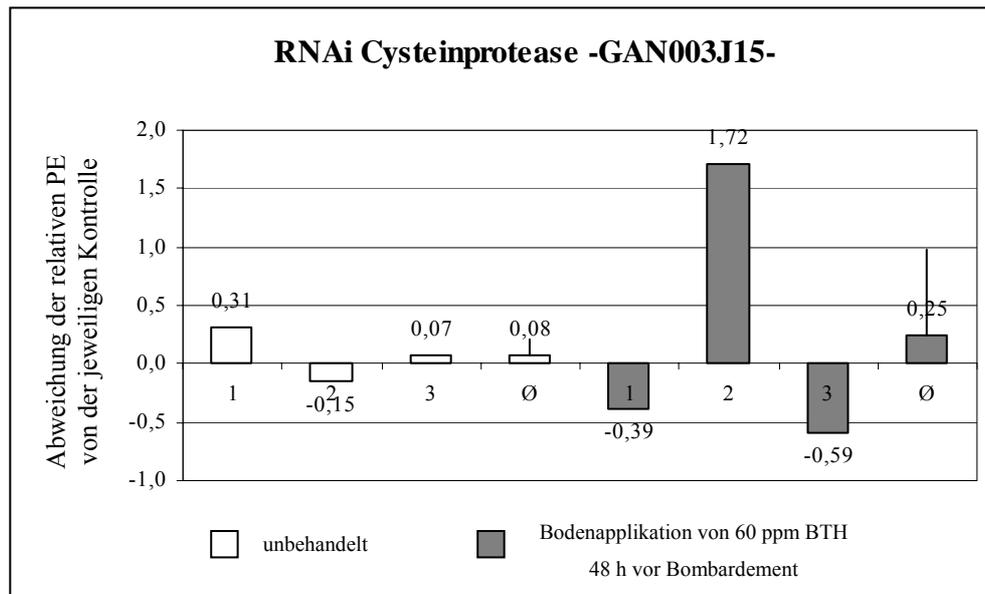
### 3.3.1 Kandidatengene aus den *Macroarray*-Analysen

Fünf Gene aus der untersuchten GAN-cDNA Bank aus BTH-induzierten Epidermiszellen wurden als BTH-induziert bestätigt. Vor der Untersuchung des Einflusses der Gene auf die Mehltau-Resistenz wurden sie hinsichtlich ihrer Expression in der Epidermis überprüft. Durch *two step* RT-PCRs konnte für alle fünf Gene die epidermale Expression gezeigt werden (ohne Abbildungen). Um ihre Funktion im Pathosystem Gerste/*Bgh* zu überprüfen, wurden die Translation der entsprechenden Gene durch RNA Interferenz ausgeschaltet.

#### 3.3.1.1 Funktionelle Charakterisierung einer Cysteinprotease -GAN003J15-

Die Cysteinprotease GAN003J15 zeigt die höchste Homologie ( $2e^{-17}$  nach dem BlastX Algorithmus, ALTSCHUL *et al.*, 1997) zu einer *fruit bromelain* Vorstufe aus Ananas (T10518). SAG12, eine Cysteinprotease aus *A. thaliana* wird im Zusammenhang mit dem Katabolismus und der Nährstoffmobilisierung während der Seneszenz diskutiert (LOHMAN *et al.*, 1994, NOH und AMASINO, 1999).

Der Einfluss des Ausschaltens der Cysteinprotease auf die Interaktion von IngridWt mit dem Echten Gerstenmehltaupilz wurde mikroskopisch ausgewertet (Abb. 3.6). In drei Experimenten wurden Primärblätter von unbehandelten Pflanzen verwendet, und in drei weiteren unabhängigen Experimenten wurden Primärblätter von Pflanzen verwendet, die 48 Stunden vor dem Partikelbombardement mit 60 ppm BTH behandelt wurden. Die Penetrationsrate errechnet sich als Verhältnis der transformierten Zellen mit Haustorien durch die Anzahl aller attackierten *Gfp*-Zellen. Die Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse der transienten Transformation.



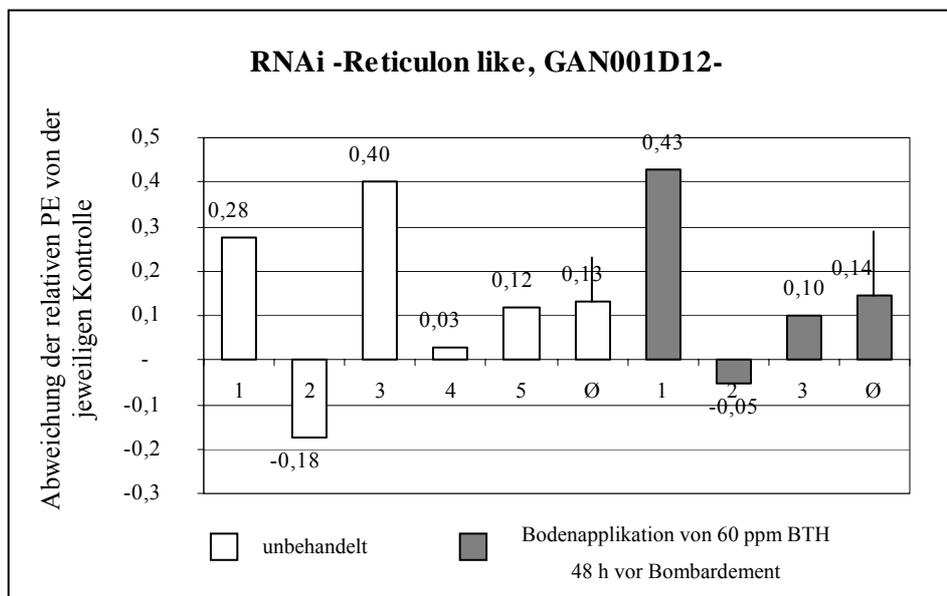
**Abb. 3.6:** Einfluss des *knock downs* einer Cysteinprotease auf die Resistenz in Gerste gegenüber *Bgh*. Die Epidermis von unbehandelten (weiße Säulen) und BTH-behandelten (grau hinterlegte Säulen) Primärblättern (cv. IngridWt) wurde mit doppelsträngiger RNA der Cysteinprotease bzw. von *Tr* als Kontrolle jeweils in Kotransformation mit dem Reportergen *Gfp* in pGY-1 beschossen. Dargestellt ist die Abweichung der relativen Penetrationseffizienz (PE) von derjenigen der jeweiligen Kontrolle. Die Penetrationseffizienz ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgebildeten Haustorien zur Summe der Interaktionsstellen. Die Balken geben den Standardfehler an.

Für die drei Experimente mit unbehandelten Primärblättern wurden pro Variante zwischen 68 und 101 Interaktionen ausgewertet. Diese Experimente zeigten, dass das Ausschalten der Cysteinprotease keine eindeutigen Veränderungen der Penetrationseffizienz (PE) im Vergleich zur Kontrolle bewirkte. In zwei Experimenten wurde die PE durch das Ausschalten um 31 % bzw. um 7 % erhöht, während in einem Experiment die PE im Vergleich zur Kontrolle um 15 % gesenkt wurde. Der *knock down* der Cysteinprotease ergab im Mittel eine nicht signifikant erhöhte Anfälligkeit von 8 %. Daraufhin wurden ebenfalls drei unabhängige Experimente mit BTH-behandelten Blättern durchgeführt, in denen 59 bis 86 Interaktionen pro Variante ausgewertet wurden. Hier waren die beobachteten Abweichungen der Penetrationsrate von der Kontrolle größer, und ergaben im Mittel eine um 25 % erhöhte Anfälligkeit, die aber verursacht durch schwankende Effekte nicht signifikant war. In zwei Experimenten wurde die PE durch den *knock down* um 39 % bzw. um 59 % gesenkt, während die in einem dritten Experiment um 172 % erhöht wurde.

### 3.3.1.2 Funktionelle Charakterisierung eines Reticulon-ähnlichen Gens -GAN001D12-

Die Reticulon-Proteine wurden zuerst in höheren Vertebraten beschrieben (VAN DE VELDE *et al.*, 1994). Es handelt sich um 200-1200 Aminosäuren große Proteine, die mit dem Endoplasmatischen Reticulon assoziiert sind.

Es wurden fünf unabhängige transiente Transformationen mit unbehandelten Primärblättern durchgeführt, bei denen zwischen 62 und 91 Interaktionen pro Variante ausgewertet wurden. Drei voneinander unabhängige Experimente wurden mit Primärblättern von Ingrid Wt-Pflanzen durchgeführt, die 48 Stunden vor dem Partikelbombardement mit 60 ppm BTH behandelt wurden. Hier wurden pro Variante zwischen 57 und 70 Interaktionen ausgewertet. Die Abbildung 3.7 zeigt die Ergebnisse der Versuche.



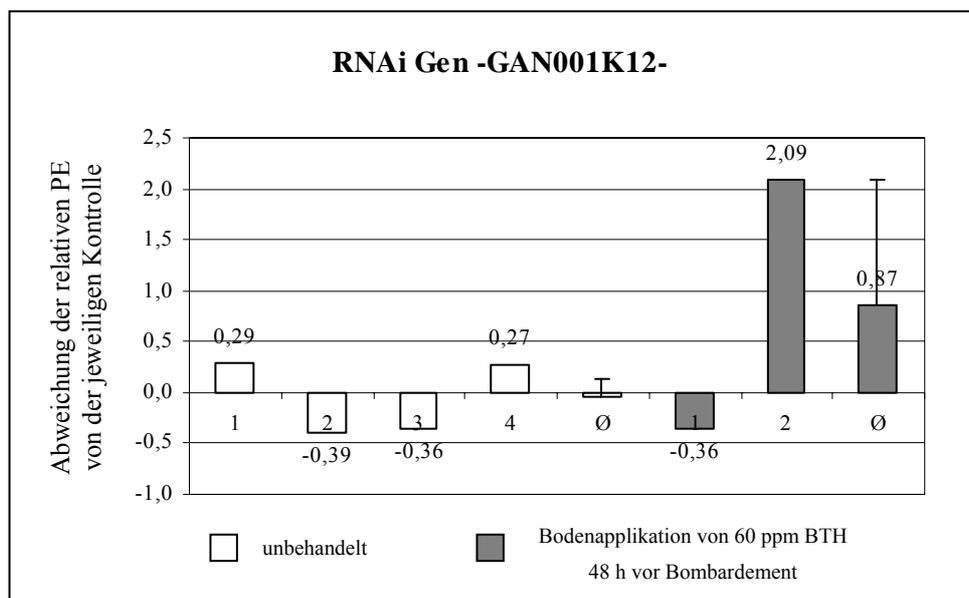
**Abb. 3.7:** Einfluss des *knock downs* eines Reticulon-like Gens auf die Resistenz in Gerste gegenüber *Bgh*. Die Epidermis von unbehandelten (weiße Säulen) und BTH-behandelten (grau hinterlegte Säulen) Primärblättern (cv. IngridWt) wurde mit doppelsträngiger RNA eines Reticulon-like Gens bzw. von *Tr* als Kontrolle jeweils in Kotransformation mit dem Reporter gen *Gfp* in pGY-1 beschossen. Dargestellt ist die Abweichung der relativen Penetrationseffizienz (PE) von derjenigen der jeweiligen Kontrolle. Die Penetrationseffizienz ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgebildeten Haustorien zur Summe der Interaktionsstellen. Die Balken geben den Standardfehler an.

Die fünf Experimente mit unbehandelten Primärblättern zeigten teilweise recht starke Effekte. In vier der fünf Experimente bewirkte das Ausschalten des Reticulon-like Gens eine zwischen 3 und 40 % erhöhte Anfälligkeit. In einem Experiment wurde die Penetrationsrate des Pilzes allerdings um 18 % reduziert. Der Mittelwert gibt eine um 13 % erhöhte

PE im Vergleich zur Kontrolle, diese ist jedoch nicht signifikant. Ähnlich sind die Ergebnisse der Experimente, in denen Blätter von BTH-behandelten Pflanzen verwendet wurden. In zwei Experimenten bewirkte der *knock down* des Gens eine erhöhte PE im Vergleich zur Kontrolle, während in einem Experiment eine 5 %ige Reduktion der Penetrationsrate erzielt wurde. Im Mittel sind diese Änderungen ebenfalls nicht signifikant.

### 3.3.1.3 Funktionelle Charakterisierung von GAN001K12

GAN001K12 zeigte in den *two step* RT-PCRs sehr starke und frühe Induktion durch die Applikation von BTH. Das Gen zeigt Homologie zu einem EST in der TIGR-Datenbank, der bislang allerdings nicht funktional charakterisiert ist. In vier unabhängigen transienten Transformationsexperimenten mit Primärblättern von unbehandelten Pflanzen mit jeweils zwischen 62 und 105 ausgewerteten Interaktionen pro Variante und zwei unabhängigen Experimente mit Blättern von BTH-behandelten Blättern, bei denen 64 bis 70 Interaktionen pro Variante ausgewertet wurden, wurde ein möglicher Einfluss auf die *Bgh*-Resistenz überprüft. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

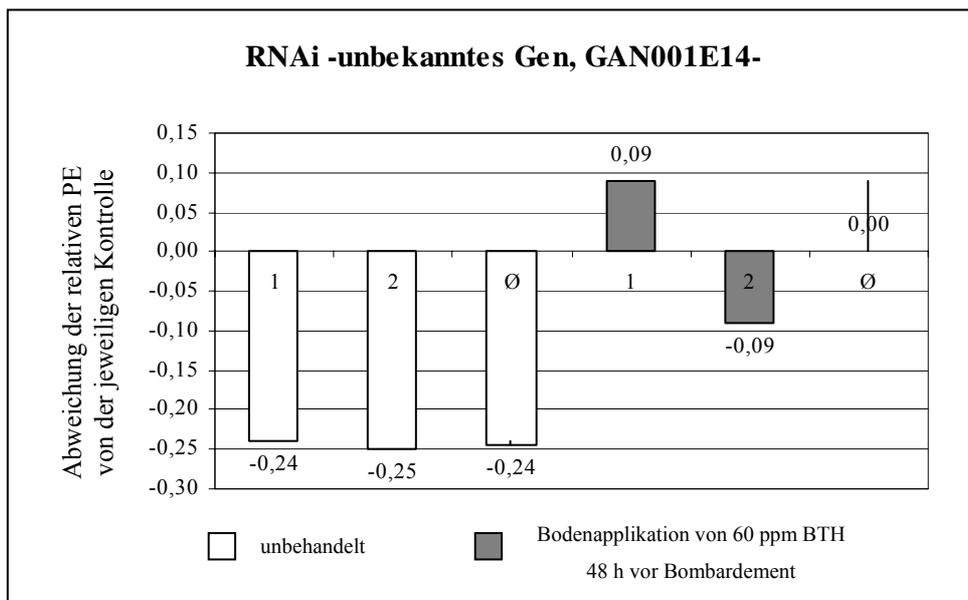


**Abb 3.8:** Einfluss des *knock downs* des Gens GAN001K12 auf die Resistenz in Gerste gegenüber *Bgh*. Die Epidermis von unbehandelten (weiße Säulen) und BTH-behandelten (grau hinterlegte Säulen) Primärblättern (cv. IngridWt) wurde mit doppelsträngiger RNA des Gens GAN001K12 bzw. von *Tr* als Kontrolle jeweils in Kotransformation mit dem Reportergen *Gfp* in pGY-1 beschossen. Dargestellt ist die Abweichung der relativen Penetrationseffizienz (PE) von derjenigen der jeweiligen Kontrolle. Die Penetrationseffizienz ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgebildeten Haustorien zur Summe der Interaktionsstellen. Die Balken geben den Standardfehler an.

Das transiente Ausschalten dieses Gens, das keine Homologie zu bereits charakterisierten Genen zeigt, hat in unbehandelten keinen signifikanten Effekt auf die Penetrationsrate von *Bgh*. Die beiden Experimente mit BTH-behandelten Blättern zeigten Effekte in entgegengesetzte Richtungen, so dass hier keine abschließende Aussage möglich ist.

### 3.3.1.4 Funktionelle Charakterisierung von GAN001E14

Für das chemisch induzierbare Gen GAN001E14 konnte bislang kein sequenzhomologes Gen, dem eine Funktion zugewiesen werden konnte, identifiziert werden. Zur Überprüfung seiner Funktion in der Gerste/*Bgh*-Interaktion wurde das Gen durch RNA Interferenz transient ausgeschaltet. Es wurden jeweils zwei Experimente mit unbehandelten bzw. mit BTH-behandelten Primärblättern durchgeführt. In den Experimenten wurden zwischen 54 und 123 Interaktionen pro Variante ausgewertet. Die Ergebnisse sind Abbildung 3.9 dargestellt.

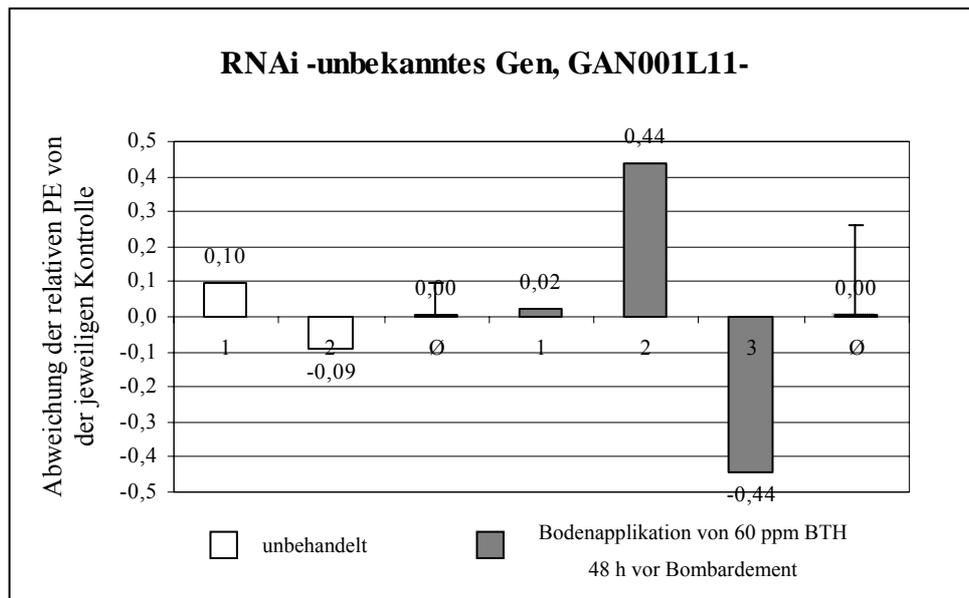


**Abb 3.9:** Einfluss des *knock downs* des Gens GAN001E14 auf die Resistenz in Gerste gegenüber *Bgh*. Die Epidermis von unbehandelten (weiße Säulen) und BTH-behandelten (grau hinterlegte Säulen) Primärblättern (cv. IngridWt) wurde mit doppelsträngiger RNA des Gens GAN001E14 bzw. von *Tr* als Kontrolle jeweils in Kotransformation mit dem Reportergen *Gfp* in pGY-1 beschossen. Dargestellt ist die Abweichung der relativen Penetrationseffizienz (PE) von derjenigen der jeweiligen Kontrolle. Die Penetrationseffizienz ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgebildeten Haustorien zur Summe der Interaktionsstellen. Die Balken geben den Standardfehler an.

Das transiente Ausschalten dieses Gens mit unbekannter Funktion zeigte in zwei durchgeführten Experimenten eine Verringerung der Penetrationsrate um etwa 25 % in unbehandelten Blättern, hatte jedoch keinen Effekt in BTH-behandelten Blättern.

### 3.3.1.5 Funktionelle Charakterisierung von GAN001L11

GAN001L11, ein weiteres chemisch induzierbares Gen, das durch die *Macroarray*-Analysen identifiziert wurde, besitzt keine Homologien zu Genen, deren Funktion bekannt ist. Es wurde untersucht, ob das transiente Ausschalten dieses Gens durch RNA Interferenz einen Einfluss auf die Gerste/*Bgh*-Interaktion hat. Dazu wurden zwei Versuche mit unbehandelten Primärblättern und drei mit BTH-behandelten Primärblättern des Kultivars IngridWt durchgeführt. Pro Experiment und Variante wurden zwischen 51 und 123 Interaktionen ausgewertet. Abbildung 3.10 zeigt die Ergebnisse der Versuche.



**Abb 3.10: Einfluss des *knock downs* des Gens GAN001L11 auf die Resistenz in Gerste gegenüber *Bgh*.** Die Epidermis von unbehandelten (weiße Säulen) und BTH-behandelten (grau hinterlegte Säulen) Primärblättern (cv. IngridWt) wurde mit doppelsträngiger RNA des Gens GAN001L11 bzw. von *Tr* als Kontrolle jeweils in Kotransformation mit dem Reporter gen *Gfp* in pGY-1 beschossen. Dargestellt ist die Abweichung der relativen Penetrationseffizienz (PE) von derjenigen der jeweiligen Kontrolle. Die Penetrationseffizienz ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgebildeten Haustorien zur Summe der Interaktionsstellen. Die Balken geben den Standardfehler an.

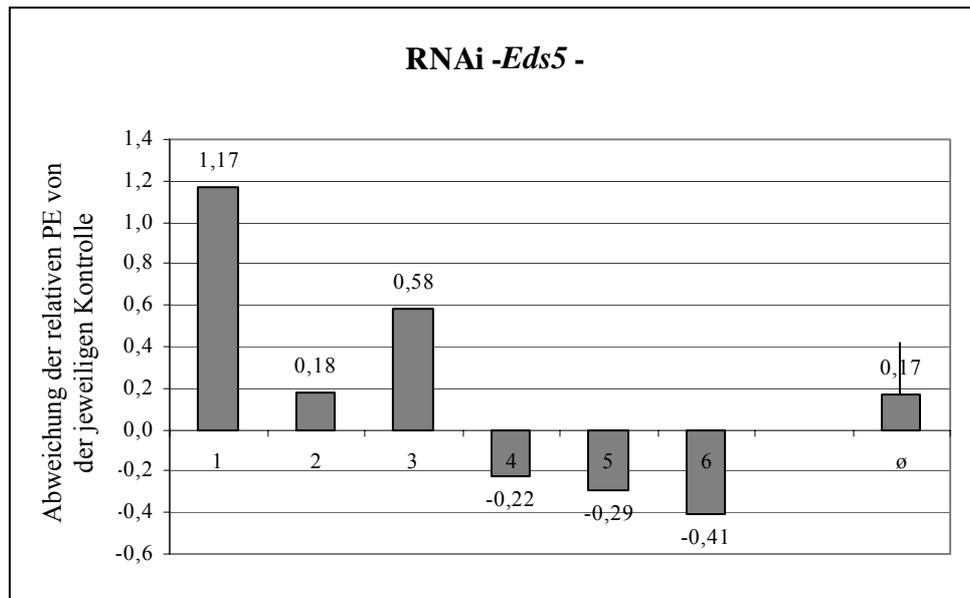
Das Ausschalten des Gens GAN001L11 zeigt in unbehandelten Blättern in beiden Versuchen nur sehr schwache Effekte auf die Interaktion mit *Bgh*. In Blättern, die 48 Stunden vor dem Beschuss mit BTH behandelt wurden, sind keine bzw. mit jeweils 44 % Effekte sowohl in Richtung Anfälligkeit als auch zu erhöhter Resistenz beobachtet worden. Mittelt

man jeweils die Ergebnisse der einzelnen Versuche, hat der *knock down* des Gens keinen Effekt auf die Resistenzausprägung der Gerste gegenüber *Bgh*.

### 3.3.2 Funktionsanalysen weiterer Kandidatengene

#### 3.3.2.1 Funktionelle Charakterisierung von *HvEds5*

EDS5 ist eine wichtige Komponente der SA-Signalkette in *A. thaliana*. Nach Pathogeninfektion kann in der *eds5*-Mutante keine SA akkumuliert werden (NAWRATH *et al.*, 2002). EDS5 codiert für ein Protein, das hohe Homologie zu MATE-Transportern (*multidrug and toxin extrusion*) aufweist. Mit den Primern HvEDS5\_5' und HvEDS5\_3' (siehe Tabelle 8.1 im Anhang), die von einem EST aus Gerste mit hoher Homologie zu *Eds5* aus *A. thaliana* (GenBank *Acc. Nr.*: AF416569) abgeleitet wurden, wurde aus einer SMART<sup>®</sup>-cDNA-Bank (zur Verfügung gestellt von Carin Jansen, IPAZ Gießen) ein 313 bp großes Fragment mittels PCR amplifiziert. Es wurde eine Standard-PCR mit 35 Zyklen und einer *annealing*-Temperatur von 56 °C durchgeführt. Das Pflanzenmaterial zur Herstellung der cDNA-Bank stammte von sieben Tage alten IngridWt-Keimlingen, die sechs Stunden nach der Inokulation mit *Bgh* der Rasse A6 geerntet wurden. Das PCR-Produkt wurde nach gelelektrophoretischer Trennung aus dem Gel extrahiert, in pGEM<sup>®</sup>-T ligiert, in DH5 $\alpha$ -Zellen kloniert und sequenziert. Die Sequenz des Gerstenhomologs findet sich im Anhang. Dieses Fragment hat nach dem BLASTX Algorithmus (ALTSCHUL *et al.*, 1997) eine Homologie von  $2e^{-34}$  zu EDS5 aus *A. thaliana* (*Acc. Nr.*: AAM63262) und zeigt damit auf Proteinebene eine hohe Homologie. Versuche mittels RACE eine Gersten *full length* cDNA von *HvEds5* zu klonieren, schlugen fehl. Deshalb konnte nur der *knock down* des Gens im transienten *Assay* überprüft werden. Da in *Arabidopsis* *eds5*-Mutanten zwar anfälliger sind, jedoch weiterhin BTH-induzierbar, (CHANDRA-SHEKARA *et al.*, 2004) wurden die Gerstenpflanzen für die RNAi-Experimente nicht mit BTH induziert. Die Ergebnisse des transienten *knock downs* von *Eds5* in Gerste sind in Abbildung 3.11 dargestellt.



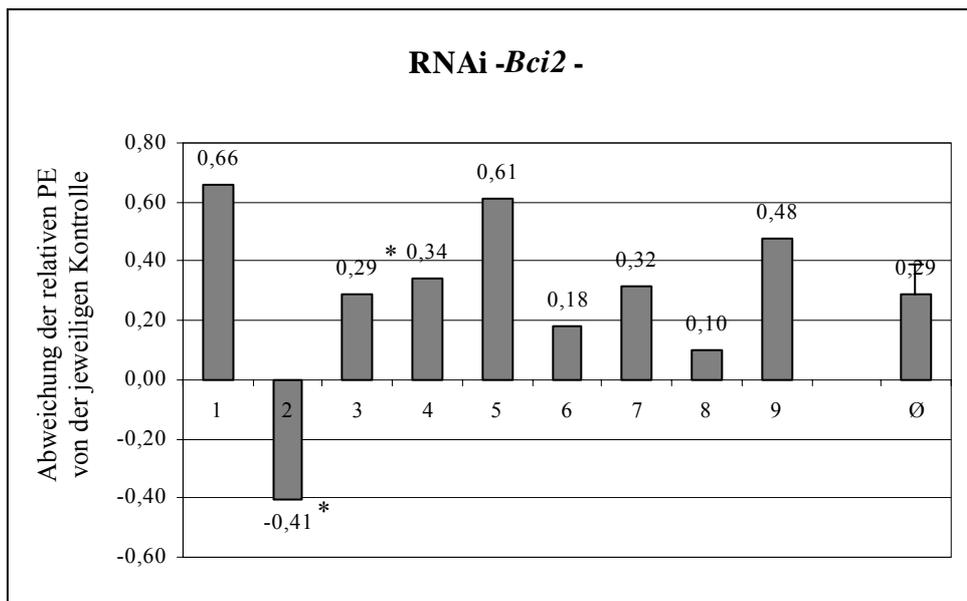
**Abb. 3.11: Einfluss des knock downs von *Eds5* auf die Resistenz in Gerste gegenüber *Bgh*.** Die Epidermis von unbehandelten Primärblättern (cv. IngridWt) wurde mit doppelsträngiger RNA von *Eds5* bzw. von *Tr* als Kontrolle jeweils in Kotransformation mit dem Reportergen *Gfp* in pGY-1 beschossen. Dargestellt ist die Abweichung der relativen Penetrationseffizienz (PE) von derjenigen der jeweiligen Kontrolle. Die Penetrationseffizienz ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgebildeten Haustorien zur Summe der Interaktionsstellen. Die Balken geben den Standardfehler an.

Wie Abbildung 3.11 zeigt konnte in sechs unabhängigen Versuchen, in denen zwischen 64 und 100 Interaktionen pro Variante ausgewertet wurden, kein signifikanter Effekt des transienten *knock downs* von *HvEds5* auf die Resistenz von Gersten-Primärblättern gegenüber *Bgh* festgestellt werden.

### 3.3.2.2 Funktionelle Charakterisierung von *Bci2*

*Bci2* wurde als ein durch DCINA induzierbares Gen durch subtraktive Suppressionshybridisierung von BEBER *et al.* (2000) identifiziert. Mit den Primern 5BCI2 und 3BCI2 (siehe Tabelle 8.1 im Anhang) wurde aus einer Gersten-cDNA-Bank mittels PCR ein 414 bp großes Fragment isoliert. Die cDNA-Bank wurde von Carin Jansen, IPAZ Gießen erstellt und zur Verfügung gestellt. Sie wurde aus Blättern des Gerstenkultivars Manchuria generiert, die 24 Stunden nach der Applikation von BTH geerntet wurden. Die nachfolgende Sequenzierung zeigte, dass es sich um ein bislang unbekanntes Thionin handelt, das unter der *Acc. Nr.* AJ508712 veröffentlicht wurde. Die Sequenz von *Bci2* findet sich im Anhang. Es zeigt auf Nukleotidebene die höchste Ähnlichkeit zu einem Thionin (*Acc. Nr.*: M19048; GAUSING, 1987).

Das PCR-Produkt wurde zur Herstellung von doppelsträngiger RNA in pGEM<sup>®</sup>-T ligiert. Für den transienten *knock down* wurden fünf Tage alte Gerstenkeimlinge der Kultivare Pallas und IngridWt mit 60 ppm BTH per Bodenapplikation behandelt. Die Primärblätter der Pflanzen wurden mit der doppelsträngigen RNA von *Bci2* bzw. von *Tr* (Kontrolle) zusammen mit dem Reportergen *Gfp* in pGY1 beschossen. Die Inokulation erfolgte vier Stunden nach dem Beschuss und die mikroskopische Auswertung wurde zwei Tage später durchgeführt.



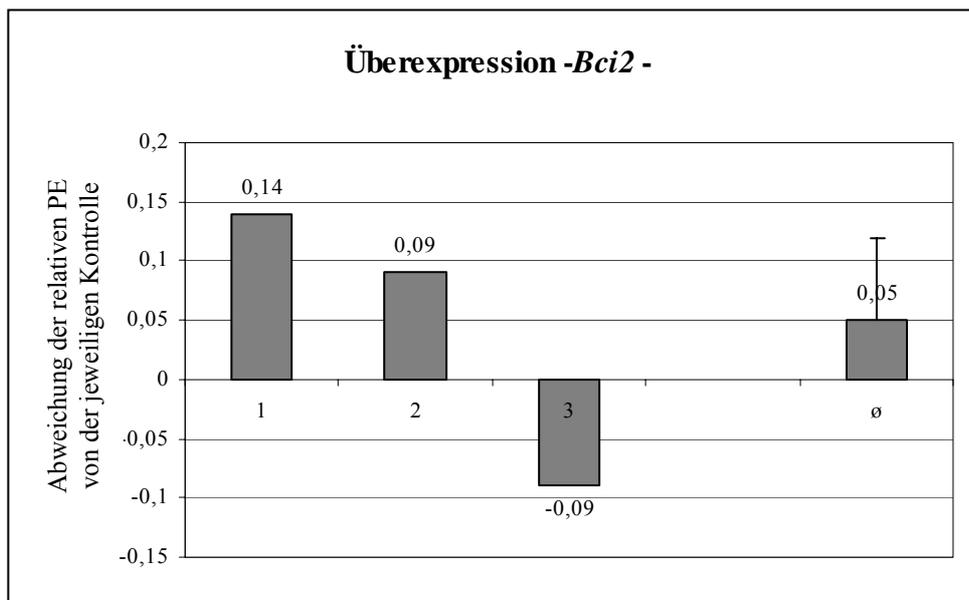
**Abb. 3.12: Einfluss des knock downs von *Bci2* auf die Resistenz von Gerste gegenüber *Bgh*.** Fünf Tage alte Gerstenpflanzen (cv. Pallas bzw. IngridWt\*) wurden per Bodenapplikation mit 60 ppm BTH behandelt. 48 hai wurden die Primärblätter mit doppelsträngiger RNA von *Bci2* bzw. von *Tr* als Kontrolle jeweils in Kotransformation mit dem Reportergen *Gfp* in pGY-1 beschossen. Dargestellt ist die Abweichung der relativen Penetrationseffizienz (PE) von derjenigen der jeweiligen Kontrolle. Die Penetrationseffizienz ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgebildeten Haustorien zur Summe der Interaktionsstellen. Die Balken geben den Standardfehler an.

In neun unabhängigen Experimenten mit jeweils 52 bis 96 ausgewerteten Interaktionen pro Variante konnte gezeigt werden, dass der transiente *knock down* von *Bci2* nach vorheriger BTH-Induktion zu einer Erhöhung der Penetrationsrate im Vergleich zur Kontrolle führt. Die Signifikanz des Ergebnisses wurde mit einem gepaarten zweiseitigen T-Test bestätigt ( $p=0,012$ ).

Zur Kontrolle wurden zwei Experimente mit unbehandelten Primärblättern durchgeführt. In beiden Experimenten konnte nur eine minimale Veränderung der Resistenz um 1 % bzw. um 9,2 % gezeigt werden (ohne Abbildung). Beide Werte werden als versuchsbe-

dingte Schwankung angesehen. Somit konnte durch den *knock down* von *Bci2* ohne vorherige BTH-Applikation kein signifikanter Einfluss auf die Resistenzausprägung der Gerste gegenüber *Bgh* festgestellt werden.

Zur Überexpression wurde das Gen mit um BamHI und PaeII Schnittstellen verlängerten Primern BamBci2 und PaeIIBci2 (siehe Tabelle 8.1 im Anhang) aus der oben beschriebenen cDNA-Bank isoliert. Das Fragment wurde in pGEM<sup>®</sup>-T ligiert und kloniert. Über die eingefügten Schnittstellen wurde das Fragment in pGY1 eingefügt. Das so erhaltene Plasmid pGY1*Bci2* wurde für Überexpressionsstudien verwendet. Primärblätter von sieben Tage alten Gerstenkeimlingen (cv. Pallas) wurden mit pGY1*Bci2* zusammen mit pGY1*Gfp* durch Partikelbombardement transformiert. Als Kontrolle dienten Blätter, die mit pGY1 ohne *Bci2* zusammen mit dem Reporterplasmid transformiert wurden. Die Ergebnisse der Überexpressionsstudien sind in Abbildung 3.13 gezeigt.



**Abb. 3.13: Einfluss der Überexpression von *Bci2* auf die Resistenz in Gerste gegenüber *Bgh*** Die Epidermis von Primärblättern (cv. Pallas) wurde mit pGY1*Bci2* bzw. leerem pGY1-Vektor als Kontrolle jeweils in Kotransformation mit dem Reportergen *Gfp* in pGY-1 beschossen. Dargestellt ist die Abweichung der relativen Penetrationseffizienz (PE) von derjenigen der jeweiligen Kontrolle. Die Penetrationseffizienz ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgebildeten Haustorien zur Summe der Interaktionsstellen. Die Balken geben den Standardfehler an.

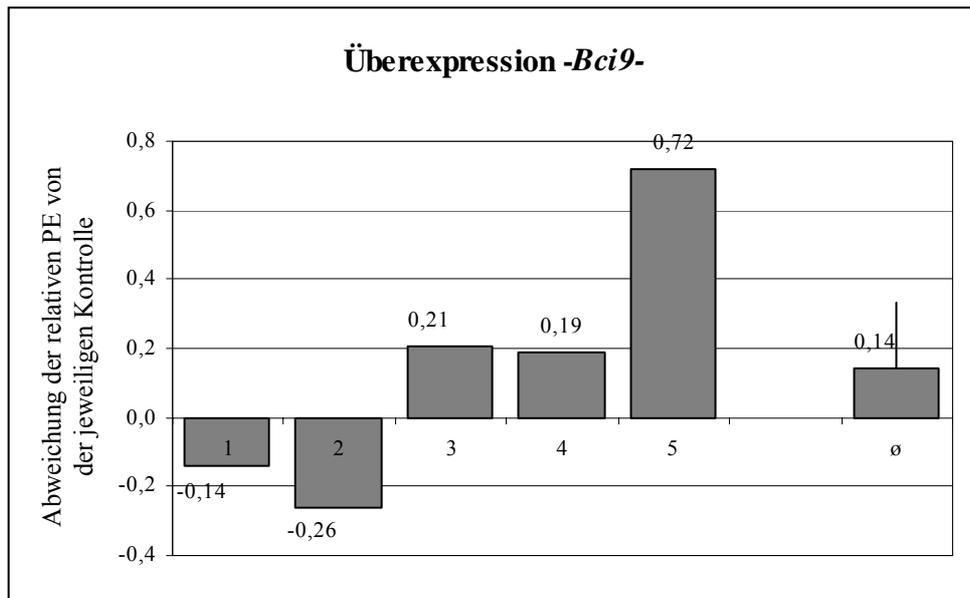
Die Überexpression von *Bci2* in der Epidermis von Gerstenprimärblättern zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Resistenzausprägung der Gerste gegenüber *Bgh*. In drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwischen 59 und 81 ausgewerteten Interaktionen pro

Variante konnten jeweils nur geringe Abweichungen der Penetrationseffizienz im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

### **3.3.2.3 Funktionelle Charakterisierung von *Bci9***

*Bci9* (Acc. Nr.: AJ250665), ein Gen mit hoher Homologie zu einer Apyrase wurde ebenfalls von BEBER *et al.* (2000) isoliert. Apyrasen (EC 3.6.1.5) sind Diphosphohydrolasen und als mögliche Funktionen in Pflanzen werden die Mobilisierung von Phosphat und die Detoxifizierung von Xenobiotica diskutiert (THOMAS *et al.*, 1999 und 2000).

Die Klonierung des Gens in pGEM<sup>®</sup>-T erfolgte von einem RACE-Produkt, das wahrscheinlich die komplette Sequenz des offenen Leserasters des Gens enthält. Die RACE-Reaktion wurde mit dem Marathon<sup>™</sup> RACE Kit von BD Biosciences Clontech, Heidelberg unter Verwendung des Primers inv.BCI9 5' durchgeführt. Das angenommene Startcodon wurde nur über Sequenzvergleiche identifiziert, da die 5'-Sequenz kein Stop-Codon vor dem postulierten Startcodon enthält. Das Gen wurde über die *NcoI*-Schnittstellen aus pGEM<sup>®</sup>-T ausgeschnitten und unter Verwendung von Klenow Fragment (MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Verwendung nach Angaben des Herstellers) aufgefüllt. Das entstandene Fragment wurde über die *SmaI*-Schnittstelle in pGY1 inkloniert und die Orientierung überprüft. Die beschriebenen Klonierungen wurden von Bogdan Balta und Uta Geldermann (IPAZ Gießen) durchgeführt. Das Plasmid wurde zur transienten Überexpression von *Bci9* in Gerstenprimärblättern des Kultivars Pallas verwendet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind Abbildung 3.14 dargestellt.



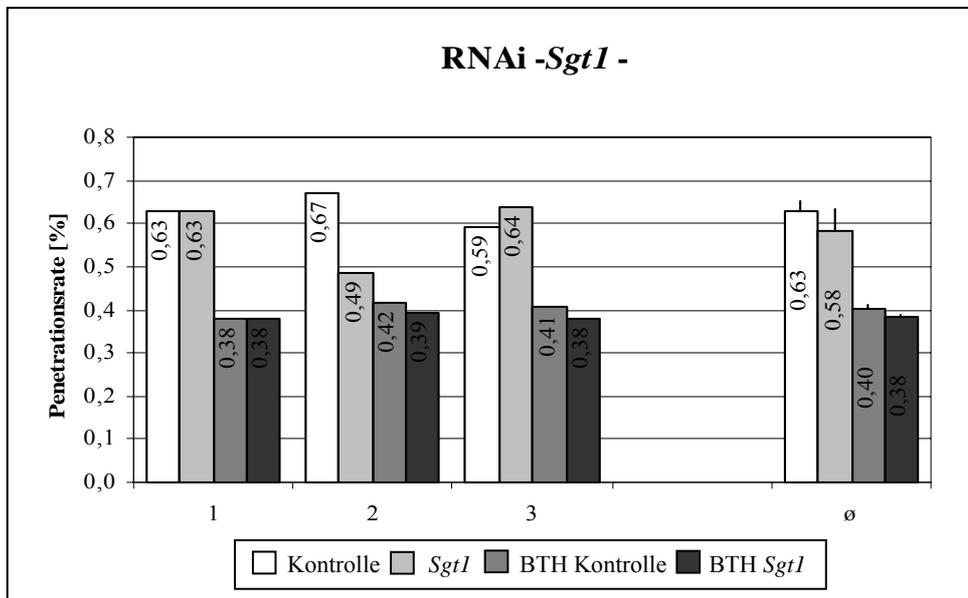
**Abb 3.14: Einfluss der Überexpression von *Bci9* auf die Resistenz in Gerste gegenüber *Bgh*.** Die Epidermis von Primärblättern (cv. Pallas) wurde mit pGY1*Bci9* bzw. mit leerem pGY1-Vektor als Kontrolle jeweils in Kotransformation mit dem Reportergen *Gfp* in pGY-1 beschossen. Dargestellt ist die Abweichung der relativen Penetrationseffizienz (PE) von derjenigen der jeweiligen Kontrolle. Die Penetrationseffizienz ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgebildeten Haustorien zur Summe der Interaktionsstellen. Die Balken geben den Standardfehler an.

Die Überexpression von *Bci9* einem Gen mit hoher Homologie zu Apyrasen hat wie Abbildung 3.14 zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Resistenz der Gerste gegenüber *Bgh*. Es wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt, mit jeweils 64 bis 151 ausgewerteten Interaktionen. Die ersten beiden Experimente zeigten einen leichten Effekt in Richtung erhöhter Resistenz, während die drei nachfolgenden Experimente einen leichten bis sehr starken Effekt in Richtung erhöhter Suszeptibilität zeigen. Die Werte ergeben im Mittel einen um 14 % erhöhte Penetrationsrate durch die Überexpression von *Bci9*, allerdings ist dieser Mittelwert mit einem hohen Standardfehler behaftet.

#### 3.3.2.4 Funktionelle Charakterisierung von *HvSgt1* in Abhängigkeit von der chemisch Induzierten Resistenz

Das Gerstengen *Sgt1* (Acc. Nr. AF439974) wurde mit den Primern 5'SGT1Bam und 3'SGT1Pst aus einer Gersten cDNA-Bank (siehe Kapitel 3.3.2.2) mittels PCR amplifiziert und in pGEM<sup>®</sup>-T ligiert. Das Produkt hatte eine Größe von 1201 bp und wurde durch Sequenzierung überprüft. Es diente der Herstellung von dsRNA für den transienten *knock down* des Gens. Es wurden unbehandelte bzw. mit 60 ppm BTH behandelte Primärblätter des Kultivars Pallas durch Partikelbombardement transformiert. Nach zwei Tagen wurden

die Primärblätter mit dsRNA von *Sgt1* und *Tr* zusammen mit pGY1*Gfp* als Reporterplasmid beschossen. Nach vier Stunden wurden die Blätter mit *Bgh* der Rasse A6 inokuliert. Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung, die zwei Tage später erfolgte, sind in Abbildung 3.15 gezeigt.



**Abb 3.15: Einfluss des knock downs von *Sgt1* auf die Resistenz von Gerste gegenüber *Bgh* in Abhängigkeit von chemisch induzierter Resistenz.** Fünf Tage alte Gerstenpflanzen (cv. Pallas) wurden per Bodenapplikation mit 60 ppm BTH bzw. mit WG behandelt. 48 Stunden nach der Behandlung wurden die Primärblätter mit doppelsträngiger RNA von *Sgt1* bzw. von *Tr* (Kontrolle) jeweils in Kotransformation mit dem Reporter gen *Gfp* in pGY-1 beschossen. Dargestellt ist die Abweichung der relativen Penetrationseffizienz (PE) von derjenigen der jeweiligen Kontrolle. Die Penetrationseffizienz ergibt sich aus dem Verhältnis der ausgebildeten Haustorien zur Summe der Interaktionsstellen. Die Balken geben den Standardfehler an.

In drei unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der transiente *knock down* von *Sgt1* keinen Einfluss auf die Penetrationsrate von *Bgh* der Rasse A6 in Gerstenprimärblättern der Sorte Pallas hat. Im direkten Vergleich zeigte sich eine Reduktion der PE durch BTH um 36 %, da in diesen Experimenten sowohl BTH-behandelte als auch unbehandelte Pflanzen parallel verwendet wurden. Es wurden pro Experiment und Variante zwischen 63 und 102 Interaktionen ausgewertet. Die Effizienz der dsRNA wurde durch den *knock down* eines SGT1-GFP-Fusionsproteins durch Ruth Eichmann, IPAZ Gießen bestätigt.

---

## 4 Diskussion

Pflanzen verfügen über verschiedene Abwehrstrategien, die ihnen zu einer Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen verhelfen. Neben biotisch induzierten Formen der Resistenz kann durch die Applikation von chemischen Resistenzinduktoren wie DCINA oder BTH eine Erhöhung der Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen erzielt werden. Diese Form der Induzierten Resistenz ist auch in Getreide beschrieben (KOGEL *et al.*, 1994; GÖRLACH *et al.*, 1996; SCHWEIZER *et al.*, 1997; MORRIS *et al.*, 1998, KOGEL und LANGEN, 2005). Während verschiedene Mutanten der genetisch vermittelten und der chemisch Induzierten Resistenz vor allem in *Arabidopsis thaliana* sehr viel zur Aufklärung der verschiedenen Signaltransduktionswege in dikotylen Pflanzen beigetragen haben, sind in monokotylen Pflanzen nur wenige der beteiligten Gene bekannt. Die vorliegende Arbeit soll zur Identifikation von Genen beitragen, die an der chemisch Induzierten Resistenz in Gerste beteiligt sind. Neben neu identifizierten Genen, sollen auch verschiedene Kandidatengene, darunter die als DCINA-induzierbar beschriebenen *Bci*-Gene (BEBER *et al.*, 2000), hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Resistenzausprägung gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz untersucht werden.

### 4.1 Untersuchung von *Bci4*-überexprimierenden Getreidepflanzen

Das Gen *Bci4* wurde durch eine suppressive Subtraktionshybridisierung von BEBER *et al.* (2000) als chemisch induzierbares Gen aus Gerste identifiziert. Die kodierende Sequenz besitzt nach dem BlastX Algorithmus (ALTSCHUL *et al.*, 1997) höchste Homologie zu einem putativen  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Protein aus Reis ( $6e^{-63}$ , *Acc. Nr.*: BAD46169) und einem putativen ABA-induzierten Protein aus *Cynodon dactylon*, dem Bermudagrass ( $2e^{-39}$ , *Acc. Nr.*: AAS48644). Für beide Proteine liegen keine weiteren Erkenntnisse über mögliche Funktionen vor. Hohe Homologie zeigt *Bci4* auch zu sogenannten Caleosinen aus *A. thaliana* und Sesam. Sie sind an Oleosomen und am Endoplasmatischen Reticulum lokalisiert und es wird eine Funktion bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Fusion von Membranen postuliert (NÆSTED *et al.*, 2000, FRANDBSEN *et al.*, 2001).

Die Expression von *Bci4* wird in Gerste durch chemische Resistenzinduktoren, wie BTH, DCINA und SA, aber auch durch MeJA induziert, jedoch deutlich schwächer. Ein Anstieg des endogenen Jasmonat-Spiegels durch die Behandlung mit Sorbitol, Verwundung oder Pathogenbefall führt nicht zu einer Akkumulation des *Bci4*-Transkripts. Neuere Untersu-

chungen zeigen, dass es auch durch abiotischen Salz- oder pH-Stress nicht zu einer Akkumulation des BCI4-Proteins kommt (WIESE *et al.*, 2004). Neben der Tatsache, dass keine anderen als die beschriebenen Phytohormone und Resistenzaktivatoren als Stimuli für die *Bci4*-Expression identifiziert werden konnten, macht seine unbekannte Funktion dieses Gen und seinen Promotor zu interessanten Kandidaten für die Transformation von Getreide.

Durch Verwendung des transienten Transformationsassays (siehe Kapitel 2.4) können Gene schnell und auch kostengünstig hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Resistenz gegenüber dem biotrophen Getreidemehltaupilz untersucht werden. Da, bedingt durch die Art der Transformation, die Expression des Transgens auf einzelne Epidermiszellen von jungen Blättern beschränkt bleibt, ist sie nur für wenige Pathosysteme anwendbar. Die Dauer der Expression des Transgens bleibt auf wenige Tage beschränkt, weshalb die Pathogenese in diesem Zeitraum abgeschlossen sein muss. Zudem muss der Besiedelungserfolg des Pathogens von der Interaktion mit einer einzelnen Epidermiszelle abhängen. Rostpilze sind z. B. ungeeignet, weil sie über Spaltöffnungen in den Interzellularraum eindringen und in Mesophyllzellen Haustorien ausbilden.

Zur Überprüfung der Funktion eines bestimmten Gens sind stabil transgene Pflanzen somit im Prinzip besser geeignet. Sie eröffnen die Möglichkeit den Einfluss des transformierten Gens in verschiedenen Geweben, aber auch während der unterschiedlichen Entwicklungsstadien einer Pflanze zu überprüfen. Da ihre Generierung sowohl arbeits- als auch zeitaufwendig ist, ist es sinnvoll durch transiente Transformation die Funktion von Genen zu überprüfen und so eine Vorauswahl für Kandidatengene für die stabile Transformation zu treffen. In Fällen in denen eine Generierung von stabil transgenen Pflanzen unmöglich ist, da die konstitutive Überexpression oder der *knock down* eines Gens letal ist, bleibt neben der Verwendung von induzierbaren Promotoren nur eine transiente Transformation zur Überprüfung der Funktion.

Das Gen *Bci4* wurde für die stabile Transformation von Gersten- und Weizenpflanzen ausgewählt, weil BEBER (2001) zeigen konnte, dass die transiente Überexpression dieses Gens die Penetrationsrate von *Bgh* im Kultivar IngridWt um 20- 50 % reduziert.

In Kooperation mit dem IPK Gatersleben wurden transgene Weizen- und Gerstenpflanzen erzeugt, die das *Bci4*-Gen unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais exprimieren sollen. Das T<sub>1</sub>-Saatgut aus Gatersleben wurde hinsichtlich der Überexpression von *Bci4* in den verschiedenen Linien analysiert und gleichzeitig das Resistenzverhalten der verschiedenen T<sub>1</sub>-Pflanzen untersucht.

#### 4.1.1 Nachweis des Transgens

Die transgenen Weizenlinien wurden durch Partikelbombardement generiert, was häufig zu einer Integration von mehreren Kopien des Transgens in das Genom der Pflanze führt. Durch die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation der Gerste erhält man dagegen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit nur eine integrierte Kopie des Transgens (BUDAR *et al.*, 1986). Kommt es zu einer Mendelschen Verteilung der Gene an die Nachkommenschaft, besitzen die transgenen Weizenpflanzen der T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Generation trotzdem meist noch mehrerer Kopien des Gens, während es bei heterozygoten Gerstenpflanzen mit nur einer integrierten Kopie des Transgens bei etwa 25 % der Nachkommenschaft zum Verlust des Transgens kommt. Andererseits kann die Integration von mehreren Kopien eines Gens zur *trans*-Inaktivierung und damit zum Verlust der Genexpression führen (STEINBIß, 1995). Da keine der T<sub>1</sub>-Pflanzen einen sichtbar veränderten Phänotyp zeigte, war es notwendig, für jede T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Pflanze, die hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens untersucht werden sollte, den transgenen Status und zusätzlich die Expression bzw. Translation von *Bci4* zu überprüfen.

Da jede einzelne Pflanze sowohl hinsichtlich der Expression des Transgens, als auch bezüglich ihrer Resistenz gegenüber *Bgh/Bgt* getestet werden musste und anschließend noch zur Gewinnung von Saatgut in die Vermehrung gegeben werden musste, stand nur wenig oder älteres Blattmaterial zur Verfügung. Die Inokulation von ganzen Pflanzen war ebenfalls nicht möglich. Bedingt durch die hohe Inokulationsdichte wäre auch durch Fungizidbehandlung unmittelbar nach der Auswertung keine vollständige Abtötung des Pilzes möglich. Dadurch würden gesunde Pflanzen in der gleichen Klimakammer infiziert werden und ein früher starker Befall der Pflanzen vermindert die Qualität des Saatguts. Es wurden deshalb so genannte Blattsegmenttests durchgeführt, bei denen abgeschnittene Blätter inokuliert wurden.

Üblicherweise kann man transgene Samen unter Selektionsdruck in Bezug auf das verwendete Antibiotika-Resistenzgen anziehen, um transgene von nicht transgenen Samen zu unterscheiden. Die Oberfläche der Samen wird sterilisiert und diese anschließend auf speziellem Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Nicht transgene Samen keimen unter diesen Bedingungen nicht oder deutlich schlechter aus. Diese Form der Anzucht differiert jedoch stark zu der normalen Anzucht in Erde, und es ist schwer auszumachen, welche physiologischen Unterschiede zu normal angezogenen Pflanzen auftreten. Für nachfolgende Pathogen-Resistenztests werden deshalb Kontrollpflanzen benötigt, die

das Transgen nicht überexprimieren. Oft werden deshalb Pflanzen nur mit dem Vektor ohne das entsprechende Kandidatengen gleichzeitig mit den Kandidatengen-Pflanzen transformiert. Diese Pflanzen enthalten dann zwar nicht das Kandidatengen, aber die gleichen Resistenzgene. Da keine parallel hergestellten Kontrollpflanzen zur Verfügung standen, war die Selektion auf Antibiotika keine praktikable Methode. Stattdessen sollten die jeweils nicht-transgene Eltersorte als Kontrollen verwendet werden.

Die schnellste und einfachste Methode zum Nachweis eines Transgens ist die PCR. Durch sie kann man die integrierten Transgene bereits aus kleinsten Materialmengen bestimmen. Allerdings kommt es leicht zu Kontaminationen, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können (STEINBIß, 1995). Die verwendeten Primer sollten entweder die verwendeten Resistenzgene (Hygromycinresistenzgen *hyg<sup>R</sup>* in Gerste oder Kanamycinresistenzgen *kan<sup>R</sup>* in Weizen) oder das Kandidatengen *Bci4* nachweisen. Da in diesem Fall auch die nicht transgenen Pflanzen positive Signale zeigten, die auch durch versuchte Optimierung der Versuchsbedingungen nicht verhindert werden konnten, war ein schneller PCR-Nachweis in diesem System nicht anwendbar.

Eine genauere Methode ist die Southern Analyse, mit deren Hilfe die Anzahl der integrierten Kopien bestimmt werden kann. Zur Durchführung wird jedoch eine größere Menge pflanzlicher DNA benötigt, sodass dazu nur ältere Pflanzen mit genügend Blattmaterial verwendet werden konnten. Da sich aus älteren Blättern nach eigener Erfahrung schlechter DNA extrahieren und diese sich auch schlechter im Gel auftrennen lässt, waren die Ergebnisse der durchgeführten Southern Analysen nicht aussagekräftig.

Northern und Western Analysen haben die höchste Aussagekraft, da sie nicht nur den transgenen Status einer Pflanze überprüfen, sondern auch eine erfolgreiche Expression bzw. Translation des Transgens zeigen und eventuell auftretende *silencing* Effekte ausschließen können. Wiederum handelt es sich um recht aufwendige Methoden und für die Western Analyse wird eine relativ große Menge Gesamtprotein benötigt.

Das für die Western Analysen zur Verfügung stehende Antiserum zeigte jedoch besonders in älteren Pflanzen starke Kreuzreaktionen mit mehreren Proteinen gleicher oder sehr ähnlicher Größe, welche eventuelle Signale durch die Expression des Transgens überlagerten. Da das Transgen aus Gerste stammt, könnte dies auf das Vorhandensein von weiteren *Bci4*-ähnlichen Genen in Weizen und Gerste zurückzuführen sein. Deshalb war eine genaue Aussage bezüglich der Translation des Transgens in diesem Fall nicht möglich.

So blieb die Methode der Northern Analyse, die die Expressionsrate eines Gens zeigt. Mit dieser Methode konnte das *Bci4*-Transkript spezifisch nachgewiesen werden. Es fanden

sich keine Signale in den Negativkontrollen, d.h. wie erwartet wurde in diesen Pflanzen ohne Induktion *Bci4* nicht exprimiert. Die Abbildung 3.4 zeigt die Transkriptakkumulation von *Bci4* in einer ausgewählten transgenen Linie. Die untersuchten transgenen Pflanzen zeigen unterschiedlich starke Transkriptakkumulationen, die durch homo- bzw. heterozygote Ausprägung oder der Integrationsort des Transgens bedingt sein könnten. Somit konnte durch die Northern Analysen sowohl der transgene Status der Pflanzen als auch die funktionale Transkription eindeutig nachgewiesen werden.

Um eine Abhängigkeit der Resistenz von der *Bci4*-Transkriptakkumulation zu untersuchen, wurden die dritten Blätter verschiedener Linien zur Extraktion der Gesamt-RNA verwendet, um die Expressionsrate von *Bci4* im Vergleich zu nicht transgenen Kontrollpflanzen zu überprüfen, während die ersten beiden Blätter der gleichen Pflanzen mit *Bgh* bzw. *Bgt* inokuliert und nach 48 Stunden mikroskopisch ausgewertet wurden (siehe folgendes Kapitel). Die dritten Blätter wurden zur RNA-Extraktion verwendet, da sich nach den Erfahrungen in unserem Institut am besten junge Blätter für die Extraktion der RNA eignen.

#### **4.1.2 Wirkung des Transgens auf die Resistenz gegen *Bgh/Bgt***

Nachdem die makroskopische Untersuchung von jeweils 15 putativ transgenen T<sub>2</sub>-Gersten- und Weizenpflanzen aller zur Verfügung stehenden *Bci4*-überexprimierender Linien keine Unterschiede in der Resistenz der Blätter gegenüber *Bgh* bzw. *Bgt* gezeigt hatte, wurden einzelne Linien einer mikroskopischen Untersuchung unterzogen. Diese Methode gibt detaillierteren Aufschluss über die Reaktion der Pflanze gegenüber einem Pathogen, konnte jedoch nicht für alle Linien durchgeführt werden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen *Bci4*-Expression und Resistenz der transgenen Pflanzen gegenüber *Bgh* bzw. *Bgt* aufzeigen zu können, wurden die ersten beiden Blätter von zwei verschiedenen Linien mit *Bgh* bzw. *Bgt* inokuliert und mikroskopisch untersucht. Die dritten Blätter wurden zur Northern Analysen verwendet, um die Expression des Transgens in den einzelnen mikroskopisch untersuchten Pflanzen festzustellen. Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung im Vergleich mit der Northern Analyse ließen nicht auf einen Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von *Bci4* und der Penetrationsrate von *Bgh* bzw. *Bgt* schließen. Die Linie B4-5(5) zeigte zum Beispiel fast keine Veränderung der Penetrationsraten auf dem ersten und zweiten Blatt im Vergleich zu nicht transgenen Kontrollen, obwohl die Northern Analyse des dritten Blattes eine sehr starke Expression des Transgens zeigt. Umgekehrt zeigt die Linie B4-5(7) eine deutliche Reduktion der Penetrationsrate auf

dem ersten und zweiten Blatt, allerdings nahezu keine Expression des Transgens im dritten Blatt. Da der verwendete CaMV35S Promotor als konstitutiv exprimiert gilt, muss angenommen werden, dass die Expressionsrate des Transgens in den dritten Blättern derjenigen in den ersten und zweiten Blättern entspricht. Eine statistische Absicherung dieser Aussagen war nicht möglich, da bedingt durch die unterschiedlichen Expressionsraten von *Bci4* jede Pflanze einzeln untersucht werden musste.

Nach den vorliegenden Ergebnissen muss davon ausgegangen werden, dass *Bci4* keine funktionale Rolle in der Resistenz von Getreide gegenüber dem Echten Getreidemehltau-pilz zukommt.

Die starke und sehr spezifische Induktion von *Bci4* durch resistenzinduzierende Verbindungen legt die Vermutung nahe, dass durch die Applikation von Resistenzinduktoren nicht alleine Resistenz induziert wird, sondern weitere physiologische Veränderungen der Pflanze ausgelöst werden, die nicht unmittelbar mit der Resistenzausprägung einhergehen. Die Aussage wird dadurch gestützt, dass in transienten Transformationen bis auf *Bci2* und *Bci3* keines der untersuchten *Bci*-Gene einen Einfluss auf die Resistenz gegen Echte Getreidemehltaupilze hat.

## **4.2 Macroarray-Analysen zur Identifizierung neuer chemisch Induzierter Gene**

Physiologische Flexibilität ist notwendig, um sich an verändernde Umweltbedingungen anpassen zu können. Durch verschiedene regulatorische Mechanismen kommt es zu einer Veränderung der Expression ganzer Gengruppen, die für die Anpassung an verschiedene Situationen notwendig ist.

Zur gleichzeitigen Untersuchung der Expressionsveränderung einer größeren Anzahl von Genen eines Organismus kann die Methode der cDNA-Arrays verwendet werden. In dieser Arbeit wurden so genannte *Macroarrays* verwendet, die in Zusammenarbeit mit dem IPK Gatersleben erstellt wurden, verwendet, da zu Beginn der Arbeiten noch kein kommerziell erhältlicher Oligonukleotid-Array von Gerste existierte. Durch die Verwendung einer normalisierten cDNA-Bank, die aus epidermale Gewebe von BTH behandelten Gerstenpflanzen isoliert wurden, sollten sich möglichst viele epidermale Gene, die an der chemisch Induzierten Resistenz der Gerste beteiligt sind, auf diesem Filter befinden. Zusätzlich wurden cDNAs verschiedener Gene ausgewählt, die bereits als resistenzassoziiert bekannt waren (BEBER *et al.*, 2000; HÜCKELHOVEN *et al.*, 2001; ECKEY *et al.*, 2004; JANSEN *et al.*, 2005). Durch Verwendung des BLAST Algorithmus konnte gezeigt werden,

dass etwa 25 % der Gene nur einmal in der so genannten GAN-cDNA-Bank vorhanden sind, und dass viele der Gene der cDNA-Bank nicht auf dem kommerziell erhältlichen Filter zu finden sind (CLOSE *et al.*, 2004; EICHMANN *et al.*, 2005). Deshalb bleibt der Einsatz des GAN-Filters auch weiterhin sinnvoll, wenn es um die Untersuchung pathogenresponsiver Gene geht. Ein Nachteil dieses Filters ist jedoch, dass trotz Normalisierung einige Klone, wie z. B. die Cysteinprotease, doppelt bzw. mehrfach vorhanden sind, weil die Sequenzierung der Genfragmente erst nach der Herstellung der Filter erfolgte. Die mehrfach vorhandenen Klone dienen zwar als interne Kontrolle, reduzieren die Anzahl der untersuchten Gene jedoch deutlich. Bei der Erstellung zukünftiger Filter sollte darauf geachtet werden, dass die verwendeten Klone jeweils nur einmal auf den Filter aufgebracht werden. Der Vorteil von kommerziell erhältlichen Oligonukleotid-Arrays liegt in einer erhöhten Zuverlässigkeit, da jedes Gen auf dem Filter durch verschiedene Fragmente repräsentiert wird. Das erfordert allerdings auch eine erhöhte Spotting-Kapazität.

Die GAN-Filter wurden im Rahmen dieser Arbeit mit komplexen cDNA-Sonden aus BTH-induzierten Pflanzen und Kontrollpflanzen hybridisiert. Das Pflanzenmaterial stammte aus zwei verschiedenen biologischen Experimenten, bei denen jeweils sieben Tage alte Gerstenpflanzen des Kultivars Ingrid Wt mit 20 ppm BTH per Bodenapplikation behandelt wurden. 48 Stunden nach der Behandlung wurde das Pflanzenmaterial für die entsprechenden Experimente geerntet. Mit Material aus einem Experiment wurden pro Behandlung zwei Filter hybridisiert, um technische Fehler ausschließen zu können.

In *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass etwa 1,5 % der gesamten Gene durch verschiedene SAR auslösende Behandlungen bzw. durch Mutation des SAR-Signalweges differentiell exprimiert werden (MALECK *et al.*, 2001). Unter Verwendung von komplexen cDNA Sonden von BTH-behandelten Pflanzen und den entsprechenden Kontrollpflanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit 59 Gerstengene, von denen 52 bislang nicht als chemisch induzierbar beschrieben waren, in mindestens zwei der vier durchgeführten *Macroarray*-Hybridisierungen als  $\geq 2,5$ fach durch BTH induziert gefunden. Das entspricht etwa 3,9 % der untersuchten Gene. Bestätigung fand die Methode dadurch, dass alle *Bci*-Gene, bis auf das durch BTH reprimierte *Bci8*, als induziert gefunden wurden. Der prozentual höhere Anteil BTH induzierter Gene lässt sich dadurch erklären, dass zur Erstellung des Filters eine cDNA Bank aus BTH induzierten Pflanzen verwendet wurde, wodurch eine Anreicherung dieser Transkripte stattfand.

Durch die deutlichen Unterschiede zwischen den beiden biologischen, aber auch bei den technischen Wiederholungen, war eine weitere Bestätigung durch mindestens ein weiteres biologisches Experiment erforderlich. Da nur eine begrenzte Anzahl von *Macroarray*-Filtern zur Verfügung stand, wurden die PCR-Produkte von 52 selektierten Genen zusammen mit *Bci1* (Lipoxygenase) und *Bci4* (putatives *EF-hand* Protein) als Positivkontrollen auf so genannte *Dotblots* aufgebracht. Durch die Hybridisierungen dieser Membranen mit Sonden aus Blattmaterial BTH-induzierter Pflanzen von zwei weiteren unabhängigen Experimenten konnten jedoch nur 28 der 52 Gene als chemisch induzierbar bestätigt werden. Da die starke Induzierbarkeit der Positivkontrollen *Bci1* und *Bci4* die Zuverlässigkeit der Methode zumindest bei stark exprimierten Genen bestätigt, muss davon ausgegangen werden, dass die Expression der Gene, die nicht bestätigt werden konnten, durch andere, hier nicht untersuchte, physiologische Veränderungen reguliert wird.

Die Klone der bestätigten 28 Gene wurden resequenziert, um die aus der EST Sequenzierung erhaltenen Sequenzen zu verifizieren und zu vervollständigen. Durch erneute Sequenzvergleiche mit bekannten Datenbanken wurden Vektorsequenzen aus den erhaltenen Sequenzen identifiziert, entfernt und mit den überprüften cDNA-Sequenzen erneut nach Homologien zu Genen in öffentlichen Datenbanken<sup>1</sup> gesucht. Dabei zeigte sich, dass zehn der überprüften Klone mehr als ein *Insert* enthalten, der Klon GAN001D07 enthielt sogar mindestens zwei verschiedene Plasmide. Dies erschwerte die unabhängige Bestätigung der differentiellen Klone deutlich, außerdem wird die Aussagekraft der *Macroarray*-Analysen vermindert, da nach diesen Ergebnissen etwa 15 % der Spots die Expression von mehr als zwei Genen repräsentieren. Die Expressionen verschiedener Gene können sich überlagern und Expressionsveränderungen deshalb unter Umständen nicht erkannt werden, z. B. wenn das differentiell exprimierte Gen nur eine vergleichsweise schwache Expressionsrate aufweist. Erst durch die vollständige Sequenzierung der Klone aus beiden Richtungen wurde dieses Problem sichtbar. Die Klone der EST-Bank wurden zumeist nur von einer Seite sequenziert und da nicht alle Klone der GAN-Bank manuell überprüft werden konnten, wurden alle Sequenzen automatisiert von Vektorsequenzen befreit und anschließend ihre Homologie zu bereits bekannten Genen überprüft. Teilweise wurden deshalb die Vektorsequenzen nur unzureichend entfernt, was die Suche nach Homologien erschwert und da nur das Gen mit der höchsten Homologie angegeben wurde, blieben weitere *Inserts* in dem automatisierten Verfahren und durch die Sequenzierung von nur einer Seite unentdeckt.

---

<sup>1</sup> TIGR-Datenbank: [www.tigr.org/tigrblast.tigr.org/tgi/](http://www.tigr.org/tigrblast.tigr.org/tgi/) bzw. NCBI-Genbank: [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Die Sequenzen der GAN-Bank wurden inzwischen mit verbesserten Verfahren validiert und in der NCBI Genbank publiziert.

Für 13 der in den *Dotblot* Analysen bestätigten Gene wurden spezifische Primer generiert und *two step* RT-PCRs zur endgültigen Bestätigung durchgeführt. Nur für fünf Gene konnte die BTH-Induzierbarkeit nach 48 Stunden bestätigt werden. Die übrigen acht Gene zeigten für den untersuchten Zeitpunkt keine differentielle Expression.

Das bedeutet, dass bislang nur fünf der 1536 überprüften Gene als durch BTH induzierbar bestätigt werden konnten. Allerdings wurden von den 25 Genen, die in den *Dotblot* Analysen als induziert gefunden wurden, bis jetzt nur 13 Gene durch *two step* RT-PCRs überprüft. Obwohl für alle Experimente nur Pflanzenmaterial verwendet wurde, für das die BTH-Induktion durch Resistenztests und die verstärkte Expression des Markergens *Bci4* gezeigt wurde, war die Reproduzierbarkeit der beobachteten Genexpressionen in *Dotblot*-Analysen und semiquantitativen RT-PCRs unerwartet schlecht. Ein Problem bei der Reproduzierbarkeit der *Array*-Ergebnisse durch PCR-Techniken kann in der Auswahl der Primer begründet sein. Falls es sich um eine Multigenfamilie handelt, könnten die Primer nicht spezifisch das induzierte Gen amplifizieren und die Änderung in der Expressionsrate würde möglicherweise nicht sichtbar. Eine Überprüfung mit anderen Primerpaaren war aus Zeitgründen nicht möglich.

GAN-Filter und GBN-Filter, welche aus cDNA-Bank von *Bipolaris sorokiniana* infizierten Pflanzen erstellt wurden, wurden in anderen Arbeitsgruppen zur Identifikation von pathogenresponsiven Genen verwendet. In diesen Experimenten war die Reproduzierbarkeit der Expressionsveränderungen deutlich höher (SCHÄFER, 2003; EICHMANN *et al.*, 2005). Fast alle im *Macroarray* gefundenen Gene konnten in unabhängigen RT-PCRs oder Northern Analysen bestätigt werden.

Physiologische Unterschiede der Pflanzen zum Zeitpunkt der BTH-Applikation könnten deshalb ein weiterer Grund für die schlechte Reproduzierbarkeit sein. Sie könnten zu einer unterschiedlichen Aufnahme und Verteilung des Resistenzinduktors in den Pflanzen bzw. in Abhängigkeit von der Fitness der Pflanzen zu einer unterschiedlich starken Ausprägung des *priming* Status geführt haben. Im Gegensatz dazu wird die Expression von vielen Genen, die für Abwehrreaktionen wie Papillenbildung und HR benötigt werden, gezielt nach Pathogenbefall verändert. Diese Änderung der Genexpression scheint klarer definiert und strukturiert zu sein, als die nach BTH-Induktion. BTH-Applikation könnte neben der Induktion des SAR-Signalweges aber auch andere physiologische Veränderungen der

Pflanze bedingen, was zu einer komplexeren Antwort auf Transkriptionsebene führen kann. Letztendlich ist es deshalb wichtig Gene zu identifizieren, die reproduzierbar durch BTH induziert werden, weil die Expression vieler Gene möglicherweise nicht durch die BTH-Applikation sondern durch auftretende physiologische Schwankungen verursacht wird.

### **4.3 Dotblot Analysen zur Bestätigung chemisch induzierbarer Gene**

Die cDNAs aller Gene, die in mindestens zwei der vier *Macroarray*-Hybridisierungen als induziert gefunden wurden, wurden zur weiteren Bestätigung der BTH-Induzierbarkeit auf Nylonmembranen aufgebracht und erneut mit Sonden aus unabhängigen biologischen Experimenten hybridisiert (s. Kap. 4.2). Da sich diese *Dotblots* mit relativ geringem zeitlichen und finanziellen Aufwand in größerer Zahl herstellen lassen, wurden sie auch zur Überprüfung der Expressionsraten nach Behandlung mit MeJA und der Inokulation mit *Bgh* verwendet.

#### **4.3.1 Charakterisierung von BTH-induzierbaren Genen**

**GAN001A04** zeigt die höchste Homologie zu einem Gersten-EST aus der TIGR-Datenbank, der wiederum Homologie zu einer N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase aus *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, einem gut charakterisierten Streptokokken, der zur Käseherstellung verwendet wird (BOLOTIN *et al.*, 2001). Dieses Enzym ist am Peptidoglycankatabolismus beteiligt und katalysiert die Spaltung von Amidbindungen zwischen N-Acetylmuramoylsäure und L-Aminosäuren in bestimmten bakteriellen Zellwand-Glycopeptiden. Dadurch könnte es an einem Abbau der Zellwand von bakteriellen Pathogenen beteiligt sein. Es wurde in den *Macroarray*-Analysen zweimal als 30 und 2,6fach induziert gefunden, war aber auch in einer der vier Hybridisierungen 2,5fach reprimiert. In den *Dotblot*-Analysen konnte eine 4,3fache Induktion bestätigt werden. In der unabhängigen *two step* RT-PCR konnte jedoch keine Induktion nachgewiesen werden. Die stark schwankende Expression in den verschiedenen biologische Experimenten lässt darauf schließen, das dieses Gen nicht ursächlich an der Ausprägung der induzierten Resistenz in Gerste beteiligt ist, da bei allen Experimenten der Status der induzierten Resistenz sowohl durch molekulare Marker als auch mit Mehltau überprüft wurde, das Gen jedoch nicht in allen Experimenten induziert wurde. Deshalb wurde dieses Gen nicht weiter funktionell überprüft.

**GAN001A10** zeigt nach dem BlastN Algorithmus (ALTSCHUL *et al.*, 1997) eine Homologie von  $4,4 \cdot 10^{-53}$  zu einer EST-Konsensussequenz aus der TIGR-Datenbank, die Homologie zu einem SOUL-like Protein aus *A. thaliana* aufweist. SOUL-Proteine sind Häm-bindende Proteine, für die neben der Häm-Bindung bislang keine klare biologische Funktion bekannt ist (ZYLKA und REPERT, 1999). TAKETANI *et al.* (1998) postulieren eine Rolle in der Häm-Biosynthese oder in der Häm-Aufnahme in Zellen. Die Funktion in Pflanzen ist bislang unbekannt. Dieses Gen zeigte in den *Macroarray*-Analysen zwar schwankende Expressionsdaten, wurde jedoch in den *Dotblot* Analysen als 4fach induziert bestätigt. Allerdings konnte die Induzierbarkeit auch dieses Gens nicht durch unabhängige *two step* RT-PCRs verifiziert werden, weshalb es ebenfalls nicht weiter funktionell überprüft wurde.

Für Klon **GAN001B19** konnte durch genauere Sequenzanalyse gezeigt werden, dass zwei *Inserts* enthalten sind: das bereits als chemisch induzierbar bekannte *Bci6* (BEBER *et al.*, 2000) und ein zweites Gen mit Homologie zu einem EST mit bislang unbekannter Funktion. Durch *two step* RT-PCRs für beide Gene wurde gezeigt, dass die festgestellte Expressionsveränderung nur durch *Bci6* verursacht wurde. Somit konnte ein weiteres *Bci*-Gen aus der GAN-cDNA-Bank re-identifiziert werden und kann als zusätzliche Positivkontrolle für die chemische Induktion verwendet werden. Dieses Gen besitzt hohe Homologie zu sauren Phosphatasen, die anorganisches Phosphat von verschiedenen Substraten abspalten können. Unter anderem wird eine mögliche Funktion bei der Mobilisierung und Rückgewinnung des anorganischen Phosphats aus absterbendem Gewebe während der Seneszenz, HR oder Verwundung diskutiert (DUFF *et al.*, 1994; DEL POZO *et al.*, 1999; KENTON *et al.*, 1999). Saure Phosphatasen bilden eine Multigenfamilie, zu der auch *Bci3* gehört. Der *knock down* von *Bci3* führte im transienten Transformationsassay zu einer Reduktion der Penetrationsrate des Echten Gerstenmehltaupilzes um 33 %, während die Überexpression keinen Einfluss hatte (R. Eichmann, unveröffentlichte Daten).

Durch eine genauere Analyse des Klons **GAN001D07** konnte festgestellt werden, dass dieser mindestens zwei verschiedene Plasmide enthält, die als GAN001D07a und b bezeichnet wurden. Das zweite Plasmid lieferte nur sehr schlechte Sequenzinformationen, so dass immer noch Kontaminationsprobleme zu bestehen scheinen. Es konnte aufgrund der schlechten Qualität der Sequenz keine Ähnlichkeit zu anderen bekannten Genen gefunden werden. GAN001D07a besitzt hohe Homologie zu einem putativen ATP-abhängigen Transporter. Der nicht genauer charakterisierte Transporter dient dem energieabhängigen

Transport eines Stoffes wie z. B. Zucker, Aminosäuren oder anorganische Ionen gegen ein Konzentrationsgefälle durch eine Zellmembran (MADIGAN *et al.*, 1997). Obwohl dieser Klon in den *Dotblot* Analysen als 100fach induziert gefunden wurde, wurde seine Induzierbarkeit durch BTH bislang aufgrund der zeitaufwändigen Sequenzanalysen nicht durch *two step* RT-PCR überprüft.

Das *Insert* des Klons **GAN001D12** codiert für ein Reticulon-ähnliches Protein. Die Reticulon-Proteine wurden zuerst in höheren Vertebraten beschrieben (VAN DE VELDE *et al.*, 1994). Es handelt sich um 200 bis 1200 Aminosäuren große Proteine, die mit dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) assoziiert sind. Sie besitzen eine 150 bis 201 Aminosäuren große carboxyterminale *Reticulon Homology Domain* (RHD), die aus zwei hydrophoben Regionen besteht, zwischen denen sich ein etwa 66 Aminosäuren großer *Loop* befindet. Die humanen Reticulon-Proteine RTN-XS und RTN1-C interagieren mit den Apoptose-Inhibitoren Bcl2 und BclXL und verhindern so deren Lokalisation am ER und gleichzeitig ihre antiapoptotische Aktivität (TAGAMI *et al.*, 2000). RTN-1C ist der wichtigste Interaktionspartner der Glucosylceramid-Synthase (GCS), einem Schlüsselenzym der Glycosphingolipid-Biosynthese. Die Inhibierung von GCS führt zu einer drastischen Reduktion der p53-unabhängigen Apoptose, während eine Überexpression von RTN-1C die Antwort auf den Apoptose-Auslöser Fenretinid verstärkt (DI SANO *et al.*, 2003). Über die Regulation von RTN-1C ist bislang nichts bekannt.

In Pflanzen konnten von OERTLE *et al.* (2003) mehr als 180 Reticulon-like Gene identifiziert werden. Allein in *A. thaliana* wurden 15 dieser Gene gefunden. Über die Bedeutung dieser Gene in Pflanzen ist bislang nichts bekannt.

Das Gen war in drei der vier *Macroarray*-Hybridisierungen als induziert gefunden worden. In den *Dotblot* Analysen und den *two step* RT-PCRs wurde die Induzierbarkeit bestätigt. Zur funktionalen Überprüfung des Gens wurden transiente Transformationsassays durchgeführt (siehe Kapitel 3.3).

Bei **GAN001F12** handelt es sich um ein Gen mit einer Homologie von  $1,6 \cdot 10^{-51}$  zu einem humanen putativen Golgi-Transport-Komplex Protein. Der Transport von Lipiden und Proteinen vom Endoplasmatischen Reticulum über den Golgi-Apparat zu sekretorischen Vesikeln benötigt Transporter oder Vesikel, die dann spezifisch mit der Membran des Zielkompartments verschmelzen. Für verschiedene Schritte konnten beteiligte Faktoren identifiziert werden, wie etwa die SNARE-Proteine (COLLINS *et al.*, 2003). GAN001F12 wurde sowohl in den *Macroarray*-Analysen als auch in den *Dotblots* als induziert gefun-

den, die unabhängige Überprüfung mittels *two step* RT-PCR konnte jedoch aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Der Klon **GAN001H20** besitzt Homologie zu einem Importin  $\beta$ -like Protein aus Reis. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie spielen eine wichtige Rolle beim Transport von Makromolekülen mit Kernlokalisierungssignal zwischen Cytoplasma und Nukleus. Alle Importin  $\beta$ -Proteine haben die Fähigkeit verschiedene zu transportierende Moleküle zu erkennen und direkt oder über Adaptoren zu binden. Für die Bindung von Molekülen mit Kernlokalisierungssignal ist z. B. die Bindung an den Adaptor Importin  $\alpha$  notwendig. Der Komplex aus Importin  $\beta$ , dem zu transportierenden Molekül und dem eventuell benötigten Adaptor bindet an Nucleoporine des Kernporenkomplexes. In der Anwesenheit von RanGDP, einem kleinen G-Protein, und freiem GTP kommt es zur Translokation des Importin-Komplexes durch den Kernporenkomplex. Die Bindung zwischen Importin  $\beta$  und dem transportierten Molekül wird durch die Bindung von GTP an Importin  $\beta$  gelöst. Die Bindung des Adaptors allein ist nicht stark genug und das transportierte Molekül wird in den Kern entlassen. Importin  $\beta$  und Adaptor werden durch Bindung an entsprechende Exportine zurück in das Cytoplasma transportiert (STRÖM und WEIS, 2001). Das Gen wurde in den *Macroarray*-Analysen zweimal als deutlich induziert gefunden und in den *Dotblot*-Analysen als 12fach induziert bestätigt. Bislang wurde dieses Gen jedoch noch nicht in unabhängigen RT-PCRs untersucht.

**GAN001J09** besitzt die höchste Homologie zu einem  $\gamma$ -Hydroxybutyrat Dehydrogenase-ähnlichen Protein aus *Oryza sativa* in der TIGR-Datenbank.  $\gamma$ -Hydroxybutyrat Dehydrogenasen (EC 1.1.1.61) katalysieren die Oxidation von 4-Hydroxybutanoat und  $\text{NAD}^+$  zu Succinat-Semialdehyd und  $\text{NADH}$  und  $\text{H}^+$ . Das Produkt ist ein Ausgangsstoff für den Vitamin B6-Stoffwechsel und den Glutamat-Metabolismus. Succinat wird außerdem für den Ablauf des Citratcyclus benötigt (siehe z. B. <http://pfam.wustl.edu/index.html>, September 2004).

Die Transkriptionsrate des Gens war in drei der vier *Macroarray*-Hybridisierungen nach BTH-Induktion erhöht. Die anschließenden *Dotblot*-Analysen bestätigten eine 42fache Induktion. Die für die RT-PCRs ausgewählten Primer lieferten jedoch keine Produkte und müssten neu gewählt werden.

Die beiden Gene **GAN001K12** und **GAN001L11** weisen keine Homologien zu Genen mit bekannter Funktion auf. Beide wurden jedoch in den *Dotblot* Analysen als stark induziert gefunden und konnten durch unabhängige semiquantitative RT-PCRs verifiziert werden.

Das Gen **GAN001O16** besitzt Homologie zu einem *ternary complex factor*-ähnlichen Protein aus *Oryza sativa*. Als *ternary complex* wird der Komplex aus transkribierter DNA, RNA-Polymerase und entstehender RNA bezeichnet (BENTLEY, 2002). *Ternary complex* Faktoren sind Proteine mit einer DNA-bindenden ETS-Domäne. In menschlichen Zellen sind *ternary complex* Faktoren an der Genregulation nach Wachstumssignalen und zellulärem Stress beteiligt. Sie werden durch MAP-Kinase-Kaskaden aktiviert und sind bislang nur bei tierischen Organismen und Pilzen beschrieben worden (SHAW und SAXTON, 2003). Das Gen wurde in allen vier *Macroarray*-Hybridisierungen als induziert gefunden. Die *Dotblot* Analysen bestätigten eine schwache Induzierbarkeit. Das Gen wurde noch nicht unabhängig bestätigt.

Das Gen **GAN02B02**, eine Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3) kodiert für ein Enzym der Glycolyse, also des Primärstoffwechsels und katalysiert die Reaktion von 1,3-Diphosphoglycerat und ADP zu 3-Phosphoglycerat und ATP. Die Phosphoglycerat-Kinase wurde in zwei der vier *Macroarray*-Analysen als chemisch induziert gefunden. Eine 5,5fache Induzierbarkeit konnte auch in den *Dotblot*-Analysen gezeigt werden. Die unabhängigen *two step* RT-PCRs mit Material eines fünften, unabhängigen Experiments zeigten jedoch keine differentielle Expression des Gens nach chemischer Induktion.

Durch detailliertere Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass der Klon **GAN002C11** zwei verschiedene *Inserts* enthält. Neben einem Gen ohne Homologie zu Genen mit bekannter Funktion wurde ein zweites Gen mit Homologie zu einer Adenosin 5'-Phosphosulfat Reduktase (EC 1.8.99.2) gefunden. Dieses Protein ist am Schwefelmetabolismus beteiligt und katalysiert die Reaktion von AMP, Sulfit und einem Akzeptor zu Adenylylsulfat und dem entsprechenden reduzierten Akzeptor. Der Klon wurde in drei *Macroarray*-Hybridisierungen als chemisch induzierbar gefunden, einmal sogar 200fach. Die *Dotblot*-Analysen mit GAN002C11 bestätigten eine 3,5fache Induktion. Es wurden bislang keine *two step* RT-PCRs durchgeführt, die auch klären könnten, welches der beiden Gene induzierbar ist.

**GAN002E03** besitzt eine Homologie von  $1.3e^{-62}$  zu einer EST-Konsensussequenz aus der TIGR-Datenbank, die ähnlich zu Onecut3, einem Transkriptionsfaktor, ist. Die Klasse der Onecut Transkriptionsfaktoren kontrolliert die Expression von anderen Transkriptionsfaktoren und spielt eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung und im Stoffwechsel (VANHORENBEECK *et al.*, 2002). Das Gen war in zwei *Macroarray*-Hybridisierungen induziert und eine schwache 2,5 fache Induzierbarkeit durch die Applikation von BTH konnte

auch in den *Dotblot* Analysen bestätigt werden. Dieses wurde Gen bislang nicht mit *two step* RT-PCR untersucht.

Durch Resequenzierung konnte gezeigt werden, dass das Plasmid des Klons **GAN002G16** drei verschiedene *Inserts* enthält. Neben einem Glycoprotein-ähnlichen Protein, findet sich ein Glucan-endo-1,3- $\beta$ -Glucosidaseisoenzym und eine Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GADPH). Bei Glycoproteinen handelt es sich um Proteine, an die ein oder mehrere Kohlenhydratreste kovalent gebunden sind. In humanen Zellen liegt die Mehrheit der Proteine glycosyliert vor. Die Bindung von Oligosacchariden erhöht die Löslichkeit von Proteinen, kann antigene Domänen verdecken und schützt das Peptid vor Spaltung durch Proteasen<sup>2</sup>. Die Proteine dieser sehr heterogenen Gruppe können als Enzyme vielfältige Aufgaben übernehmen, sind aber auch als Strukturproteine am Aufbau der Zellwand beteiligt.

Das Glucan-endo-1,3- $\beta$ -Glucosidaseisoenzym (EC 3.2.1.39) könnte an der Abwehr von Pathogenen beteiligt sein, indem es zur Degradierung der Polysaccharide der pilzlichen Zellwand beiträgt. Ein solches Protein akkumuliert in Gerste während der Samenbildung und -reifung. Durch Mikrotiterplatten-Assays konnte eine antifungale Wirkung des Proteins gegenüber *Trichoderma reesei*, *Fusarium sporotrichioides*, *Rhizoctonia solani* und *Botrytis cinerea* gezeigt werden (LEAH *et al.*, 1991).

GAPDH (EC 1.2.1.12) ist ein Enzym der Glycolyse bzw. der Glyconeogenese und damit am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt. Es besteht aus vier identischen Untereinheiten und katalysiert die reversible Oxidation und Phosphorylierung von D-Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1,3-Diphospho-Glycerat. Als ein ubiquitär vorkommendes Protein wird es häufig als Kontrolle für gleiche Lademengen bei Expressionsstudien benutzt, z. B. als Ladekontrolle bei quantitativen RT-PCRs zur Untersuchung von Genexpression in symbiotischen Interaktionen (DELP *et al.*, 2003). Man sollte also davon ausgehen können, dass es sich um ein konstitutiv exprimiertes Gen handelt, das fast keiner Regulation unterliegt. Neben dieser reversiblen GAPDH gibt es aber auch ein Enzym, das nichtreversibel die oben genannte Reaktion katalysiert. Eine nichtreversible GAPDH (EC 1.2.1.9) wurde in Reiskeimlingen, die durch Überflutung dem Stress der Anaerobiose ausgesetzt waren, als stark induziert gefunden (PILLAI *et al.*, 2002). Auch im Menschen wird eine Beteiligung einer

---

<sup>2</sup> <http://www.glycoforum.gr.jp/scienceworld/glycoprotein/GPA00E/htm/>; Februar 2005

GAPDH an der Ausbildung der Apoptose ausgelöst durch Hypoxämie und Ischämie diskutiert (BERRY und BOULTON, 2000).

Die Expression dieses Klon war in zwei *Macroarray*-Hybridisierungen induziert und einmal um den Faktor 2,5 reprimiert. Die *Dotblot*-Analysen bestätigten eine schwache Induktion um den Faktor 3. Durch die Behandlung mit MeJA wurde der Klon um den Faktor 1850 reprimiert (siehe Kapitel 3.2.2.3). Bislang wurde jedoch nicht gezeigt, welches der drei Gene tatsächlich für die beobachteten Veränderungen der Expressionsraten verantwortlich ist. Der Klon **Hv005EX** enthält ebenfalls eine für eine GAPDH codierende Sequenz und wurde ebenfalls in den *Macroarray*-Analysen als induziert gefunden, konnte aber durch die *Dotblot*-Analysen nicht bestätigt werden.

Das Gen **GAN002I09** ist auf Aminosäureebene absolut identisch mit JIP 37, einem Jasmonat-induzierbaren Gen, das von HAUSE *et al.* (1994) identifiziert wurde. Es handelt sich um ein blattspezifisches Protein, das in der Vakuole und im Kernplasma lokalisiert werden konnte. Eine Funktion konnte diesem Protein bislang nicht zugeordnet werden. Das Gen wurde in allen vier *Macroarray*-Hybridisierungen als stark induziert gefunden. Seine Überprüfung durch *Dotblot*-Analysen erzielte jedoch nur eine schwache Induktion um den Faktor 2,5. Wie erwartet, konnte für JIP 37 eine Induktion um den Faktor 37000 durch die exogene Applikation von MeJA gezeigt werden. Alle Ergebnisse wurden bislang nicht unabhängig durch RT-PCRs überprüft.

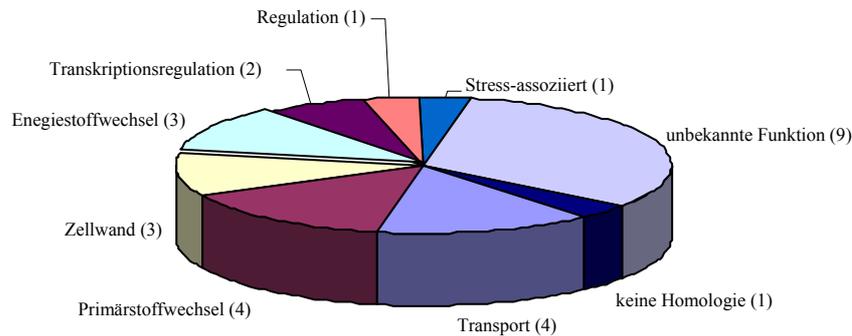
Bei der extrazellulären Invertase (EC 3.2.1.26), die durch den Klon **GAN003A19** repräsentiert wird, handelt es sich um ein Enzym, das die irreversible Hydrolyse von Saccharose zu Glucose und Fructose katalysiert. Extrazelluläre Invertasen spielen eine Rolle bei der Kohlenhydratversorgung von *Sink*-Gewebe. Durch die Spaltung der Transportform von Kohlenhydraten, der Saccharose, bleibt das Konzentrationsgefälle zwischen *Source*- und *Sink*-Gewebe aufrecht erhalten (EHNEB und ROITSCH, 1997). Durch Hexose-Transporter können Glucose und Fructose in die Zelle transportiert werden. Es kommt allerdings nicht nur in schnellwachsenden Geweben (ESCHRICH, 1980), sondern auch während der Interaktion mit dem biotrophen Mehltäupilz zur Akkumulation von extrazellulären Invertasen (SCHOLES *et al.*, 1994; WHRIGHT *et al.*, 2000). Diese Pathogene können keine Disaccharide, wie Saccharose, aufnehmen und sind deshalb auf die Invertasen angewiesen. Die monomeren Zuckerformen können mit Hilfe von Hexosetransportern, die in der haustorialen Membran von biotrophen Pathogenen z. B. Rost- oder Mehltäupilzen lokalisiert sind, aufgenommen werden (VOEGELE *et al.*, 2001). Im Hinblick auf die Wirt-Pathogen-Interaktion handelt es sich bei extrazellulären Invertasen eher um Suszeptibilitätsfaktoren. Das Gen

war in zwei *Macroarray*-Analysen induziert und durch die *Dotblot*-Analysen konnte eine 4,1fache Induktion bestätigt werden. Die unabhängige Überprüfung durch *two step* RT-PCRs konnte die differentielle Expression jedoch nicht bestätigen.

Die Cysteinprotease, von der sich verschiedene cDNA-Fragmente sowohl in Klon **GAN003J15** als auch in **GAN004K24** finden, zeigt die höchste Homologie ( $2e^{-17}$  nach dem BlastX Algorithmus, ALTSCHUL *et al.*, 1997) zu einer Vorstufe des *fruit bromelain* aus Ananas. Bromelain ist der Sammelbegriff für vorwiegend proteolytische wirkende Enzyme aus verschiedenen Organen der Ananas, einem Mitglied der Familie der *Bromeliaceae*. Es verkürzt den Heilungsprozess bei diversen Verletzungen, da es entzündungshemmende Eigenschaften besitzt und seine Verwendung in der Krebstherapie Erfolg zeigt (KUMAKURA *et al.*, 1988; ECKERT *et al.*, 1999). Außerdem wirken Cysteinproteasen aus Papain, Figin oder Bromelain toxisch gegenüber herbivoren Insekten (KONNO *et al.*, 2004). SAG12, eine Cysteinprotease aus *A. thaliana*, wird im Zusammenhang mit dem Katabolismus und der Nährstoffmobilisierung während der Seneszenz diskutiert (LOHMAN *et al.*, 1994; NOH und AMASINO, 1999; siehe auch Kapitel 4.4.1). Der Klon GAN003J15 zeigte in allen vier *Macroarray*-Hybridisierungen eine starke Induzierbarkeit durch BTH. Außerdem wurden zehn weitere Genfragmente des gleichen Gens als ähnlich stark induziert gefunden. Deshalb wurde er stellvertretend für alle übrigen Cysteinprotease-Klone ausgewählt und in *Dotblot*-Analysen überprüft. Sie zeigte zwar nur eine relative schwache Induzierbarkeit in den *Dotblot*-Analysen, gehört jedoch zu den Genen, die auch durch *two step* RT-PCRs bestätigt werden konnten (siehe Abbildung 3.5). Das Gen wurde daraufhin durch transienten *knock down* funktionell überprüft (siehe Kapitel 3.3.1.1 und 4.4.1).

Die Oxidation von Methioninresten von Proteinen zu Methionin-Sulfoxid erfolgt vermehrt in Perioden von oxidativen Stress. Die Wiederherstellung der Funktionalität eines oxidierten Proteins wird durch ein Enzym namens Peptid Methionin Sulfoxid Reduktase (EC 1.8.4.6) vermittelt, das durch den Klon **GAN004K21** repräsentiert wird. Dieses Enzym spielt z. B. eine Rolle bei der Adhäsion und Aggregation von humanen Pathogenen an Wirtszellen (LEITE *et al.*, 2002) oder bei der Wiederherstellung des kleinen Hitzeschockproteins Hsp21 b, das notwendig für die zelluläre Resistenz gegen oxidativen Stress ist, eine Rolle (GUSTAVSSON *et al.*, 2002). Der Klon war in zwei der vier *Macroarray*-Hybridisierungen induziert, was auch durch die *Dotblot*-Analysen bestätigt werden konnte. Durch *two step* RT-PCR konnte diese Induzierbarkeit jedoch nicht verifiziert werden.

Das Gen **GAN003M18** besitzt hohe Homologie zu einer EST-Konsensussequenz aus der TIGR Datenbank, die Homologie zu einem Remorin aufweist. Es handelt sich dabei um ein Uronid-bindendes Protein, das *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert werden kann und die Fähigkeit besitzt polyanionische Liganden zu binden. Das einzige bekannte Protein, das die gleichen Eigenschaften aufweist ist das virale *movement*-Protein des Tabak Mosaik Virus, das für den Transport von Makromolekülen durch Plasmodesmata verantwortlich ist (REYMOND *et al.*, 1996). Das Remorin wird *in vitro* in Gegenwart von Oligogalacturonsäuren (OGAs) phosphoryliert. OGAs sind biologisch aktive Komponenten der extrazellulären Matrix, die an Morphologieveränderungen der Zelle und an der Induktion von Abwehrgenen beteiligt sind (RIDLEY *et al.*, 2001). Bislang ist es nicht gelungen eine vitale *A. thaliana*-Pflanze zu generieren, die ein Remorin überexprimiert, während eine Mutation, die zum Funktionsausfall des Gens führt, keinen Effekt hat, da es sich anscheinend um eine große Multigen-Familie handelt (BARIOLA *et al.*, 2004). Es bleibt also nur aufgrund der Ähnlichkeit zu dem viralen *movement*-Protein zu vermuten, dass Remorine an der Kommunikation zwischen Zellen beteiligt sind. Das Gen wurde in drei *Macroarray*-Hybridisierungen als induziert gefunden. Eine 3,5fache Induktion konnte durch *Dotblot*-Analysen bestätigt werden. In unabhängigen *two step* RT-PCRs konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden.



**Abb. 4.1:** Einteilung der BTH-induzierten Gene nach ihrer Funktion. Die in den Dotblot Analysen als chemisch induzierbar bestätigten Gene wurden nach ihrer Funktion in verschiedene Gruppen eingeteilt.

Eine Einteilung der in den *Dotblot* Analysen als chemisch induzierbar verifizierten Genen zeigt, dass der größte Teil der Gene mit bekannter Funktion an Transportfunktionen und am Auf- bzw. Abbau der Zellwand beteiligt ist. Das entspricht den Erwartungen, da die chemische Induktion der Pflanzen mit einem *priming*-Effekt einhergeht, der eine schnellere Reaktion auf eine Pathogenattacke ermöglicht. Diese beinhaltet eine Verstärkung der Zellwand des Wirtes bzw. einen Angriff auf die des Pathogens. Transportvorgänge spielen hierbei eine wichtige Rolle.

#### 4.3.2 Pathogenresponsivität der differentiell exprimiert identifizierten Gene

Die Interaktion zwischen einer Pflanze und einem Pathogen führt zu extremen physiologischen und metabolischen Veränderungen in der Pflanze. Der attackierten Zelle stehen verschiedene aktive Abwehrmechanismen zur Verfügung, die die Ausbreitung des Pathogens verhindern können (siehe Kapitel 1.1). Diese werden durch die räumliche und zeitliche Aktivierung der Transkription verschiedener Abwehrgene gesteuert. Zu diesen Abwehrgenen gehören auch die *Pr*-Gene, von denen verschiedene auch während der Interaktion von Getreide mit *Blumeria graminis* aktiviert werden (VAN LOON und VAN STRIEN, 1999; COLLINGE *et al.*, 2002). Als weiteres Beispiel seien die von SCHWEIZER *et al.* (1989) identifizierten *Wir*-Gene genannt. Sie wurden aus Weizenblättern nach der Inokulation mit *Bgt* isoliert und umfassen eine Gruppe von sechs Genen zu denen u. a. ein Thaumatin-ähnli-

ches Gen (*Wir2*), eine Peroxidase (*Wir3*) und ein Gen mit hoher Homologie zu einer Glutathion-S-Transferase (*Wir5*) gehören.

Die *Dot blot*-Filter wurden mit Sonden aus *Bgh*-inokulierten Gerstenblättern hybridisiert, um zu überprüfen inwieweit die putativ BTH-induzierbaren Gene auch pathogen-induzierbar sind. Dies sollte klären, inwieweit die chemisch induzierten Gerstengene auch durch Pathogene induziert werden. SCHAFFRATH *et al.* (1997) zeigten, dass in Weizen durch biologische und chemische Induktion unterschiedliche Sets von Genen, den *Wir*- (*wheat induced resistance*) und *Wci*-(*wheat chemical induction*)genen angeschaltet werden, deren Expressionsmuster anders als in dikotylen Pflanzen nicht überlappen. Diese Beobachtungen weisen auf zwei getrennt regulierte und wirkende Signalwege in monokotylen Pflanzen hin.

#### 4.3.2.1 In der kompatiblen Interaktion mit *Bgh* induzierte Gene

Nur zwei der BTH induzierten Gene wurden in dieser Arbeit auch als *Bgh* induzierbar identifiziert. Das Gen **HvD00126**, das keine Homologie zu einem Gen bekannter Funktion zeigt, wurde ebenso wie *BciI*, eine Lipoxygenase, schwach induziert. Die Induzierbarkeit von **HvD00126** durch BTH konnte in den *Dot blot* Analysen nicht bestätigt werden (siehe Kapitel 3.2.2.1), allerdings konnte durch die Behandlung mit MeJA eine dreifache Repression des Gens erzielt werden (siehe Kapitel 3.2.2.3).

Lipoxygenasen (EC 1.13.11.12) katalysieren die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Linol-, Linolensäure) in höheren Pflanzen. Die entstehenden Hydroperoxide dienen als Ausgangsprodukte der Oxylipinsignalwege. (HILDEBRAND, 1989; LIBBERT, 1993 und WEICHERT *et al.*, 1999). *BciI* wurde zuerst als MeJA-induziertes Gen in Gerstenblättern beschrieben (FEUSSNER *et al.*, 1995; VÖRÖS *et al.*, 1998). Allerdings konnte eine Veränderung der Genexpression durch den Befall mit *Bgh* weder in kompatiblen noch in inkompatiblen Interaktionen gezeigt werden (HAUSE *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen widersprechen diesen Ergebnissen zwar. Allerdings zeigt *BciI* nur eine schwache Induktion um den Faktor 2,6 in den *Dot blot* Analysen, was in Northern Analysen unter Umständen nicht detektiert wird. Außerdem wurde dieses Ergebnis, ebenso wie die Induzierbarkeit des Gens HvD00126, nicht durch *two-step* RT-PCR bestätigt.

#### 4.3.2.2 In der kompatiblen Interaktion mit *Bgh* reprimierte Gene

Überraschenderweise zeigten mehr Gene eine Repression durch *Bgh* als eine Induktion. Der Klon **GAN001A04**, ein Gen mit Homologie zu einer N-Acetylmuramoyl-L-Alanin

Amidase, wird schwach durch den Befall mit *Bgh* reprimiert, während die Behandlung mit BTH zu einer 4,3fachen Induktion des Gens führt. Die Funktion des Proteins im Peptidoglycankatabolismus wurde bereits beschrieben (siehe Kapitel 4.3.1).

Der Klon **GAN001E14** konnte durch die *Dotblot*-Analysen nicht als BTH-induzierbar verifiziert werden. Das Insert dieses Klons zeigt keine Homologien zu Genen mit bekannter Funktion. Es wurde durch die Inokulation mit *Bgh* 2,9fach reprimiert.

Obwohl die BTH-Induzierbarkeit von **GAN002L09**, einem Chlorophyll a/b bindenden Protein nicht durch die *Dotblot* Hybridisierungen bestätigt werden konnten (siehe Kapitel 3.2.2.1), wurde es durch die Inokulation mit *Bgh* 2,7fach reprimiert, während es durch die Behandlung mit MeJA stark reprimiert wurde (siehe Kapitel 3.2.2.3). Chlorophyll a/b-bindende Proteine binden nicht-kovalent sowohl Chlorophyll a als auch b und bilden mit ihnen intrinsische Membranproteine der Photosysteme I und II. Sie sind kerncodiert, werden an cytoplasmatischen Ribosomen gebildet und über zwei Membranen in den Chloroplasten importiert und in die Thylakoidmembran integriert. Es gibt verschiedene Chlorophyll a/b-Komplexe, die durch unterschiedliche Funktionen und Lokalisationen in den beiden Photosystemen charakterisiert sind (GREEN *et al.*, 1991). Die Induzierbarkeit durch BTH konnte durch die *Dotblot*-Analysen nicht verifiziert werden. ECKEY (2002) fand in dem von ihr durchgeführten cDNA-AFLP ein Chlorophyll a/b-bindendes Protein nach der Inokulation mit *Bgh* induziert. Da sich in der Literatur keine Angaben zur Regulation von Chlorophyll a/b-bindenden Proteinen gemacht werden, kann man davon ausgehen, dass sie immer relativ stark exprimiert werden, die Expressionsstärke der verschiedenen Gene aber auch von physiologischen Schwankungen abhängig ist. Deshalb findet man diese Gene in *Micro*- und *Macroarray*-Analysen häufig als differentiell exprimiert, obwohl ihre Expressionsänderung vermutlich eher durch andere Umwelteinflüsse bedingt wird, als durch die untersuchten.

Ebenfalls 2,9fach reprimiert wurde das Gen **Hv53MK** mit höchster Homologie zu einer EPSP-Synthase, einem Enzym des Shikimat-Weges. Dieser Klon zeigte in den *Dotblot* Analysen keine Expressionsveränderung nach BTH- oder MeJA-Behandlung. EPSP-Synthase katalysiert die Reaktion von Shikimat-3-phosphat und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSP) und anorganischem Phosphat. EPSP wird zu Chorismat umgewandelt, das eine wichtige Vorstufe von Auxin, Phytoalexinen, SA, Flavonoiden und Alkaloiden darstellt. Dieses Enzym stellt außerdem den Angriffspunkt des Totalherbizids Glyphosat dar: Glyphosat imitiert das PEP-Oxonium-Ion und blockiert

dadurch die PEP-Bindestelle der EPSP-Synthase (siehe <http://www.arches.uga.edu/~gpries/bcnb8010/>; September 2004). Die Transkripte dieses Gens wurden von GÖRLACH *et al.* (1995) bei Untersuchungen des Shikimatweges in Tomaten-Zellkulturen als induziert nach Zugabe eines pilzlichen Elicitors gefunden. ECKEY (2002) fand dieses Gen sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion mit *Bgh* induziert.

### 4.3.3 MeJA-Responsivität der differentiell exprimiert identifizierten Gene

Das Cyclopentanon-Derivat Jasmonsäure bzw. sein Methylester (MeJA), ein Duftstoff in Jasmin und Rosmarin, sind in höheren Pflanzen allgemein verbreitet. Sie hemmen auxinin-duziertes Streckungswachstum, gibberellininduziertes Wachstum von Zwergmais, cytoki-ninduziertes Kalluswachstum, die Samenkeimung und beschleunigen zusammen mit Abscisinsäure das Altern (LIBBERT, 1993). Durch Verwundung oder einen Angriff durch herbivore Insekten oder nekrotrophe pilzliche Pathogene kann es zu einer systemischen Resistenzantwort kommen (THALER *et al.*, 2004), die unabhängig von SA ist. Eine Akku-mulation von Jasmonsäure und anderen Oxylipinen induziert die Bildung von Abwehrfak-toren, wie Proteinase Inhibitoren und antifungal wirkenden Proteinen wie Thionine und Defensine, die jedoch nicht durch SA induziert werden (EPPLE *et al.*, 1995; PENNINGCKX *et al.*, 1996; PIETERSE *et al.*, 1998; VIGNUTELLI *et al.*, 1998). Allerdings führt die Behand-lung von Gersten-Keimlingen mit Jasmonat nicht zu einer Erhöhung der Resistenz gegen-über *Bgh* oder dem hemibiotrophen Pathogen *Bipolaris sorokiniana*. Weder in der kompa-tiblen noch in der inkompatiblen Interaktion kommt es in Gerste zu einer endogenen Ak-kumulation von Jasmonat (KOGEL *et al.*, 1995). In *A. thaliana* konnten ZIMMERLI *et al.* (2004) zeigen, dass eine Applikation von MeJA nach der Inokulation mit obligat biotrophen Pathogenen die Krankheitssymptome deutlich reduziert.

Obwohl der Mechanismus der Biosynthese von Jasmonat vollständig aufgeklärt ist, ist der entsprechende Signalweg nahezu komplett unbekannt. Auch das Zusammenwirken von SA- und JA-Signaltransduktionswegen ist bislang unverstanden. Durch die Aktivierung des SA-Signalweges im Rahmen der SAR kommt es zu Inhibierung der JA- vermittelten Resistenz (FELTON und KORTH, 2000; PIETERSE *et al.*, 2001). SPOEL *et al.* (2003) postulieren, dass durch SA aktiviertes NPR1 im Cytosol für die Hemmung des JA-Signalweges während der SAR verantwortlich ist.

Die durchgeführten Experimente sollten zeigen, welche der BTH-induzierbaren Gene, die in den *Macroarrays* identifiziert wurden, auch durch die Applikation von MeJA induziert

werden können und damit mögliche Überschneidungen der beiden Signalwege in Gerste aufzeigen. Insgesamt konnten durch die *Dotblot*-Hybridisierungen zwei Gene als stark durch MeJA induzierbar identifiziert werden, während elf Gene durch diese Behandlung reprimiert werden.

#### 4.3.3.1 MeJA-induzierbare Gene

Die zur Überprüfung der BTH-induzierbaren Gene erstellten *Dotblot*-Filter wurden mit Sonden von MeJA-behandelten Pflanzen hybridisiert, um Gene zu identifizieren, deren Expression sowohl während der chemisch induzierten Resistenz als auch durch die Behandlung mit MeJA verändert wird.

Zwei der 54 getesteten Gene wurden durch die Behandlung mit MeJA induziert. Für beide Klone konnte ihre Induzierbarkeit durch BTH in den *Dotblot* Hybridisierungen bestätigt werden, allerdings zeigte sich keine Expressionsveränderung nach Inokulation mit *Bgh* (siehe Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Der Klon **GAN001B19** wurde als 94fach induziert gefunden und enthält neben der sauren Phosphatase, *Bci6* (BEBER et al., 2000), ein Gen mit unbekannter Funktion. Die Expressionsveränderung konnte keinem der beiden Gene zugeordnet werden, da die Expressionsraten von keinem der MeJA-induzierten bzw. -reprimierten Gene durch *two step* RT-PCR bisher überprüft wurden. Da BEBER et al. (2000) jedoch die Induzierbarkeit von *Bci6* durch MeJA zeigen konnten, scheint es wahrscheinlich, dass die Veränderung der Expressionsrate in diesem Experiment von *Bci6* verursacht wird. Saure Phosphatasen spalten in saurem Milieu anorganisches Phosphat von verschiedenen Substraten. Als mögliche Funktion wird die Rückgewinnung von anorganischem Phosphat in absterbendem Gewebe diskutiert (DUFF et al., 1994; DEL POZO et al., 1999, KENTON et al., 1999, siehe auch Kapitel 4.3.1).

Klon **GAN002I09** kodiert für JIP37, ein Jasmonat induzierbares Protein mit einer Größe von 37 kD (siehe auch Kapitel 4.3.1). Das Gen wurde in den *Dotblot* Analysen als 37000fach induziert gefunden und erwies sich damit als eine hervorragende Positivkontrolle für die erfolgte Jasmonat-Induktion in diesem Experiment. Das Protein wurde von HAUSE et al. (1994) erstmals beschrieben. Bisher konnte JIP37 keine Funktion zugeordnet werden.

Anders als die chemisch induzierbaren *Bci*-Gene, die bis auf *Bci5* und *Bci8* auch unterschiedlich stark durch MeJA-Applikation induziert werden (BEBER et al., 2000), zeigten in den durchgeführten *Dotblot*-Analysen nur zwei der insgesamt 54 getesteten Gene eine

Induktion der Genexpression nach MeJA. Aus unbekanntem Gründen konnte keine Induktion von *Bci1*, der Lipoxygenase, gezeigt werden, obwohl es als MeJA-induziertes Gen in Gerstenblättern beschrieben wurde (FEUSSNER *et al.*, 1995; VÖRÖS *et al.*, 1998). Da es sich um ein Kandidatengen unseres Instituts handelt, kann ausgeschlossen werden, dass es sich beim untersuchten Gen um ein homologes Gen mit unterschiedlicher Regulation handelt. Die Induzierbarkeit von *Bci4*, einem *EF-hand* Protein durch MeJA war nur sehr schwach ausgeprägt (BEBER, 2001), so dass die Sensitivität der *Dotblot*-Analyse möglicherweise nicht ausreicht, um die Induzierbarkeit sichtbar zu machen. Da jedoch *Bci6* und *Jip37*, die ebenfalls als MeJA-induzierbar beschrieben sind, gefunden werden konnten, konnte der Erfolg der MeJA-Behandlung für dieses Experiment gezeigt werden.

#### 4.3.3.2 MeJA-reprimierte Gene

Der Klon **GAN001D07** wurde durch *Dotblot* Analysen als stark durch BTH (siehe Kapitel 3.2.2.1) und durch MeJA reprimiert identifiziert, konnte jedoch aus Zeitgründen nicht durch *two step* PCR bestätigt werden, da aufwändige Sequenzuntersuchungen notwendig waren, um den Klon zumindest teilweise zu charakterisieren. Der Klon enthält mindestens zwei verschiedene Plasmide, was nur extrem selten auftritt. Ein Plasmid enthält als Insert ein Gen mit Homologie zu einem nicht genauer charakterisierten ATP-abhängigen Transporter. ATP-abhängige Transporter dienen dem Transport eines Stoffes gegen ein Konzentrationsgefälle (siehe Kapitel 4.3.1). Das zweite Plasmid ließ sich bis zum Abschluss der Arbeiten nicht sequenzieren.

Bei den *Inserts* der Klone **GAN001M04**, **GAN001P03**, **GAN003B09**, **GAN004K22** und **HvD00126** handelt es sich um Gene unbekannter Funktion. Sie zeigten teilweise sehr starke Repression durch die Behandlung mit MeJA, allerdings in den *Dotblot* Analysen bis auf **HvD00126** keinerlei Expressionsveränderung durch BTH und *Bgh*. **HvD00126** zeigte in der inkompatiblen Interaktion mit *Bgh* eine 3fache Induktion der Genexpression (siehe Kapitel 3.2.2.2).

Das Plasmid des Klons **GAN002G16** enthält drei verschiedene *Inserts*: ein Glycoprotein-ähnliches Protein, ein Glucan-endo-1,3- $\beta$ -Glucosidaseisoenzym und eine Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GADPH). Mögliche Funktionen dieser Proteine wurden bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben. Die Induzierbarkeit der verschiedenen Gene durch BTH konnte in den *Dotblot* Hybridisierungen bestätigt werden, wurde jedoch nicht unabhängig durch *two step* RT-PCRs bestätigt. Der Klon zeigte eine starke Repression um den Faktor 1850 durch die Behandlung mit MeJA.

Ebenfalls stark reprimiert wird das Gen des Chlorophyll a/b bindenden Proteins, das durch den Klon **GAN002L09** repräsentiert wird. Der Klon wurde durch die Inokulation mit *Bgh* um den Faktor 2,7 reprimiert (siehe Kapitel 3.2.2.2).

Der Klon **GAN003E17** zeigt höchste Homologie zu einem EST aus der TIGR-Datenbank, der ähnlich einem Auxin-reprimierte Gen ist und wurde in den *Dotblot* Analysen als 67fach reprimiert durch MeJA gefunden. Die Induzierbarkeit durch BTH konnte durch *Dotblot* Analysen ebenfalls bestätigt werden (siehe Kapitel 3.2.2.1). Auxin entsteht vor allem in schnell wachsenden Meristemen sowie in Laub- und Keimblättern. Der auffälligste Auxineffekt ist die Stimulation des Streckungswachstums. Unter anderem sind aber auch Wirkungen auf die Zellteilung und Differenzierung in verholzende Xylemzellen ist beschrieben (LIBBERT, 1993). Da Auxin und JA z. B. beim Streckungswachstum als Gegenspieler wirken (siehe Kapitel 4.3.2), bleibt unklar, weshalb ein Gen mit Ähnlichkeit zu einem Auxin-reprimierten Gen auch durch die Applikation von JA reprimiert wird.

Der 11fach reprimierte Klon **GAN003F10** enthält zwei Gene, eines zeigt Homologie zu einem Chlorophyll a/b-bindenden Protein, während das andere Homologie zu einem Protein unbekannter Funktion aufweist. Die Funktion von Chlorophyll a/b-bindenden Protein wurde bereits im Zusammenhang mit dem Klon GAN002L09 (s. Kapitel 4.3.2.2) diskutiert. Allerdings zeigte dieser Klon keine Expressionsveränderung in den *Dotblot* Analysen nach BTH-Behandlung bzw. *Bgh*-Inokulation.

Das Gen *Hvbas1*, enthalten in Klon **Hv196rh**, wurde in diesen Experimenten als 11fach reprimiert gefunden. Es handelt sich bei diesem Gen um eine Thiothionin-abhängige Peroxidreduktase (TPx, BAIER und DIETZ, 1996), die Hydrogenperoxid und Alkylhydroperoxide reduziert (JACOBSON *et al.*, 1989; CHAE *et al.*, 1994). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass diese Enzyme die Schädigung von Nukleinsäuren und die Inaktivierung von Proteinen durch oxidativen Stress verhindern können (KIM *et al.*, 1989; LIM *et al.*, 1993). Eine Repression des Gens könnte diesen Schutz vor oxidativem Stress, z. B. während der Seneszenz, verhindern. Die Induzierbarkeit durch BTH konnte in den *Dotblot* Analysen nicht bestätigt werden.

#### 4.4 Transiente Transformationsassays

Die fünf im Rahmen dieser Arbeit durch *two-step* RT-PCR bestätigten BTH-induzierbaren Gene wurden im transienten Transformationsassay bezüglich ihrer Beteiligung an der Resistenzprägung der Gerste gegenüber *Bgh* untersucht. Dafür wurde *in vitro* dsRNA

der einzelnen Gene hergestellt und mittels Patikelbombardement in Gerstenepidermiszellen eingebracht. Durch den Mechanismus der RNA-Interferenz kommt es zum *Silencing* des entsprechenden Gens. Die Wirkung dieses *knock downs* auf die Interaktion mit *Bgh* kann anhand von einzelnen Zellen ausgewertet werden (SCHWEIZER *et al.*, 1999).

Außerdem wurden mit Hilfe des transienten Transformationsassays der Einfluss der Kandidatengene *Bci2*, *Bci9*, *Eds5* und *Sgt1* untersucht. Die Überexpression von Genen ist nur möglich, wenn deren komplette Sequenz bekannt ist. Da vom *Eds5*-Homolog aus Gerste, welches aus einer EST-Datenbank identifiziert wurde, und von den neu identifizierten Genen nur Teile der Sequenz bekannt sind, waren hier nur RNAi-Experimente möglich.

#### 4.4.1 Cysteinprotease -GAN003J15-

Die Cysteinprotease **GAN003J15** ist stark durch BTH induzierbar, zeigte aber keine Expressionsveränderung in den *Dot blot* Analysen nach *Bgh*-Infektion oder MeJA-Behandlung. Sie zeigt die höchste Homologie ( $2e^{-17}$  nach dem BlastX Algorithmus) zu einer *fruit bromelain* Vorstufe aus Ananas (T10518). Bromelain ist eine Mischung aus überwiegend proteolytischen Enzymen aus Früchten, Stamm und Blättern der Ananas, *Ananas comosus*, einem Mitglied der Familie der Bromeliaceae (siehe auch Kapitel 4.3.1).

Die durchgeführten transienten Transformationsassays zeigten, dass der *knock down* der Cysteinproteinase keinen Einfluss auf die Resistenz der Gerste gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz hat. Da Cysteinproteasen eine Multigenfamilie bilden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zum *knock down* mehrerer Gene mit ähnlicher Sequenz kommt. Es ist aber unwahrscheinlich, dass die Translation aller Mitglieder der Genfamilie durch das sehr spezifische RNAi unterdrückt wurde. Die eingebrachte dsRNA wird von einem Enzym, genannt DICER, das RNase III ähnlich ist, in 20-25 bp lange Fragmente gespalten (BERNSTEIN *et al.*, 2001) Diese so genannten *small interfering* (si) RNAs werden in ihre Einzelstränge aufgetrennt und es kann nachfolgend zur sequenzspezifischen Anlagerung des *antisense* Stranges an die entsprechende homologe mRNA kommen, die dann durch Endonukleasen degradiert wird (METZLAFF, 2002). Da das DICER Enzym aus einem Pool von dsRNAs nicht alle möglichen siRNAs bildet (DYKXHOORN *et al.*, 2003), sondern gewisse Sequenzen präferiert und da Sequenzunterschiede, sofern sie nicht im mittleren Bereich liegen (10. bis 12. Base), toleriert werden (ELBASHIR *et al.*, 2001), können keine theoretischen Voraussagen über die Spezifität der dsRNA gemacht werden. SCHWEIZER *et al.* (2000) konnten jedoch mit der dsRNA einer Dihydroflavonreduktase aus Gerste trotz 81 %iger Sequenzübereinstimmung nicht das entsprechende Gen aus Mais silencing. Auch

SCHULTHEIB (2003) konnte zeigen, dass der RNAi-Mechanismus in der Gruppe der *Rac/Rop*-Gene, die alle in konservierten Domänen vollständig identische Sequenzbereiche besitzen, eine hohe Spezifität besitzt.

Trotzdem müsste in diesem Fall eine Überprüfung der Spezifität stattfinden, indem man verschiedene Cysteinproteasen mit einem Gen für ein fluoreszenzierendes Protein wie GFP fusioniert, diese überexprimiert und dann den Wirkungsgrad der RNAInterferenz bestimmt.

Da es trotz des möglichen *knock downs* von mehreren Mitgliedern der Multigenfamilie nicht zu einer Veränderung der Penetrationsrate von *Bgh* kommt, kann davon ausgegangen werden, dass diese Cysteinprotease allein keinen Einfluss hat. Möglicherweise könnte durch gleichzeitigen *knock down* von Interaktionspartnern der Cysteinprotease ein Einfluss gezeigt werden.

#### **4.4.2 Reticulon-like -GAN001D12-**

Bei Reticulon-Proteinen handelt es sich um Proteine, die mit dem Endoplasmatischen Reticulum assoziiert sind. Ihnen wird eine Funktion während der Ausbildung der Apoptose beim Menschen zugeschrieben, bislang ist jedoch die Funktion der Reticulon-ähnlichen Proteine in Pflanzen nicht bekannt (siehe auch Kapitel 4.3.1). Die Induzierbarkeit des Gens durch konnte durch die verschiedenen Filtertechniken und *two step* RT-PCR bestätigt werden. Durch die Inokulation mit *Bgh* bzw. die Behandlung mit MeJA ließen sich keine Expressionsveränderungen hervorrufen. Allerdings zeigten die transienten Transformationsassays kein eindeutiges Ergebnis. Der *knock down* dieses Gens führte zu sehr schwankenden Effekten in Bezug auf die Resistenz der Gerste gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz, so dass nach diesen Ergebnissen eine direkte Beteiligung dieses Reticulon-ähnlichen Proteins an der Abwehr von *Bgh* zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, aber doch eher unwahrscheinlich ist.

#### **4.4.3 GAN001K12**

Die Induzierbarkeit des Gens GAN001K12, das keine Homologie zu Genen mit derzeit bekannter Funktion hat, durch BTH wurde mittels der verschiedenen Filtertechniken und *two step* RT-PCR gezeigt. Durch die Anwendung der *Dotblot*-Analysen konnte keine Expressionsveränderung dieses Gens gezeigt werden nach der Behandlung mit MeJA bzw. durch die Inokulation mit *Bgh*.

Der transiente *knock down* des Gens führt sowohl in unbehandelten als auch in mit BTH behandelten Blättern zu schwankenden Effekten. In zwei der vier Experimente mit unbehandelten Blättern wurde durch den *knock down* des Gens GAN001K12 eine Erhöhung der Penetrationsrate um etwa 28 % erzielt, während die beiden anderen eine Reduktion um etwa 38 % aufwiesen. Mit BTH-behandelten Blättern wurden zwei Experimente durchgeführt. Eines der beiden zeigte eine um mehr als 2fache Erhöhung der Penetrationsrate, aber das zweite Experiment zeigte einen, wenn auch nicht so starken, gegenteiligen Effekt.

Durch eine größere Anzahl von Experimente hätte vielleicht eine eindeutigere Änderung der Penetrationsrate im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden können. Allerdings zeigen Kandidatengene, die einen Einfluss auf die *Bgh*-Interaktion haben, üblicherweise beständigere Effekte in der stabilen Transformation, wohingegen die anderen Gene häufig zwar teilweise starke Effekte in einzelnen Experimenten haben, diese jedoch schwanken und im Mittel zu keiner signifikanten Veränderung führen. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint eine ursächliche Beteiligung dieses Gens an der Resistenz gegenüber *Bgh* unwahrscheinlich.

#### **4.4.4 GAN001E14**

Das Gen GAN001E14 zeigt ebenfalls keine Homologie zu Genen mit bekannter Funktion. Die Induzierbarkeit durch BTH wurde durch *two step* RT-PCR bestätigt. Durch die *Dotblot* Analysen konnte eine schwache Repression des Gens um den Faktor 2,9 in der inkompatiblen Interaktion mit *Bgh* gezeigt werden.

In den beiden Experimenten, in denen unbehandelte Blätter transformiert wurden, zeigte sich durch den *knock down* des Gens eine Verringerung der Penetrationsrate von *Bgh* um etwa 25 %. In den BTH-behandelten Blättern waren in zwei Experimenten nur schwache Effekte von unter 10 % in jeweils unterschiedliche Richtungen zu erkennen.

Da BTH zu einer Erhöhung der Resistenz gegen *Bgh* führt, sollte man erwarten, dass BTH-induzierbare Gene an der Ausprägung dieser Resistenz beteiligt sind. Eine Überexpression sollte als zu erhöhter Resistenz führen, während ein *knock down* zu erhöhter Anfälligkeit führen sollte. Entgegen dieser Erwartung scheint der *knock down* des Gens GAN001E14 die Resistenz der Gerste gegen *Bgh* zu erhöhen. Somit könnte das Gen ein Suszeptibilitätsfaktor sein, der in inkompatiblen Interaktionen herunterreguliert wird, da das Ausschalten des Gens zu einer erhöhten Resistenz führte. Unklar bleibt jedoch, warum BTH zu einer Induktion des Gens führt.

#### 4.4.5 GAN001L11

Das Gen GAN001L11 zeigt ebenfalls keine Homologie zu Genen mit bekannter Funktion. Es wurde durch die *two step* RT-PCR als chemisch induziert bestätigt und zeigte keine Expressionsveränderung durch die Behandlung mit MeJA oder die Inokulation mit *Bgh*.

In unbehandelten Gerstenblättern zeigte der *knock down* des Gens GAN001L11 nur sehr schwache Effekte, die wahrscheinlich als versuchsbedingte Schwankungen angesehen werden können.

Mit Blättern von BTH-induzierten Gerstenpflanzen wurden drei Experimente durchgeführt, von denen eines ebenfalls einen sehr schwachen Effekt zeigte, während die anderen beiden Effekte in entgegengesetzte Richtungen zeigten. Einmal wurde eine um 44 % erhöhte Resistenz erreicht, während im anderen Experiment die Penetrationsrate im Vergleich zur Kontrolle um 44 % erhöht war.

Deshalb lässt sich aus den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Untersuchungen keine Beteiligung des Gens GAN001L11 an der Resistenzausprägung der Gerste gegenüber *Bgh* ableiten.

#### 4.4.6 *Eds5*: MATE-Transporter

Da es auch in kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktionen zu einer Begrenzung des Pathogenwachstums kommt, wurde von GLAZEBROOK *et al.* (1996) in *A. thaliana* nach hypersuszeptiblen Mutanten gegenüber einer Mehltauinfektion gesucht, um beteiligte Komponenten dieser Basisresistenz zu identifizieren. Es konnten verschiedene Mutanten von *A. thaliana* mit erhöhter Anfälligkeit gegenüber dem moderat virulenten biotrophen Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* isoliert werden. Bei der Mutante *eds5* (*eds* = *enhanced disease susceptibility*) konnte die Mutation eines Gen mit hoher Homologie zu MATE-Transportern für den Phänotyp verantwortlich gemacht werden.

Durch Datenbankvergleiche konnte ein EST aus Gerste identifiziert werden, der nach dem BlastN Algorithmus eine Homologie von  $2e^{-36}$  zu *Eds5* aus *A. thaliana* (Acc. Nr.: AAM63262.1) aufweist. Sollte das sequenzhomologe Gen aus Gerste eine ähnliche Funktion ausüben wie in *A. thaliana*, wäre zu erwarten gewesen, dass der transiente *knock down* eine erhöhte Suszeptibilität bewirkt. Nach den vorliegenden Ergebnissen hat *Eds5* keinen Einfluss auf die Resistenz der Gerste gegen *Bgh*. Da es sich nur um ein Genfragment handelte, konnten wiederum nur transiente *knock down* Experimente, jedoch keine entsprechenden Überexpressionsexperimente durchgeführt werden. Die ersten drei

Experimente zeigten, dass das *Silencen* des Gerstengens eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Bgh* bewirkt. Drei weitere Experimente zeigten jedoch gegenteilige Effekte. Hier wurde durch den *knock down* von *Eds5* eine erhöhte Resistenz erzeugt. Bei Genen, die keinen direkten Einfluss auf die Resistenzausprägung haben kommen es häufig zu schwankenden Effekten (Hückelhoven, persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der *knock down* des Gerstenhomologs zu *AtEds5* keinen Einfluss auf die Resistenz der Gerste gegenüber *Bgh* hat.

#### **4.4.7 *Bci2*: Thionin**

Thionine sind niedermolekulare basische cysteinreiche Polypeptide, die antibakteriell und antifungal, aber auch toxisch auf tierische und pflanzliche Zellen wirken, indem sie die Permeabilität von Zellmembranen modifizieren (BOHLMANN und APEL, 1991). In Gerstenblättern akkumulieren Thionine am stärksten in der äußeren Zellwand von Epidermiszellen etioliertes Gerstenblätter. Durch Belichtung kommt es zum schnellen Abbau der Transkripte (REIMANN-PHILIPP *et al.*, 1989). In größeren, ungestressten Pflanzen sind die Transkripte von Thioninen fast nicht nachweisbar, aber zwei Tage nach der Inokulation mit *Bgh* kommt es ebenfalls zu einer starken Transkriptakkumulation von Thioninen (BOHLMANN *et al.*, 1988). In resistenten Linien akkumulieren Thionine in der Papille und in der Zellwand nahe der Infektionsstelle, während in anfälligen Linien diese Phänomene nicht zu beobachten sind (EBRAHIM-NESBAT *et al.*, 1989). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Thionine eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr von Gerstenpflanzen spielen.

Bei den blattspezifischen Thioninen handelt es sich um eine Multigenfamilie mit 50 bis 100 Mitgliedern im haploiden Gerstengenom. Die meisten der Gene sind nicht identisch, sondern stellen verschiedene Varianten dar (BOHLMANN *et al.*, 1988). Bei Toxinen ist das nicht ungewöhnlich, da es durch die ständige Interaktion von Wirt und Pathogen zu einer Koevolution kommt. Die Anpassung des Pathogens an ein Toxin verursacht die Entwicklung eines neuen Toxins an das das Pathogen noch nicht adaptiert ist (siehe auch Kapitel 1.1.2).

Das Gen *Bci2* wurde von BEBER *et al.* (2000) als chemisch induzierbares Gen identifiziert. Es zeigt die höchste Sequenzübereinstimmung mit einem in jungen Gerstenblättern stark akkumulierenden Gen (GAUSING, 1987). Neben der Induktion durch DCINA und BTH führt auch die Applikation von MeJA zur Transkriptakkumulation, während die Applikation von SA oder Sorbitol, sowie Verwundung und Inokulation mit *Bgh* keinen Einfluss

auf die Genexpression haben (BEBER *et al.*, 2000). Zeitlich begrenzte Induktionen konnten nur durch die Infiltration der Nichtwirt-Pathogene *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC 3000) und *Bacillus subtilis* erzielt werden (BEBER, 2001).

Da sehr ähnliche Thionine durch *Bgh* induziert werden, *Bci2* jedoch durch die chemischen Resistenzinduktoren, blieb zu überprüfen, ob *Bci2* eine ursächliche Rolle in der induzierten Resistenz der Gerste spielt. Die transiente Überexpression des Gens in Gerstenepidermiszellen hatte jedoch keinen Einfluss auf die Resistenz gegen *Bgh*. In drei unabhängigen Experimenten konnten jeweils nur Veränderungen der Penetrationsrate gegenüber der Kontrolle von unter 10 % erzielt werden, die als versuchsbedingte Schwankung angesehen werden können (siehe Abbildung 3.13).

Der transiente *knock down* des Gens verursachte dagegen eine um etwa 29 % erhöhte Penetrationsrate in BTH-behandelten Gerstenblättern gegenüber *Bgh*. Allerdings wurde in einem der neun durchgeführten Experimente die Penetration aus unbekanntem Grund im Vergleich zur Kontrolle um 41 % vermindert (siehe Abbildung 3.12). Durch die große Anzahl an unabhängigen Wiederholungen erreicht das gemittelte Ergebnis trotzdem eine Signifikanz von  $p=0,012$ .

In nicht induzierten Blättern wurde durch den transienten *knock down* keine Veränderung der Penetrationsrate gegenüber der Kontrolle beobachtet. Das liegt wahrscheinlich daran, dass im nicht induzierten Zustand die Expressionsrate für das Thionin so niedrig ist, dass sie durch die RNA-Interferenz nicht deutlich reduziert werden kann und dieses Gen nicht durch *Bgh* selber induziert wird. Mit *Bci2* konnte somit erstmalig ein Gerstengen identifiziert werden, welches wahrscheinlich ursächlich an der chemisch induzierten Resistenz gegen *Bgh* beteiligt ist. Da es jedoch ein Mitglied einer hoch konservierten Multigenfamilie ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zum gleichzeitigen *knock down* von mehreren ähnlichen Genen kam. Jedoch zeigt sich dieser Effekt nur nach vorheriger BTH-Induktion. Somit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine BTH-Induktion von Thioninen, die nicht *Bgh*-responsiv sind, an der BTH-vermittelten Resistenzinduktion ursächlich beteiligt sind.

#### 4.4.8 *Bci9*: Apyrase

*Bci9* (AJ250665), ein Gen mit hoher Homologie zu Apyrasen, wurde ebenfalls durch suppressive Subtraktionshybridisierung von BEBER *et al.* (2000) als chemisch induzierbar isoliert. Apyrasen (EC 3.6.1.5) sind Diphosphohydrolasen, die unter anderem an der

Aggregation von Blutplättchen (MARCUS und SAFIER, 1993), der Neurotransmission (EDWARDS und GIBB, 1993) und der Proteinglycosilierung im Golgi Apparat (ABEIJON *et al.*, 1993) beteiligt sind. Als mögliche Funktionen in Pflanzen werden die Mobilisierung von Phosphat und die Detoxifizierung von Xenobiotica diskutiert (THOMAS *et al.*, 1999 und 2000). GS52, eine Ektoapyrase aus *Glycine soja* (Acc. Nr.: AF207688), hat nach dem BlastX-Algorithmus eine Ähnlichkeit von  $e^{-117}$  zu BCI9. Ektoapyrasen sind durch die Lokalisierung ihres katalytischen Zentrums in der extrazellulären Matrix charakterisiert. Anders als BCI9 wurde GS52 nur in der Wurzel gefunden. Eine Induktion der Genexpression während der Interaktion der Wurzeln mit dem Stickstoff-fixierenden Symbionten *Bradyrhizobium japonicum* und die Hemmung der Knöllchenbildung durch die Behandlung mit einem Anti-GS52 Antikörper zeigen deutlich, dass GS52 in die Knöllchenbildung der Leguminosen involviert ist (DAY *et al.*, 2000).

*Bci9* wird nur durch die Applikation von chemischen Resistenzaktivatoren wie DCINA und BTH und durch *floaten* auf MeJA induziert. Erstaunlicherweise kann durch die Applikation von SA keine Verstärkung der Genexpression erzielt werden. Da eine Induktion der Genexpression nur durch artifizielle Bedingungen verursacht werden konnte, diskutiert BEBER (2001) eine mögliche Beteiligung von *Bci9* an einem Entgiftungsmechanismus. Auch THOMAS (2000) beschreibt die Unterstützung der Entgiftung von Zellen durch Aufrechterhaltung des ATP-Gradienten durch eine Ektoapyrase. Dadurch kann ein Toxin im Symport mit ATP aus der Zelle transportiert werden.

Eine Beteiligung von *Bci9* an der Resistenz gegen den Echten Gerstenmehltaupilz wurde durch die transiente Überexpression des Gens in Gerstenepidermiszellen untersucht.

Es wurden fünf voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Zwei Experimente zeigten eine schwache Reduktion der Penetrationsrate um 14 und 26 %. Drei weitere Experimente zeigten eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Penetrationsrate, in einem Experiment sogar um 72 %. Gemittelt ergibt sich, dass die Überexpression von *Bci9* die Penetrationsrate um 14 % erhöht. Dieser Effekt ist sehr niedrig und kann durch versuchsbedingte Schwankungen verursacht sein. Es ist davon auszugehen, dass die Überexpression von *Bci9* keinen Einfluss auf die Abwehr von *Bgh* hat. Vorläufige Ergebnisse deuten daraufhin, dass der transiente *knock down* des Gens eine erhöhte Anfälligkeit der Gerste gegenüber *Bgh* bewirkt (Geldermann, persönliche Mitteilung).

#### 4.4.9 *Sgt1*

SGT1 wurde als möglicher Interaktionspartner von RAR1 identifiziert (SHIRASU *et al.*, 1999). RAR1 wird für die vollständige *Mla12*-R-Gen-vermittelte Resistenz benötigt (*rar* = *required for mla-mediated resistance*; JØRGENSEN, 1988). Infolge einer Mutation von *HvRAR1* in Gerste kommt es nicht mehr zur Ausbildung einer HR und die Transkription von PR-Proteinen in kompatiblen Interaktionen mit *Bgh* ist deutlich reduziert (FREIALDENHOVEN *et al.*, 1994). *rar1*-Mutanten zeigen auch deutlich reduzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (SHIRASU *et al.*, 1999). Ein funktionales *Rar1* wird jedoch nicht von allen *Mla*-Resistenzgenen zur Ausbildung einer vollständigen Resistenz benötigt (JØRGENSEN, 1996). *Rar1* ist auch in dikotylen Pflanzen ein zentraler Faktor der Resistenz gegen verschiedene Pathogene (COLLINS *et al.*, 2002). *HvRAR1* ist wahrscheinlich im Cytoplasma lokalisiert und enthält zwei CHORD-Domänen, die Zink-Ionen binden können (SHIRASU *et al.*, 1999). Die genaue Funktion des Proteins ist jedoch bislang unklar.

Zur Aufklärung der Funktion wurden *yeast-two-hybrid* Analysen durchgeführt, um mögliche Interaktionspartner von AtRAR1, dem Homolog aus *Arabidopsis thaliana*, zu identifizieren. Zwei Proteine aus *A. thaliana* mit hoher Homologie zu SGT1 aus Hefe wurden als Interaktionspartner von AtRAR1 gefunden. In Hefe wird *Sgt1* für den Fortlauf des Ubiquitin-abhängigen Zellzyklus benötigt. Es interagiert mit dem Kinetochor und dem SCF-Typ E3 Ubiquitin-Ligase Komplex durch Interaktion mit SKP1 (KITAGAWA *et al.*, 1999). In Gerste konnte ein Homolog von SGT1 identifiziert werden, das mit *HvRAR1* interagiert. Dass *HvSgt1* wie *Rar1* für die *Mla6*-, aber nicht für die *Mla1*-spezifische Resistenz benötigt wird, konnte durch den transienten *knock down* von *HvSgt1* durch RNA-Interferenz gezeigt werden (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass *HvSGT1* in Assoziation mit *HvRAR1* oder mit dem SCF Ubiquitin E3 Ligase Komplex und dem COP9 Signalosom (AZEVEDO *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2002) vorliegt.

In Pflanzen wird eine Beteiligung von SGT1 an der Ubiquitinierung, also Markierung von Proteinen, die als negative Regulatoren der Resistenz wirken, postuliert. Die Ubiquitinierung führt zur Degradation der Zielproteine durch das 26S Proteasom über den spezifischen SCF Komplex. Da SGT1 und RAR1 aber auch mit HSP90, einem *heat shock* Protein interagieren, wird eine mögliche Funktion der beiden Proteine als Cochaperone diskutiert (TAKAHASHI *et al.*, 2003).

Um eine Abhängigkeit der chemisch induzierten Resistenz der Gerste von *Sgt1* zu überprüfen wurden transiente *knock down* Experimente in Blättern von chemisch induzierten und unbehandelten Pflanzen durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.2.4).

Die BTH-Behandlung reduzierte die Penetrationsrate um etwa 35 %, während der transiente *knock down* von *Sgt1* unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf die Penetrationsrate nicht-induzierter oder induzierter Blätter hat (siehe Abbildung 3.15). Die Wirksamkeit der RNA-Interferenz wurde durch das Ausschalten eines Fusionsproteins aus SGT1 und GFP gezeigt (EICHMANN, unveröffentlichte Daten).

Ausgehend von diesen Ergebnissen kann angenommen werden, dass die chemisch induzierte Resistenz in Gerste unabhängig von *Rar1/Sgt1* wirkt.

#### **4.5 Abschließende Betrachtungen**

Die biochemischen und physiologischen Veränderungen, die Pflanzen zur Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen oder zur Pathogenabwehr durchmachen, können durch Transkriptomanalysen, die mit Hilfe der Chip- oder *Array*-Technologie in immer größerem Umfang durchführbar sind, untersucht werden. MALECK *et al.* (2000) konnten mit Hilfe von *Microarrays* eine Vielzahl neuer Gene identifizieren, die während der Ausbildung der SAR in *A. thaliana* differentiell reguliert sind.

Da die Behandlung mit chemischen Resistenzinduktoren wie BTH und DCINA in Getreide zur erhöhten Resistenz gegenüber *Bgh* führt, sollten durch die Verwendung von Filtern mit etwa 1500 Genfragmenten der Gerste, Gene identifiziert werden, die durch die Behandlung mit BTH differentiell exprimiert werden. Dies soll zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der IR in Gerste beitragen. Unter den identifizierten Genen sollten sich solche befinden, die ursächlich an der Ausprägung dieser Resistenz beteiligt sind. Diese Gene könnten dann als Kandidaten für eine stabile Transformation von Getreide mit dem Ziel der dauerhaften Resistenzerhöhung sein.

Die Erwartung war, nach der Applikation von BTH Gene zu finden, deren Expression im Fall einer Pathogeninfektion zu einer schnelleren Abwehrreaktion der Pflanze führen können. Dazu zählen sicherlich zellwandassoziierte Enzyme, wie die Amidase, GAN001A04 oder das Glucan-endo-1,3- $\beta$ -Glucosidaseisoenzym, GAN002G16, aber auch Proteine, die am Transport verschiedener Stoffe beteiligt sind, wie der ATP-abhängige Transporter, GAN001D07, der Golgi-Transportkomplex, GAN001F12 oder das Importin- $\beta$ -ähnliche Protein, GAN001H20.

Die *Dot blot*-Hybridisierungen mit Sonden von *Bgh*-inokulierten bzw. MeJA-behandelten Pflanzen geben bedingt durch die relativ kleine Zahl von untersuchten Genen keinen Hinweis auf das Zusammenwirken verschiedener Signaltransduktionswege.

In der inkompatiblen Interaktion zwischen dem resistenten Gerstenkultivar IWe und *Bgh* der Rasse A6 wurden von den untersuchten BTH-induzierbaren Genen nur wenige schwach differentiell exprimiert. MALECK *et al.* (2000) fanden in ihren Untersuchungen in der inkompatiblen Interaktion zwischen *A. thaliana* und *Peronospora parasitica* gleiche Expressionsmuster wie während der SAR. Die kompatible Interaktion beruht meist auf einer zu langsamen Resistenzantwort der Pflanze auf das Pathogen. Während der chemischen Induktion laufen gleiche Prozesse ab, so dass die Pflanze im Falle einer Pathogenattacke deutlich schneller reagieren kann. Die Expressionsmuster während der chemischen Induktion und der inkompatiblen Interaktion haben nach den vorliegenden Ergebnissen in Gerste jedoch nahezu keine Übereinstimmungen.

Obwohl sich in letzter Zeit immer mehr Hinweise finden, dass die sich teilweise antagonistisch wirkenden Signalwege der SA und MeJA-vermittelten Resistenz in *A. thaliana* positiv beeinflussen (SCHENK *et al.*, 2000; VON RAD *et al.*, 2005), kann dies nach den vorliegenden Ergebnissen nicht für *H. vulgare* gelten. Von den bestätigten BTH-induzierbaren Genen war nur *Bci6* bzw. das zweite Insert dieses Klons ebenfalls durch MeJA induzierbar. Drei weitere BTH-induzierbare Gene wurden jedoch nach Behandlung mit MeJA als stark reprimiert gefunden.

Durch die *two step* RT-PCRs zur abschließenden Bestätigung der neu identifizierten chemisch induzierbaren Gene der Gerste konnten bislang nur fünf Gene verifiziert werden. Die Methode der *Macroarrays* fand jedoch unabhängig davon Bestätigung im Wiederfinden der bereits als chemisch induzierbar bekannten *Bci*-Gene (BEBER *et al.*, 2000). Die funktionelle Überprüfung der gefundenen Gene zeigte, dass keines dieser Gene ursächlich an der Ausprägung der Resistenz der Gerste gegenüber *Bgh* beteiligt ist.

Die funktionelle Überprüfung der Kandidatengene *HvSgt1* und einem Gerstenhomolog von *AtEds5* brachten ebenfalls keine Aufschlüsse über funktionell an der Resistenz gegen *Bgh* beteiligte Gene.

Auch die stabile Überexpression von *Bci4*, einem Gen das ebenfalls chemisch induzierbar ist, zeigte keinen Einfluss auf die Resistenzausprägung in anfälligen Gersten- und Weizenlinien gegenüber *Bgh*.

Allein das Ausschalten des antifungal wirkenden *Bci2*, einem Thionin, erhöhte die Suszeptibilität von Gerste gegenüber *Bgh*. Allerdings handelt es sich hier nicht um ein Protein des Signalweges, sondern um ein direkt auf das Pathogen wirkendes Effektormolekül.

Erfahrungsgemäß lassen sich sowohl mit der Methode der suppressiven Subtraktionshybridisierung, die zur Identifizierung von *Bci4* führte, als auch die *Macroarrays* aufgrund der selbst gewählten Ausschlussgrenze von 2,5 nur Gene identifizieren, die eine relativ starke Veränderung ihrer Expression zeigen. Aber auch Gene, die eine schwächere Regulation zeigen, können eine relevante Funktion haben. Zum Beispiel liegen Signalrezeptoren meist in ausreichender Menge vor, ihr Aktivitätszustand wird durch Konformationsveränderung oder Bindung von Liganden, als durch Transkriptveränderung bedingt. Deshalb werden regulatorische Gene, die an der Abwehr von Pathogenen beteiligt sind, meistens durch Überprüfung einer großen Zahl verschiedener Mutanten oder durch Kandidatengen-Ansätze identifiziert. Da die Generierung von T-DNA-Insertionslinien in Gerste noch nicht sehr weit fortgeschritten, ist diese Methode derzeit noch nicht praktikabel.

Durch die Generierung der EST-Datenbank aus epidermalemem Gewebe BTH-induzierter Gerstenpflanzen wurde eine große Zahl von Genen zugänglich gemacht, die sich nicht auf dem kommerziell erhältlichen *22K Barley1 GeneChip probe array* von Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA; CLOSE *et al.*, 2004) finden. Etwa 30 % der Gene der GAN-Bank finden sich nicht auf diesem Filter. Mit großer Wahrscheinlichkeit, handelt es sich bei gering exprimierte und deshalb möglicherweise regulatorische Gene. so dass durchaus die Berechtigung besteht auch im Zeitalter der *Microarrays* mit 22.000 Genen noch mit „kleinen“ Filtern mit nur 1.500 Genen zu arbeiten. Da diese ESTs jetzt der Öffentlichkeit zugänglich gemacht wurden, ist für eine zweite Generation von Oligonukleotid-*arrays* zu erwarten, dass diese Gene aufgenommen werden. Ein großer Vorteil der Oligonukleotid-*arrays* gegenüber den GAN-Filtern ist neben der großen Zahl untersuchbarer Gene, dass es sich um eine standardisierte Technik handelt, und dass es durch gemeinsame Datenbanken eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse gibt.

---

## 5 Zusammenfassung

Durch die Applikation von chemischen Resistenzinduktoren kommt es in anfälligen Gerstensorten zu einer deutlich erhöhten systemischen Resistenz gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Bgh*). Es sollten Gene identifiziert werden, die ursächlich an der Ausbildung dieser Form der Resistenz beteiligt sind und dadurch zur Aufklärung der beteiligten Signalwege beigetragen werden.

Unter Verwendung von cDNA-Arrays wurden aus 1536 Genfragmenten 28 Gene identifiziert, die bislang nicht als chemisch induzierbar beschrieben waren. Für fünf dieser Gene wurde die Induzierbarkeit durch *two step* RT-PCRs bestätigt. Es handelt sich dabei um drei Gene mit bislang unbekannter Funktion, ein Gen mit Homologie zu Reticulon-ähnlichen Genen und eine Cysteinprotease. Ihre Beteiligung an der Resistenz der Gerste gegenüber *Bgh* wurde mittels transienten *knock downs* untersucht. Keines der untersuchten Gene scheint als Einzelfaktor für eine erfolgreiche Abwehrreaktion erforderlich zu sein.

Ein sequenzhomologes Gerstengen zu *AtEds5*, welches in Arabidopsis ursächlich an der pathogen-induzierten SA-Produktion und SAR beteiligt ist, wurde ebenfalls in Gerste transient ausgeschaltet, um seine Beteiligung an der Resistenzausprägung zu überprüfen. Außerdem wurde die Funktion von *HvSgt1* während der cIR in Gerste untersucht, da für *Sgt1* in Gerste bereits eine Beteiligung an der R-Gen-vermittelten Resistenz gezeigt werden konnte. Des Weiteren wurden die chemisch induzierbaren Gene *Bci2*, ein blattspezifisches Thionin, *Bci4*, ein *EF-hand* Protein und *Bci9*, eine saure Phosphatase funktionell untersucht. Es standen stabil transgene Pflanzen zur Verfügung, die *Bci4* überexprimieren, während *Bci2* und *Bci9* im transienten Transformationsassay untersucht wurden. Die transienten *knock downs* von *Eds5* und *Sgt1* haben keinen Einfluss auf die Penetrationseffizienz von *Bgh*. Für *Bci4* und *Bci9* konnte kein signifikanter Einfluss auf die Gersten-Mehltau Interaktion nachgewiesen werden, während der transiente *knock down* von *Bci2* in BTH-behandelten Gerstenblättern zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber *Bgh* führt.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich cDNA-Arrays eher zur Expressionsanalyse, d. h. zur Analyse der Veränderungen in der Zelle, die zur metabolischen Adaption an die Induzierte Resistenz führen, aber nicht unbedingt zur Identifizierung ursächlich an der Resistenzausprägung beteiligter Gene in Gerste eignen. Dazu wäre die Analyse von Mutanten, wie in *A. thaliana* seit mehreren Jahren praktiziert, besser geeignet. Allerdings ist die Generierung von T-DNA-Insertionslinien in großem Maßstab in Gerste erst in den Anfängen.

---

## 6 Summary

The application of chemical resistance inducers leads in susceptible barley lines to higher resistance against the infection with the barley powdery mildew fungus (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Bgh*). Since the signal transduction pathways of the chemical induced resistance (cIR) in monocotyledonous plants are poorly understood, the aim of this work was to identify genes that are causally related to this kind of resistance.

Using cDNA-arrays with 1536 gene fragments 28 new genes were identified, that were not described before to be chemical inducible. Five of them could be verified to be chemical inducible using the method of two-step RT-PCR. The functions of three of these genes have until now not been described, one shares homology with reticulon-like genes and one is a cysteine protease. The function of the five genes according the resistance of barley against *Bgh* was tested using a transient transformation system for silencing the gene expression. None of the tested genes as a single factor seems to have an influence on the pathogen response.

A barley gene that shows highest homology to *AtEds5*, which causally involved in SA-production and SAR, was also transiently knocked down to check its involvement in resistance against *Bgh*. *HvSgt1* was also tested using transient knock down, because it is involved in the *R*-gene mediated resistance in barley. Additionally the function of *Bci2*, a leaf-specific thionin, *Bci4*, an EF-hand protein and *Bci9*, an acid phosphatase were checked. *Bci4* overexpressing cereal plants were available, while *Bci2* and *Bci9* were checked in transient transformation assays. Transient knock downs of the *Eds5*-homologue and *HvSgt1* have no effect on penetration efficiency of *Bgh*. Overexpression of the three *Bci*-genes has also no effect on the resistance against *Bgh*. Just the transient knock down of *Bci2* in BTH-treated barley leaves lead to higher susceptibility against *Bgh*.

cDNA-arrays are a good tool for expression analysis in barley, e. g. for the changes concerning metabolic adaptation to the induced resistance, but they are not suitable for the identification of genes that are causally related to resistance in barley. A mutant screen as it is done in *A. thaliana* for many years would more appropriate. But the construction of mutant libraries in barley is still on the way.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E. C., Hausler, A., Moreman, K., Hirschberg, C. B. und Robbins, P. W.** (1993) Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **122**, 307-323
- Agrios, G.N.** (1997). Plant Pathology. 4th edition *Academic Press*, San Diego, USA.
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. und Ecker, J. R.** (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* **284**, 2148-2152
- Altpeter, F. und Xu, J.** (2000) Rapid production of transgenic turfgrass (*Festuca rubra* L.) plants. *J. Plant Physiol.* **157**, 441-448
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., 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
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gómez-Gómez, L., Boller, T., Ausubel, F. und Sheen, J.** (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983
- Austin, M. J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B. J., Jones, J. D. G. und Parker, J. E.** (2002) Regulatory Role of *SGT1* in Early *R*-Gene-Mediated Plant Defenses. *Science* **295**, 2077-2080
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K.** (1999) Short protocols in molecular biology. Fourth edition, *John Wiley & Sons, Inc.*
- Azevedo, C., Sadanadom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K. und Schulze-Lefert, P.** (2002) The RAR1 Interactor SGT1, an Essential Component of *R*-Gene-Trigged Disease Resistance. *Science* **295**, 2073-2076
- Baier, M. und Dietz, K. J.** (1996) Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Mol. Biol.* **31**(3), 553-564
- Bariola, P. A., Retelska, D., Stasiak, A., Kammerer, R. A., Fleming, A., Hijri, M., Frank, S. und Farmer E. E.** (2004) Remorins form a novel family of coiled coil-forming oligomeric and filamentous proteins associated with apical, vascular and embryonic tissues in plants. *Plant Mol. Biol.* **55**, 579-594

- Beckhove, U., Kogel, K.-H. und Schmelzer, E.** (1996): Acquired resistance in barley: Early accumulation of the potentiometric dye DiOC<sub>6</sub> in cytoplasmic aggregations beneath the primary germ tube of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* in barley coleoptiles induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. 11th International Symposium. Herausgeber: Lyr, H., Intercept Andover, 475-491
- Beckhove, U., Scheer, C. und Korell, M.** (2000) Die Wirkung verschiedener Fungizide auf Getreide-Mehltau. *Agroreport Getreide 2000*, Novartis Agro GmbH
- Bentley, D.** (2002) The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 336–342
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. und Hannon, G. J.** (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366
- Berry, M.D. und Boulton, A. A.** (2000) Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Apoptosis. *J. Neurosci. Res.* **60**, 150–154
- Beßer, K.** (2001) Chemisch Induzierte Resistenz im Pathosystem Gerste – Echter Gerstenmehltau: Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter Gene der Gerste. *Dissertation, JLU Gießen*
- Beßer, K., Jarosch, B., Langen, G. und Kogel, K.-H.** (2000) Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Mol. Plant Pathol.* **1**(5), 277-286
- Bohlmann, H. und Apel, K.** (1991) Thionins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 227-240
- Bohlmann, H., Clausen, S., Behnke, S., Giese, H., Hiller, C., Reimann-Philipp, U., Schrader, G., Barkholt, V. und Apel, K.** (1988) Leaf-specific thionins of barley - a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. *EMBO Journal* **7**(6), 1559-1565
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. und Sorokin, A.** (2001) The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**, 731–753
- Bowling, S. A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A. S. und Dong, X.** (1994) A mutation in Arabidopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1845–1857
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. und Jones, R. L.** (2002) Biochemistry and molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, USA
- Budar, F., Thia-Toong, L., Van Montagu, M. und Hernalsteens, J.-P.** (1986) Agrobacterium-mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T-DNA as a single mendelian factor. *Genetics* **114**, 303-313

- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S. und Dong, X.** (1997). The Arabidopsis *NPRI* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**, 57–63.
- Carver, T. L. W. und Bushnell, W. R.** (1983) The probable role of primary germ tubes in water uptake before infection by *Erysiphe graminis*. *Physiol Plant Pathol.* **23**, 229-240
- Chae, H. Z., Chung, S. J. und Rhee, S. G.** (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol.Chem.* **269**, 27670-27678
- Chandra-Shekara, A. C., Navarre, D., Kachroo, A., Kang, H.-G., Klessig, D. und Kachroo, P.** (2004) Signaling requirements and role of salicylic acid in *HRT*- and *rrt*-mediated resistance to turnip crinkle virus in Arabidopsis *Plant J.* **40**, 647–659
- Close, T. J., Wanamaker, S. I., Caldo, R. A., Turner, S. M., Ashlock, D. A., Dickerson, J. A., Wing, R. A., Muehlbauer, G. J., Kleinhofs, A. und Wise, R. P.** (2004) A new resource for cereal genomics: 22K Barley GeneChip comes of age. *Plant Phys.* **134**, 960–968
- Collinge, D. B., Gregersen, P. L. und Thordal-Christensen, H.** (2002) The nature and role of defence response genes in cereals. In Eds. *Bélanger, R. R., Bushnell, W. R., Dik, A. J. und Carver, T. L. W. The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise; APS press, St. Paul, Minnesota, USA*, Kapitel 10: 146-160
- Collins, N. C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J.-L., Ralph Hüchelhoven, R., Mónica Stein, M., Freialdenhoven, A. Shauna C. Somerville, S. C. und Schulze-Lefert, P.** (2003) SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* **425**, 973-977
- Collins, N. C., Sadanandom, A. und Schulze-Lefert, P.** (2002) Genes and molecular mechanisms controlling powdery mildew resistance in barley. In Eds. *Bélanger, R. R., Bushnell, W. R., Dik, A. J. und Carver, T. L. W. The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise; APS press, St. Paul, Minnesota, USA*, Kapitel 9: 134-145
- Conway, G. und Toenniessen, G.** (1999) Feeding the world in the twenty-first century. *Nature* **402**, C55-C58
- Cutler, S. R., Ehrhardt, D. W., Griffiths, J. S. und Somerville, C. R.** (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3718-3723
- Dangl, J. L. und Jones, J. D. G.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833
- Day, R. B., McAlvin, C. B., Loh, J. T., Denny, R. L., Wood, T. C., Young, N. D. und Stacey, G.** (2000) Differential expression of two soybean apyrases, one of which is an early nodulin. *Mol Plant Microbe Interact.* **10**, 1053-1070

- Delaney, T., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. und Ryals, J.** (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**, 1247-1250
- Delaney, T., Friedrich, L. und Ryals, J.** (1995). Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6602-6606
- Delp, G., Timonen, S., Rosewarne, G. M., Barker, S. J. und Smith, S.** (2003) Differential expression of *Glomus intraradices* genes in external mycelium and mycorrhizal roots of tomato and barley. *Mycol. Res.* **107**, 1083-1093
- del Pozo, J.C., Allona, I., Rubio, V., Leyva, A., de la Pena, A., Aragoncillo, C. and Paz-Ares, J.** (1999) A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J.* **19**(5), 579-589
- Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desvaux, D. und Fobert, P.R.** (2003) The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* **15**, 2181-91
- Di Sano, F., Fazi, B., Citro, G., Lovat, P. E., Cesareni, G. und Piacentini, M.** (2003) Glucosylceramide Synthase and Its Functional Interaction with RTN-1C Regulate Chemotherapeutic-induced Apoptosis in Neuroepithelioma Cells. *Cancer Res.* **63**(14), 3860-3865
- Duff, S. M. G., Sarath, G. and Plaxton, W. C.** (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Plant.* **90**, 791-800
- Durrant, W. E. und Dong, X.** (2004) Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 185-209
- Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D. und Sharp, P. A.** (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 457-467
- Ebrahim-Nesbat, F., Behnke, S., Kleinhofs, A. und Apel, K.** (1989) Cultivar-related differences in the distribution of cell-wall-bound thionins in compatible and incompatible interactions between barley and powdery mildew. *Planta* **179**, 203-210
- Eckert, K., Grabowska, E., Stange, R., Schneider, U., Eschmann, K. und Maurer, H. R.** (1999) Effects of oral bromelain administration on the impaired immunocytotoxicity of mononuclear cells from mammary tumor patients. *Oncol Rep.* **6**, 1191-1199
- Eckey, C. Korell, M., Leib, K., Biedenkopf, D., Jansen, C., Langen, G. und Kogel, K.-H.** (2004) Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Mol. Biol.* **55**, 1-15

- Eckey, C.** (2002) Isolierung und Charakterisierung Pathogen-induzierter Gene der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Markerentwicklung für den *Mlg* Resistenzgenlocus mittels cDNA-AFLP *Dissertation, JLU Gießen*
- Edwards, F. A. und Gibb, A. J.** (1993) ATP-A fast neurotransmitter. *FEBS Lett.* **325**, 86-89
- Ehneß, R. und Roitsch, T.** (1997) Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant J.*, **11**(3), 539-548
- Eichmann, E., Biemelt, S., Schäfer, P., Scholz, U., Jansen, C., Felk, A., Schäfer, W., Langen, G., Sonnwald, U., Kogel, K.-H. und Hückelhoven, R.** (2005) Macroarray expression analysis of barley susceptibility and nonhost resistance to *Blumeria graminis*. *J. Plant Physiol.* doi 10.1016/j.jplph.2005.06.019
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. und Tuschl, T.** (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**, 6877-6888
- Ellis, J., Dodds, P. und Pryor, T.** (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 278-284
- Epple, P., Apel, K. und Bohlmann, H.** (1995) An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* **109**, 813-820
- Eschrich, W.** (1980) Free space invertase, its possible role in phloem unloading. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **93**, 363-378
- Falk, A., Feys, B. J., Frost, L. N., Jones, J. D. G., 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
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. und Boller, T.** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18**, 265-276
- Felton, G. W. und Korth, K. L.** (2000) Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 309-314
- Feussner, I., Hause, B., Vörös, K., Parthier, B. und Wasternack, C.** (1995) Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *Plant Journal* **7**(6), 949-957
- Feys, B. J., Moisan, L. J., Newman, M.-A. und Parker, J. E.** (2001) Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, *EDS1* and *PAD4*. *EMBO J.* **20**, 5400-11

- Feys, B. J. F., Bendetti, C. E., Penfold, C. N. und Turner, J. G.** (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**, 751-759
- Flor, H. H.** (1971) Current status of the gene for gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275-296
- Frandsen, G. I., Mundy, J. und Tzen, J. T. C.** (2001) Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiol. Plant.* **112**, 301-307
- Freialdenhoven, A., Scherag, B., Hollrichter, K., Collinge, D. B., Thordal-Christensen, H. und Schulze-Lefert, P.** (1994) *Nar-1* and *Nar-2*, two loci required for *Mla12*-specified race-specific resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* **6**, 983-994
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. und Ryals, J.** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**, 754-756
- Gausing, K.** (1987) Thionin genes specifically expressed in barley leaves. *Planta* **171**, 241-246
- Geldermann, U. und Kogel, K.-H.** (2002) Nature's Concept. The 'New Agriculture' amidst Ecology, Economy and the Demythologization of the Gene. *J. Agronomy & Crop Science* **188**, 368-375
- Glazebrook, J., Rogers, E. E. und Ausubel, F. M.** (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**, 973-982
- Gómez-Gómez, L. und Boller, T.** (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* **7**, 251-256
- Görlach, J., Raesecke, H. R., Rentsch, D., Regenass, M., Roy, P., Zala, M., Keel, C., Boller, T., Amrhein, N. und Schmid, J.** (1995). Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated, cultured tomato cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3166-3170
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beitner, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.-H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. und Ryals, J.** (1996) Benzo-thiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* **8**, 629-643
- Green, B. R., Pichersky, E. und Kloppstech, K.** (1991) Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 181-186

- Gustavsson, N., Kokke, B. P., Harndahl, U., Silow, M., Bechtold, U., Poghosyan, Z., Murphy, D., Boelens, W. C. und Sundby, C.** (2002) A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein. *Plant J.* **29**(5), 545-553
- Hammond-Kosack, K. E. und Parker, J. E.** (2003) Deciphering plant-pathogen communication; fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 177–183
- Hause, B. zur Nieden, U., Lehmann, J., Wasternack, C. und Parthier, B.** (1994) Intracellular localization of jasmonate-induced proteins in barley leaves. *Botanica acta* **107**, 333-347
- Hause, B., Vörös, K., Kogel, K.-H., Beßer, K. und Wasternack, C.** (1999) A jasmonate-responsive lipoxygenase of barley leaves is induced by plant activators but not by pathogens. *J. Plant Physiol.* **154**, 459-462
- Heath, M. C.** (1991) The Role of Gene-for-Gene Interaction in the Determination of Host Species Specificity. *Phytopathology* **81**, 127-130
- Heath, M. C.** (2000) Nonhost resistance and non-specific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 315-319
- Heitefuss, R.** (2001) Defence reactions of plants to fungal pathogens: Principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. *Naturwissenschaften* **88**, 273-283
- Hildebrand, D. F.** (1989) Lipoxygenases. *Physiol. Plantarum* **76**, 249-253
- Hubert, D. A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K. und Dangl, J. L.** (2003) Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *EMBO J.* **22**, 5679–5689
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. und Kogel, K.-H.** (1999) Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* **119**, 1251-1260
- Hückelhoven, R., Dechert, C. Trujillo, M. und Kogel, K.-H.** (2001) Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* **47**, 739-748
- Jacobson, F. S., Morgan, R. W., Christman, M. F. und Ames, B. N.** (1989) An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. *J. Biol. Chem.* **264**, 1488-1496
- Jansen, C., Korell, M., Eckey, C., Biedenkopf, D. und Kogel, K.-H.** (2005) Identification and transcriptional analysis of powdery mildew-induced barley genes. *Plant Sci.* **168**, 373-380

- Jirage, D., Tootle, T. L., Reuber, T. L., Frost, L. N., Feys, B. J., Parker, J. E., Ausubel, F. M. und Glazebrook, J.** (1999) *Arabidopsis thaliana* *PAD4* encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13583–13588
- Jørgensen, J. H.** (1988) Genetic analysis of barley mutants with modifications of powdery mildew resistance gene *Ml-a12*. *Genome* **30**, 129–132
- Jørgensen, J. H.** (1996) Effect of three suppressors on the expression of powdery mildew resistance genes in barley. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 97–119
- Kenton, P., Mur, L. A. J. und Draper, J.** (1999) A requirement for calcium and protein phosphatase in the jasmonate-induced increase in tobacco leaf acid phosphatase specific activity. *J. Exp. Botany* **50**(337), 1331–1341
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S. und Ryals, J.** (1994) Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Ann. Rev. Plant Pathol.* **32**, 439–459
- Kim, I. H., Kim, K. und Rhee, S.G.** Induction of an antioxidant protein of *Saccharomyces cerevisiae* by O<sub>2</sub>, Fe<sup>3+</sup> or 2-mercaptoethanol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6018–6022
- 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
- Kirankumar, S. M. und Choong-Min, R.** (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* **9**, 97–104
- Kitagawa, K., Skowyra, D., Elledge, S. J., Harper, J. W. und Hieter, P.** (1999) Spt1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell* **4**, 21–33
- Kobayashi, Y., Yamada, M., Kobayashi, I. und Kunoh, H.** (1997). Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants. *Plant Cell Physiol.* **38**, 725–733
- Koga, H., Bushnell, W. R. und Zeyen, R. J.** (1990) Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Can. J. Bot.* **68**, 2344–2352
- Kogel, K.-H., Beckhove, U., Dreschers, J., Münch, S. und Rommé, Y.** (1994) Acquired resistance in barley. *Plant Physiol.* **106**, 1269–1277
- Kogel, K.-H., Ortel, B., Jarosch, B., Atzorn, R., Schiffer, R., Wasternack, C.** (1995) Resistance in barley against powdery mildew (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) is not associated with enhanced levels of endogenous jasmonates. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**, 319–332
- Kogel, K.-H. und Langen, G.** (2005) Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cell. Microbiol.* doi: 10.1111/j.1462-5822-2005.00592.x

- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M. und Kohno, K.** (2004) Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J.* **37**, 370-378
- Kronstad, J. W.** (2003) Castles and cuitlacoche: the first international Ustilago conference. *Fungal Gen. Biol.* **38**, 265–271
- Kumakura, S, Yamashita, M und Tsurufuji, S.** (1988) Effect of bromelain on kaolin-induced inflammation in rats. *Eur J Pharmacol.* **150**, 295-301
- Kunoh, H., Itoh, O., Kohno, M. und Ishizaki, H.** (1979). Are primary germ tubes of conidia unique to *Erysiphe graminis*? *Annal. Phytopathol. Soc. Japan* **45**, 675-682.
- Kunz, W., Schurter, R. und Maetzke, T.** (1997) The chemistry of benzothiadiazole plant activators. *Pesticide Science* **50**, 275–282
- Leah, R., Tommerup, H. Svendsen, I. und Mundy, J.** (1991) Biochemical and Molecular Characterization of Three Barley Seed Proteins with Antifungal Properties. *J. Biol. Chem.* **266**(3), 1564-1573
- Leite, B., Ishida, M. L., Alves, E., Carrer, H., Pascholati, S. F. und Kitajima, E. W.** (2002) Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca<sup>2+</sup> and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**(6), 645-650
- Libbert, E.** (1993) Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. *Gustav Fischer Verlag Jena*, 5. Auflage
- Lim, Y. S., Cha, M. K., Kim, H. K., Uhm, T. B., Park, J. W., Kim, K. und Kim, I. H.** (1993) Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 273-280
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.-W. und Dinesh-Kumar, S. P.** (2002) Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the *N* gene-mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. *Plant Cell* **14**, 1483-1496
- Lohman, K., Gan, S., John, M. und Amasino, R. M.** (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **92**, 322-328
- Mackey, D., Holt, B. F. III, Wügg, A. und Dangl, J. L.** (2002) RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 743–754
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. und Parker, J.** (1997) Brock: Biology of Microorganisms. Eight Edition, *Prentice Hall International, Inc.*
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F. und Raskin, I.** (1990) Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**, 1002-1004

- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangel, J. L. und Dietrich, R. A.** (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.*, **26**, 403-410
- Marcus, A. J. und Safier, L. B.** (1993) Thromboregulation: Multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis, *FASEB J.* **7**, 516-522
- McCarthy, P. L., Hansen, J. L., Zemetra, R. S. und Berger, P. H.** (2001) Rapid Identification of Transformed Wheat Using a Half-Seed PCR Assay. *BioTechniques* **32**, 560-564
- Metzlaff, M.** (2002) RNA-mediated RNA degradation in transgene- and virus-induced gene silencing. *Biol. Chem.* **383**, 1483-1489
- Métraux, J. P., Ahl-Goy, P., Staub, T., Speich, J., Steinemann, A., Ryals, J. und Ward, E.** (1991) Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloro-isonicotinic acid and pathogens. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Vol 1*. Herausgeber: Hennecke, H. und Verma, D. P. S., *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, Niederlande
- Métraux, J.-P.** (2002) Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends Plant Sci.* **7**, 332-334
- Métraux, J.-P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. und Inverardi, B.** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**, 1004-1006
- Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W. und Young, N. D.** (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.*, **20**, 317-332
- Morita, Y., Kodama, S., Mine, T., Kataoka, A. Mizushima, T. und Tsuchiya, T.** (1998) NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1778-1782
- Morris, S. W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C. C., Frederiksen, R. A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S. und Uknes, S.** (1998) Induced resistance response in maize. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 643-658
- Mou, Z., Fan, W. und Dong, X.** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**, 935-944
- Næsted, H., Frandsen, G. I., Jauh, G.-Y., Hernandez-Pinzon, I., Nielsen, H. B., Murphy, D. J., Rogers, J. C. und Mundy, J.** (2000) Caleosins: Ca<sup>2+</sup>-binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Mol. Biol.* **44**, 463-476
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N. und Métraux, J.-P.** (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signalling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell*, **14**, 275-286

- Nielsen, K., Olsen, O. und Oliver, R.** (1999) A transient expression system to assay putative antifungal genes on powdery mildew infected barley leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **54**, 1-12
- Noh, Y.-S. und Amasino, R.** (1997) Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Mol. Biol.* **41**, 181-194
- Normann-Setterblad, C., Vidal, S. und Palva, E. T.** (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 430-438
- Nürnbergger, 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
- Oerke, E.-C., Dehne, H.-W., Schönbeck, F. und Weber, A.** (1994) Crop Production and Crop Protection. *Elsevier*, Amsterdam
- Oertle, T., Klinger, M., Stuermer, C. A. und Schwab, M. E.** (2003) A reticular rhapsody: phylogenetic evolution and nomenclature of the *RTN/Nogo* gene family. *FASEB J.* **17**(10), 1238-1247
- Parker, J. E., Holub, E. B., Frost, L. N., Falk, A., Gunn, N. D. und Daniels, M. J.** (1996) Characterization of *eds1*, a mutation in Arabidopsis suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different *RPP* genes. *Plant Cell* **8**, 2033–2046
- Penninckx I., Eggermont, K., Terras F. R. G., Thomma, B., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Métraux, J. P., Manners, J. M. und Broekaert, W. F.** (1996) Pathogen-induced activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309–2323
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H. B., Lacy, M., Austin, M. J., Parker, J. E., Sharma, S. B., Klessig, D. F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A. B. und Mundy, J.** (2000) Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120
- Pieterse, C. M. J., Ton, J. und van Loon, L. C.** (2001) Cross-talk between plant defence signalling pathways: Boost or burden? *AgBiotechNet* **3**, ABN 068
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J. und van Loon, L. C.** (1998) A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1571–1580
- Pillai, M. A., Lihuang, Z. und Akiyama, T.** (2002) Molecular cloning, characterization, expression and chromosomal location of OsGAPDH, a submergence responsive gene in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* **105**, 34–42
- Reimann-Philipp, U., Behnke, S., Batschauer, A., Schäfer, E. und Apel, K.** (1989) The effect of light on the biosynthesis of leaf-specific thionins in barley, *Hordeum vulgare*. *Eur. J. Biochem.* **182**, 283-289

- Reymond, P., Kunz, B., Paul-Pletzer, K., Grimm, R., Eckerskorn, C. und Farmer, E. E.** (1996) Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. *Plant Cell* **8**, 2265–2276
- Ridley B. L., O'Neill, M. A. und Mohnen, D.** (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929–967
- Ross, A. F.** (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**, 340-358
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Schäfer, P.** (2003) Cytological and Molecular Investigations of Cereal Resistance Mechanisms against the Hemibiotrophic Pathogen *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*). *Dissertation, JLU Gießen*
- Schaffrath, U., Freydl, E. und Dudler, R.** (1997) Evidence for different signaling pathways activated by inducers of acquired resistance in wheat. *MPMI*. **10**(6), 779-783
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C. und Manners, J. M.** (2000) Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by cDNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 11655–11660
- Schlösser, E.** (1997) Allgemeine Phytopathologie. 2. Auflage; *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*
- Scholes, J. D., Lee, P. J., Horton, P. und Lewis, D. H.** (1994) Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol.* **126**, 213–222
- Schultheiß, H.** (2003) Identifizierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse von Determinanten der Suszeptibilität und Resistenz im Pathosystem Gerste/Echter Gerstenmehltaupilz. *Dissertation, JLU Gießen*
- Schultheiss, H., Dechert, C., Király, L. Fodor, J., Michel, K., Kogel, K.-H. und Hückelhoven, R.** (2003) Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science* **165**, 1275–1280
- Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K.-H. und Hückelhoven, R.** (2002) A Small GTP-Binding Host Protein Is Required for Entry of Powdery Mildew Fungus into Epidermal Cells of Barley. *Plant Physiol.* **128**, 1447-1454
- 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-dichlorisonicotinic acid. *Plant Physiol.* **115**, 61-70

- Schweizer, P., Hunziker, W. und Mösinger, E.** (1989) cDNA cloning, *in vitro* transcription and partial sequence analysis of mRNA from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) with induced resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Mol. Biol.* **12**, 643-654
- Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalen, O. und Dudler, R.** (1999) A transient assay system for the functional assessment of defense related genes in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 647-654
- Schweizer, P., Pokorny, J., Schulze-Lefert, P. und Dulder, R.** (2000) Technical advance. Double-stranded RNA interferes with gene function at the single cell level in cereals. *Plant J.* **24**(6), 895-903
- Shaw, P. E. und Saxton, J.** (2003) Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 1210–1226
- Shirasu, K., Lahaye, T., Tan, M. W., Zhou, F. S., Azevedo, C. und Schulze-Lefert, P.** (1999) A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell* **99**, 355-366
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V. K., Dixon, R. A. und Lamb, C.** (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9**, 261–70
- Shirasu, K. und Schulze-Lefert, P.** (2003) Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends Plant Sci.* **8**, 252–258
- Southern, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., van Loon, L. C., Dong, X. und Pieterse, C. M. J.** (2003) NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *Plant Cell* **15**, 760–770
- Steinbiß, H.-H.** (1995) Transgene Pflanzen. *Spektrum Akademischer Verlag*
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. und Mettraux, J. P.** (1997) Systemic acquired resistance. *Ann. Rev. Plant Pathol.* **35**, 235–270
- Ström, A.-C. und Weis, K.** (2001) Protein family review: Importin-like nuclear transport receptors. *Genome Biology* **2**(6) reviews 3008.1–3008.9
- Tagami, S., Eguchi, Y., Kinoshita, M., Takeda, M. und Tsujimoto, Y.** (2000) A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmatic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* **19**(50), 5736-5746
- Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K. und Shirasu, K.** (2003) HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 11777-11782

- Taketani, S., Adachi, Y., Kohno, H., Ikehara, S., Tokunaga, R. und Ishii, T.** (1998) Molecular characterization of a newly identified heme-binding protein induced during differentiation of murine erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 31388–31394
- Thaler, J. S., Owen, B. und Higgins, V. J.** (2004) The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiol.* **135**, 530-538
- Thomas, C., Rajagopal, A., Windsor, B., Dudler, R., Lloyd, A. und Roux, S. J.** (2000) A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance. *Plant Cell* **12**, 519-533
- Thomas, C., Sun, Y., Naus, K., Lloyd, A. und Roux, S.** (1999) Apyrase functions in plant phosphate nutrition and mobilizes phosphate from extracellular ATP. *Plant Physiol.* **119**, 543-551
- Thordal-Christensen, H.** (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 351-357
- Thordal-Christensen, H., Gregersen, P. L. und Collinge, D. B.** (2000) The barley/*Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. In *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Herausgeber: Slusarenko, A., Fraser, R. und van Loon, L. C., *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, Niederlande
- Tsuba, M., Katagiri, C., Takeuchi, Y., Takada, Y. und Yamaoka, N.** (2002) Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **60**, 51-57
- Uknes, S., Winter, A., Delaney, T., Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Potter, S., Ward, E. und Ryals, J.** (1993) Biological induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Mol. PlantMicrobe Interact.* **6**, 692-698
- Vallélian-Bindschedler, L., Métraux, J.-P. und Schweizer, P.** (1998) Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense-gene activation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 702-705
- van de Velde, H. J. K., Roebroek, A. J., Senden, N. H., Ramaekers, F. C. und van de Ven, W. J.** (1994) NSP-encoded reticulons, neuroendocrine proteins of a novel gene family associated with membranes of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **107**, 2403–2416
- van Wees, S. C. M. und Glazebrook, J.** (2002) Loss of non-host resistance of Arabidopsis *NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J.* **33**, 733–742
- van Loon, L. C. und van Kammen A.** (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. ‘Samsun’ and ‘SamsunNN’. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 199–211
- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. und Pieterse, C. M.** (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 453–483

- van Loon, L. C. und 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
- von Rad, U., Mueller, M. J. und Durner, J.** (2005) Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by microarray technology. *New Phytologist* **165**, 191–202
- Vignutelli, A., Wasternack, C., Apel, K. und Bohlmann, H.** (1998) Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant J.* **14**, 285–295
- Vanhorenbeeck, V., Jacquemin, P., Lemaigre, F. P. und Rousseau, G. G.** (2002) OC-3, a novel mammalian member of the ONECUT class of transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **292**, 848–854
- Voegelé, R. T., Stuck, C., Hahn, M. und Mendgen, K.** (2001) The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8133–8138
- Vörös, K., Feussner, I., Kühn, H., Lee, J., Graner, A., Löbner, M., Parthier, B. und Wasternack, C.** (1998) Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv Salome) leaves. *Eur. J. Biochem.* **251**, 36–44
- Weichert, H., Stenzel, I., Berndt, E., Wasternack, C. und Feussner, I.** (1999) Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves - preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS letters* **464** (3), 133-137
- White, R. F.** (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* **99**, 410–412
- Wiese, J., Kranz, T. und Schubert, S.** (2004) Induction of Pathogen Resistance in Barley by Abiotic Stress. *Plant Biology* **6**(5), 529-536
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. und Ausubel, F. M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562–65
- Wright, D. P., Baldwin, B. C., Shephard, M. C. und Scholes, J. D.** (1995) Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew: 1. Alterations in carbohydrate metabolism. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **47**, 237–253
- Xie, D. X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro M., Turner, J. G.** (1998) *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, **280**, 1091-1094
- Zeyen, R. J., Carver, T. L. W. und Lyngkjær, M. F.** (2002) Epidermal cell papillae. In *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. Herausgeber: Belanger, R. R. und Bushnell, W. R., APS Press, St. Paul, USA

- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X. und Dong, X.** (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6523–28
- Zhou, J.-M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J. und Klessig, D. F.** (2000) NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 191–202
- Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P. und Somerville, S.** (2004) Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. *Plant J.* **40**, 633–646
- Zylka, M. J. und Reppert, S. M.** (1999) Discovery of a putative heme-binding protein family (SOUL/HBP) by two-tissue suppression subtractive hybridization and database searches. *Mol. Brain Res.* **74**, 175–181

## 8 Anhang

**Tab. 8.1: Liste der verwendeten Oligonukleotide**

Primer	Sequenz (5'-3')	Hybridisierungstemperatur
5'GAN001A04 3'GAN001A04	tac cta cgg cat ggg gta ac gag caa gga ttg agc aat gg	60 °C 60 °C
5'GAN001A10 3'GAN001A10	ggc agg gtc aac gag ata tg cca tac atc gca aaa cag ca	60 °C 60 °C
5'GAN001K12 3'GAN001K12new	ttt tgg cta agg gtt gat gg gta tgc cgc aga atc gga ag	60 °C 60 °C
5'GAN001B19_bci6 3'GAN001B19_bci6	tga cat gaa gga gtt aca aag ca ctt cac cat cca cag gga tt	60 °C 60 °C
5'GAN001B19_II 3'GAN001B19_II	cgt gca ggt ctt ttc ttc ct cga aga tgc cga aca aca t	60 °C 60 °C
5'GAN001E14 3'GAN001E14	ggc tcc gct atc tca gtt gg act gga gct gga gca aat gt	60 °C 60 °C
5'GAN001L11 3'GAN001L11	cgt ttt tgc cta agg gtt ga gct tct ggg tct tct gca tc	60 °C 60 °C
5'GAN002B02 3'GAN002B02	agc aaa gga ggg agg aga ac ctg tcg aga agg tgg gag tg	60 °C 60 °C
5'GAN003A19_new 3'GAN003A19	cat tgt ttg tca gaa cag cac a ttt tgt aca act caa cgg ata tca t	60 °C 60 °C
5'GAN003E18 3'GAN003E18	gct cag cag cct tac gtg tt tgt tcc aat ggg act gtg aa	60 °C 60 °C
5'GAN003J15 3'GAN003J15	gcc gtc acg gtt gta ggt ta cgt gct ggc caa tat tac aa	60 °C 60 °C
5'GAN003M18 3'GAN003M18	cac aac cga aca cct gtc ct gat ggt cga ggc aaa gaa ag	60 °C 60 °C
5'GAN004K21 3'GAN004K21	tgt acg atg gca att caa cac cat cca ctg cta cgg atg aa	60 °C 60 °C
5'HvD00195 3'HvD00195	cac tct ggc gga cta caa ca tgg aga caa gtt tag ggc tca	60 °C 60 °C
5BCI2 3BCI2	att aag gcc aac cag cca ac aga aat cat gcc caa gaa gg	60 °C 58 °C
BamBci2 PaeIIBci2	gga tcc att aag gcc aac cag cca ac gca tgc aga aat cat gcc caa gaa gg	52 °C 52 °C
HvEDS5_5' HvEDS5_3'	gtg cac tgt ttg ggg tga g gag atc (ct)ct tcc agc ca(ag) ta	56 °C 56 °C
HvRBCs HvRBCas	ccc tgt ctt acc ttc cac ca gcg tgc aaa gat gtt tct cat	56 °C 56 °C
HvU-left HvU-right	ggg act gcc cgt tct ggt a ggc ctt ccg aat ctt gac cg	60 °C 60 °C
inv.BCI9 5'	tgg aga tgc cct tac tgc gcg a	54 °C

---

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Hybridisierungstemp- peratur</b>
M13fw(-40)	gtt ttc cca gtc acg ac	58,0 °C
M13rev	aac agc tat gac cat ga	56,0 °C
5'BamRTNLB	gga tcc gca cac ttc cac cac aca ca	54 °C
3'PstRTNLBnew	ctg cag aca agc aac ttg cgg cag ta	51 °C

Tabelle 8.2: Expressionsdaten der *Macroarray*-Analysen

info	1. biolog.	1. tech.	2. biolog.	2. tech.
GAN001A04	30,68	1,80	0,39	2,63
GAN001A10	5,20	0,19	0,61	3,98
GAN001A24	5,93	0,38	0,48	5,10
GAN001B19	66,31	4,85	2,58	10,94
GAN001B20	6,84	0,44	0,49	2,65
GAN001D07	4,98	3,44	1,05	3,72
GAN001D12	51,04	3,86	1,02	3,68
GAN001E14	11,55	2,22	0,83	2,65
GAN001E20	2,27	1,79	0,76	1,87
GAN001F11	1,09	3,06	0,03	0,40
GAN001F12	43,29	10,89	0,20	1,47
GAN001F21	10,01	3,73	0,58	1,89
GAN001G20	2,25	1,87	1,46	5,37
GAN001G22	1,36	1,13	15,86	296,17
GAN001H20	52,57	18,78	17,27	33,18
GAN001J09	2,93	3,40	1,82	6,54
GAN001K12	1,61	3,29	0,96	6,06
GAN001K15	3,36	1,90	0,00	1,74
GAN001L11	44,88	2,28	0,64	2,87
GAN001L21	0,89	6,24	0,68	2,94
GAN001M04	6,32	7,15	1,15	14,11
GAN001M22	18,57	2,18	0,88	1,00
GAN001N20	3,60	64,01	0,55	1,42
GAN001O16	7,00	16,44	2,65	11,78
GAN001O18	0,68	2,14	0,74	1,25
GAN001P03	0,65	153,41	0,20	5,90
GAN002B01	7,91	0,68	0,17	3,87
GAN002B02	4,31	0,39	0,57	13,06
GAN002C11	199,38	10,57	0,68	2,79
GAN002C16	2,46	0,62	0,61	1,52

info	1. biolog.	1. tech.	2. biolog.	2. tech.
GAN002D07	4,25	2,24	0,46	2,14
GAN002E03	8,17	6,93	1,09	2,07
GAN002E16	1433,00	89,41	213,40	312,10
GAN002G10	1,44	1,69	0,24	2,90
GAN002G16	4,82	3,82	0,40	1,63
GAN002I09	23,50	10,96	249,50	717,70
GAN002K15	2,03	2,13	0,02	1,29
GAN002K21	0,58	1,31	1,45	2,82
GAN002K24	2,35	3,30	0,84	2,34
GAN002L09	14,80	6,90	0,01	1,50
GAN002L22	0,48	4,49	0,76	0,90
GAN002M10	3,53	4,48	0,42	1,38
GAN002O03	0,58	3,38	0,20	0,81
GAN002P08	142,20	62,72	2,96	83,86
GAN003A19	9,01	0,72	2,48	21,88
GAN003B09	7,99	1,47	0,72	2,78
GAN003B13	42,17	5,76	5,78	22,89
GAN003B20	0,60	1,03	0,84	3,82
GAN003C03	40,77	4,20	0,69	5,42
GAN003C04	19,32	2,64	0,70	4,26
GAN003C09	117,35	29,89	34,77	72,58
GAN003D20	29,50	8,48	5,99	10,98
GAN003E17	1,65	1,27	1,75	151,58
GAN003E18	1,51	1,05	0,73	11,50
GAN003F10	1,40	19,60	0,05	5,60
GAN003F17	1,55	1,30	1,27	246,02
GAN003F18	1,11	1,19	0,72	4,42
GAN003G19	0,81	2,46	95,02	2,83
GAN003H02	209,50	101,88	39,24	59,77
GAN003H10	2609,00	159,70	112,30	455,20

Adresse	1. biolog.	1. tech.	2. biolog.	2. tech.
GAN003H11	1,06	1,41	0,72	2,68
GAN003J15	179200,00	5075,00	2018,00	195400,00
GAN003J22	0,83	1,30	1,00	1,83
GAN003K16	0,46	1,42	0,29	4,24
GAN003L07	1,39	1,29	1,50	9,03
GAN003L11	0,60	1,04	0,49	1,02
GAN003L15	0,49	1,29	0,37	3,04
GAN003L21	1,76	4,58	2,16	15,20
GAN003M16	3,73	1,03	1,67	0,17
GAN003M18	3,20	8,79	0,94	3,96
GAN003N15	0,07	1,66	0,06	16,85
GAN003N16	0,35	1,46	0,19	2,60
GAN003N17	1,87	5,99	0,72	4,03
GAN003P02	1,21	5,59	0,44	1,17
GAN003P09	1,36	3,74	0,44	1,24
GAN003P23	0,39	12,39	0,29	0,14
GAN004A14	17,36	0,15	0,08	9,88
GAN004A20	30,77	0,17	0,32	7,70
Hv0366GL	419,42	23,60	0,48	1,62
Hv456GL	176784,85	178240,00	432524,27	439300,00
GAN004B07	176272,04	10240,96	2071,99	103900,00
GAN004B11	421,04	2,10	0,03	7,09
GAN004B23	24,73	1,64	0,46	1,17
GAN004C05	10910,78	334,77	996,90	2267,00
GAN004C15	2,98	0,63	0,75	2,12
GAN004D01	22725,38	14237,63	118,89	278,32
Hv462GL	85,96	34,90	16,59	15,08
HvD0125	4294,49	139,50	0,39	5,23
GAN004D19	0,47	1,04	1,00	1,05
HvD0122	3,15	0,85	1,08	3,61

Adresse	1. biolog.	1. tech.	2. biolog.	2. tech.
GAN004E10	9,45	3,80	23,88	108,54
GAN004F05	115,18	36,52	66,02	167,16
HvD0126	6,68	1,40	1,60	4,95
Hv196rh	0,80	0,47	0,11	10,08
HvD0195	30,22	5,31	1,25	4,07
GAN004G04	3,33	2,46	0,29	0,92
GAN004H11	2,04	2,24	1,55	8,23
Hv53MK	37,47	4,35	0,48	1,21
GAN004H19	2,20	2,39	0,91	2,52
GAN004H15	0,94	1,79	0,56	1,40
GAN004J01	30010,00	6308,42	20,83	54,17
GAN004J06	1062,44	2,29	0,58	1,21
GAN004J15	1,18	2,43	0,76	2,50
GAN004J17	1,04	1,86	0,53	1,69
GAN004K21	0,85	2,98	0,97	9,95
GAN004K22	1,56	3,03	1,86	8,26
GAN004K24	396,40	58,24	9,47	30,15
GAN004L17	0,64	1,09	0,72	1,54
GAN004M17	0,65	2,65	0,16	3,14
GAN004M18	0,27	2,16	0,29	3,41
GAN004N03	0,18	14,17	0,23	1,82
Hv0005EX	3,43	14,13	0,28	1,16
GAN004N16	21,04	4,88	0,60	0,93
GAN004P06	0,72	0,93	0,01	1,40
GAN004P16	0,52	1,62	0,87	1,03
GAN004P17	0,67	3,15	0,51	1,43

**Tabelle 8.3: Auftragsschema der Dotblots.**

Die PCR-Produkte der angegebenen Gene wurden im Mikrotiterplattenformat mit Hilfe einer speziellen Apparatur auf Nylonmembranen aufgebracht. Die Spalten 7-12 enthalten eine Wiederholung der hier aufgeführten Spalten 1-6

spot	Replikat	Spot auf <i>Macroarray</i>	spot	Replikat	Spot auf <i>Macroarray</i>
A-01:1	A-07:1	GAN001A04	E-04:1	E-10:1	GAN003B09
A-02:1	A-08:1	GAN001F12	E-05:1	E-11:1	GAN003L21
A-03:1	A-09:1	GAN001M04	E-06:1	E-12:1	Hv0366GL
A-04:1	A-10:1	GAN002I09	F-01:1	F-07:1	GAN001D07
A-05:1	A-11:1	GAN003E18	F-02:1	F-08:1	GAN001K12
A-06:1	A-12:1	GAN005K21	F-03:1	F-09:1	GAN002C11
B-01:1	B-07:1	GAN001A10	F-04:1	F-10:1	GAN003C03
B-02:1	B-08:1	GAN001F21	F-05:1	F-11:1	GAN003M18
B-03:1	B-09:1	GAN001N20	F-06:1	F-12:1	Hv196rh
B-04:1	B-10:1	GAN001L09	G-01:1	G-07:1	GAN001D12
B-05:1	B-11:1	GAN003F10	G-02:1	G-08:1	GAN001L11
B-06:1	B-12:1	GAN004K22	G-03:1	G-09:1	GAN002E03
C-01:1	C-07:1	GAN001A24	G-04:1	G-10:1	GAN003C04
C-02:1	C-08:1	GAN001G22	G-05:1	G-11:1	GAN003N17
C-03:1	C-09:1	GAN001O16	G-06:1	G-12:1	Hv0005EX
C-04:1	C-10:1	GAN002M10	H-01:1	H-07:1	GAN001E14
C-05:1	C-11:1	GAN003G19	H-02:1	H-08:1	GAN001L21
C-06:1	C-12:1	GAN004K24	H-03:1	H-09:1	GAN002G16
D-01:1	D-07:1	GAN001B19	H-04:1	H-10:1	GAN003E17
D-02:1	D-08:1	GAN001H20	H-05:1	H-11:1	GAN004E10
D-03:1	D-09:1	GAN001P03	H-06:1	H-12:1	Hv53MK
D-04:1	D-10:1	GAN003A19	A-01:2	A-02:2	HvD00126
D-05:1	D-11:1	GAN003J15	B-01:2	B-02:2	HvD00125
D-06:1	D-12:1	GAN004M17	C-01:2	C-02:2	HvD00122
E-01:1	E-07:1	GAN001B20	D-01:2	D-02:2	HvD00195
E-02:1	E-08:1	GAN001J09	E-01:2	E-02:2	Hv0456GL
E-03:1	E-09:1	GAN002B02	F-01:2	F-02:2	Hv0462GL

1	1	2	3	4	5	6
A	GAN001A04	GAN001F12	GAN001M04	GAN002I09	GAN003E18	GAN004K21
B	GAN001A10	GAN001F21	GAN001N20	GAN002L09	GAN003F10	GAN004K22
C	GAN001A24	GAN001G22	GAN001O16	GAN002M10	GAN003G19	GAN004K24
D	GAN001B19	GAN001H20	GAN001P03	GAN003A19	GAN003J15	GAN004M17
E	GAN001B20	GAN001J09	GAN002B02	GAN003B09	GAN003L21	Hv0366GL
F	GAN001D07	GAN001K12	GAN002C11	GAN003C03	GAN003M18	Hv196rh
G	GAN001D12	GAN001L11	GAN002E03	GAN003C04	GAN003N17	Hv0005EX
H	GAN001E14	GAN001L21	GAN002G16	GAN003E17	GAN004E10	Hv53MK

2	1
A	HvD00126
B	HvD00125
C	HvD00122
D	HvD00195
E	Hv456GL
F	Hv462GL

**Tabelle 6.4: Sequenzen der differentiellen Klone der Macroarrays.**

Die Sequenzen der verschiedenen Klone wurden gegen die angegebenen Datenbanken geblastet. Angegeben ist jeweils das Gen mit der höchsten Homologie und der *e-value*. Klone mit Homologien zu mehreren Genen enthalten mehr als ein Insert.

<p><b>&gt;GAN001A04*</b>                      KGGGGGtCAR TaTTTTACAC AGCACAGAAA ATATGTACAT TGAAAGGGGC AAATATCCAT                      CAGCRACCTCA TCAAAACTCT GCCGGCTGGT TAACATCTAC CTACGGCATG GGGtAACCTA                      TCTAATCCGA AAGGRCTCC TCCAGCTCAG GaTCATCTGG tCTCACCAAT GCATCATCCT                      CCACTTCCGT GTCAACTATC TCCTCTTTCT CTTGCTAGT GTCATCTTCT TTCTCCGCGC                      TATTGCSATC TTCTTCCGCA CTGGATCCGT CTAACCTTTC GTTGGTATGA TTAGCAACTG                      TGGGCTCGGC AATGGCTTTC CCTCCCTGGG TGCCATTGCT CAATCCTTGC TCGCTTCGAG                      GGTTAGGTTT GGTCAGTGTT TTA</p>	
<p>&gt;barley BQ461808<sup>1</sup>                      weakly similar to PIR C86863 C868 N-acetylmuramoyl-L-alanine                      amidase (EC 3.5.1.28) - Lactococcus lactis subsp. lactis</p>	<p>TIGR                      2.6e-77</p>
<p><b>&gt;GAN001A10*</b>                      KGTGGCGCAG tacAACTCGC CCTTCGAGTT CAGCGGCAGG GTCAACGAGA TATGGATGct                      CTTTCGACACC ATGGGCGCGT CGTCTGASAT GTAACGTGCA AGCKaGCCGC TGGCTAGATC                      AATCAGTCAA CTCGTATATa AGAGTATCTT GTCCTTTAAG CTTATGTAAG CGGACGAATA                      ATGGTAGCTT ATAAAAaACT TGAGCGAaAT AGTGTGCTGT TTTGCGATGT ATGGRCTTGA                      GAGCaATAAA RaGTGCCTCT tTTTTTTAR</p>	
<p>&gt;barley TC124908                      similar to GP 21592576 Gb AAM64525.1  AY086962                      SOUL-like protein - Arabidopsis thaliana</p>	<p>TIGR                      4.4e-53</p>

<b>&gt;GAN001A24*</b>						
GCTCKAtcDG	cCGCTATCAA	CGAGGcCcTT	AGAATTGATT	AATGGCAGTT	AATGTACATG	
TGACAACAAA	TCAATGATTT	TtCATTCACC	TCACTTCACC	AAATTACAAT	GTGGGTTGCA	
CAGTACATGT	CTAAcACAAA	AaAGATTATG	GGACTTAAAGA	aTCACTTGAA	AGACGCAACT	
TCGTCACTGA	aACGTGCAAT	GACGTCAGCV	ATGCTCTCTG	TGGATAGGTC	TGTCTTGTCT	
CTTACCCTCA	GGaCGACCTT	TCCAGACTCT	GCCA			
<hr/>						
<b>&gt;gi 32128960 Gb BT009409.1 </b>						BlastN
Triticum aestivum clone wlm96.pk060.113						4,0e-61
<hr/>						
<b>&gt;gi 50943671 ref XP_481363.1 </b>						BlastX
putative threonyl-tRNA synthetase [Oryza sativa (japonica cultivar-Group)]						7,0e-04
<hr/>						
<b>&gt;GAN001B19*</b>						
tATAAAKGaT	tTTTTTATTA	ACCCATAaTa	aTAtGAcATG	aaGGaGtAc	AAAGCATATA	
TaAcGaGCAT	ACACCcWtCt	CTTGTCATTG	ANCTTTTTTAC	TAKYACATAT	aARTKGTGcW	
ttTtTccaaT	TTWATTAcTC	AACACaTGCC	CAYRATTTTa	TTGGWTGGRT	GaYCCTCCAT	
TACATTGACA	TGAcGGCcGG	RCGATATGAG	CKAGCKAGCG	AGCGTGGTGG	GGAAKCAGCT	
GTCGTKcWCG	cAGCTGAKCA	CGTCGcKGTA	ATCCCTGTGG	ATGGtGAAGG	aGTcGTAGMC	
TTGCCGTGCG	AGCGGCCCGCT	GWGGCAAKGG	CGCACTCCKK	YAACCATKcC	ACCCCTCATK	
CAcCCaGGGA	TGAYcCGTTG	WTYYATYGCT	CCATACGTGc	AGGTCTTTTC	TTCTcCWAA	
CACACATCTa	AGTGTGcATc	TTTATcAAAa	aaATcTAAGC	GTGCATCCTT	GTGTAACCTG	
TGTaAaRVVV	TGCTYGTWTA	TtATGAGWTG	GRGGGcGTaG	ATTAGaATaA	TACATGTTGT	
TCGGCaTCTT	cGCGGTGGCC	CTAYaTKCRG	GTWICTGTAC	AATACAGTGT	AACACACAAG	
TACCACCTTG	TGTAATGTTA	TTGGRAATGT	acTTAAaacT	TTGAAGTTGT	TACGAWCtGT	
GARcRGcCG	cAGTGTGWTG	GrtaTYtGcR	GAWTTcaGGS	cTGAaTTCaG	YacAYTGGcG	
GCGTtAmaAG	TGGDBCGRGY	YcGtACcAGC	tTGT			
<hr/>						
<b>&gt;gi 6900311 emb AJ250662.1 HVU250662</b>						BlastN
Hordeum vulgare partial mRNA for putative protein (bci-6 gene)						e-117
<hr/>						
<b>&gt;barley BE420578</b>						TIGR
						4.9e-56
<hr/>						
<b>&gt;GAN001B20*</b>						
GGGAATtCGA	TTAAcACCAT	TACTTGGTTG	CGTAATACAA	GAGCKGCACG	GGCAttACCG	
TTCGAtGACA	ATATCAACTT	CCATAAGACT	ATTGCGGCGG	CAATTGTGGT	CGGTGTTATC	
CTTCATGCAG	GAAACCATCT	TGCATGTGAT	TtTcCACGGC	TTATAGATTc	CTCCGAtCAG	
ATGTATGctC	CACTGGGCAA	GtAcTTcGGG	GAAACTAAGC	CAACATATTT	GGcGTTAGTC	
AAAGGAGTAG	AAGGTGTAAC	TGGAGTKATT	ATGGTTGTcT	GCaTGctCAT	TGCTTTTACT	
CTAGCAACCA	GGTGGTTCCG	TCGTAGCCTG	GTGAAGCTTC	CaaAGCSATT	TGASAAGctA	
ACTGGCTTCA	ATGCcTTctG	AaTCACTAGT	GAATTC			
<hr/>						
<b>barley AJ465940</b>						TIGR
						1.3e-16
<hr/>						
<b>&gt;GAN001D07_a*</b>						
TCAAATCAAT	CGctTCTtTT	GTATAGCATG	AATaAGGKCA	AATGctTGAR	TGTSTATKTG	
TSTGGRTGGc	ATGGRGCTA	GAAGTGGCAT	GgaGCCTGGa	CGCTGCTCCT	AGTGAaACTG	
GCATGGRGCC	TGGRAGTaAA	CCGTGCTAAC	TTAAAGTGAA	ATTGTAGAGC	tAGTGCCCAT	
TTGGCCAGGC	ATATTCGTCC	TTTTGGaGGT	GAAACACTGG	AGTtCTGAAT	TGCCCTCGTC	
CATATTTCTT	GTTCTCGTCC	TGTAAGAtTT	GTTGGATTcC	aATATTAATA	CACTATACAT	
GTAGTTATTT	GTTGGATTTC	TCTACAATTG	TRAACAGTTT	TAAATATcAC	TTTTTRAKGCC	
TCA						
<hr/>						
<b>barley TC132046</b>						TIGR
weakly similar to UP ABCX_CYAPA (P48255) Probable ATP-dependent transporter ycf16, partial (84%)						4.7e-75

<b>&gt;GAN001DO7_b*</b>	
cAGASAVGVC GCVCGAGTMT cAHcAAGHCA YCCTTATCCC GGGtCCTTGG KCAaAADAAT CGASCTMGCT CAGCVGTCTG AtCGCYACCT TTGARCTTAT GGRCGAGGAA CACCACAGAA GTTTATGTCT AGtTCTTTTT AAGCTTGAGC CCGCAAGTGA TCTAGTCTAG AACCAGTCAT TTGGGATGAC ATAGTGCAGT ACGGGTTTTAA TAAAGTTATG GtAGCKATCT TGTGCCGTTT GAKAAGAKAT ACKAGKATAT KCCATCcGTT CATATGGaTG TATGATGAAC AcCACACGTc CA	
>keine Homologie	
<b>&gt;GAN001D12*</b>	
CAGGACARGG tGGATcACTT CGCCGGARAG GCTCATACCG AGGCGTGCAA GcACTACGAG GKGCTGGACC AGAAGGtTTT GAGCaAGAKA CCGCGAGGGC CGGCgAAAAAC CAAGAAGACC TAGAATGCTG GCCGTcCGT GCGKGGRTGC TGCTCGGTGT TTGTGGTTCC GTGATCCATG TGCgTAGTGC CACTAGACAG TTCGGTTCCC CGATCCATAT GGGTAATGCC ACCAGACAGT TACTCAACCT ACTCGGTGTT ACCTTGTGCT CCGCATGTAT TAGCTATTTG TATATGCaAC TCTGAaAACT TGGAActGCT ACCTTTCTAC TGCCGCAGTT GCTTGTAGAT ACTTGcCAG CGGCCGCTAC AGATCCTTAT TTTCAAGATG GATTACATAC GTAGACCTAT AGTAGCGCAT GCRACATACG TAGGCACAGT ACACGTGCTG GCCAATATTA CAACTTTGA CAAATTaAAA TGGATGGaTC TG	
barley TC147119	TIGR
GB AAP47485.1 32331915 AY164911 RTNLB20 {Hordeum vulgare;}, complete	3.1e-74
barley TC148309	TIGR
weakly similar to (Q39986) Cysteine proteinase, partial (35%)	1.6e-22
<b>&gt;GAN001E14*</b>	
TATCCGTGAS ACAAAAATCA CAGCTTTCTG AAGGRTCTGA AGTCATATTC ACCGACGATG TTTGTCTGCa AGTtTTTATT GAACACTTGC AGGAATTGGC TGTTcAGGGT TAGCGACCTG TGGACCTGGC CATGGTTCCG CtATCTCAGT TGGGCCcATC TCAGATCCTG AAGATACGGc TTTCTGATAG ATcGAATGTc ATATKcACTG GTGTTGTTTTA CTTGCaAGTT TTATTGAACA CTTGcAGTAA CTGGcTGTAG AGGATGAGTG AGTCCATGTG GaATTAATTA CATGTTATCC tTGGcCGTAT GTTATCTTGA AAATATTKCc AGAGCTCTAC TGcCTGGRGG AATGAGATCT CCYTTATTTG TACATTTGCT CCAGCTCCAG TTTGATGTAA GccAGTtACC YCcYTATTTT TGTATAGACT GatGKtATTR AKSTTTACCA	
gi 51964251 ref XM_506911.1	BlastN
PREDICTED Oryza sativa (japonica cultivar-group), OJ1365_D05.6 mRNA	1e-44
<b>&gt;GAN001F12*</b>	
TGGGCGTGAA GGCAACCCTG GACGACTATG AGATGAAGGT CAGGTCCCCTG GGAGACAAGG AGTTCAGTCC AGTGTACCCT CTCATGTGTC AGATTGGATC TGCATTATCA CGGCTACACC TTGACATGTA TTCAGTTCAG CTGTGCAGCG TATATTTGTA TCACCATCCT GTAGGCATTG TTCTTGAGAG ATCACTTGAG CCCCCGACAT AGATTTTATA CTCATGGAAT AGCATCAATG TTTCTTTTTT ATCACAAAAA TGTTGAAAGT ACAGAGCTTG TGTTTCTGGT AGCTATTGTC ATGTTCTGAA TTCTGATATG TTTGATCATT GTACATCGCT GA	
>barley TC91710	TIGR
similar to SP Q9UP83 COG5_HUMAN Conserved oligomeric golgi complex subunit 5 (13S golgi transport complex 90 kDa subunit) - Homo sapiens	1.6e-51

<b>&gt;GAN001F21*</b>						
TCTAGaTGCM	TGctCSaScC	GCCGCTGGCV	AGAcCRKCAC	TCTGGRGGtT	GAGAGctCAG	
ACACCATCGA	CAACGTCAAG	GCCAAGATCC	AGGACAAGGA	GGGCATCCCC	CCGGACCAGC	
AGCGCCTCAT	CTTTGCTGGC	AAGCAGCTGG	AGGATGGCCG	TACTCTTGCT	GATTACAACA	
TCCAGAAGGa	GTCCACCCTT	CATCTTGTCC	TGCGTCTCCG	AGGAGGTATG	CAGATCTTTG	
TGAAGACCCT	TACTGGCAAG	AcCATCACTC	TGGAGGTTGA	GAGCTCAGAC	ACTATTGACA	
ACGTCAAGGC	CAAGATCCAG	GACAAGGAGG	GCATTCCCC	GGACCAGCAG	CGTCTTATCT	
TTGCTGGCAA	GCAGCTGGAG	GATGGGCGCA	CCCTTGCCGA	CTACAACATC	CAGAAGGAAT	
CCACTCTTCA	CCTGGTGCTC	CGCCTCCGAG	GTGGTCAGTG	ATTGCcCTGG	GTACTCTGGT	
GGGTGGCCCT	GTTGCTCATG	CGAAGTGTCa	GTCTCGTTTG	TGTCAAGTTC	TACAGTGTCT	
GGTTTCATGT	TTCATGGATC	ATCGAGTCCC	AGTGAGATGT	GTTGGTTTTCG	TTA	
<b>&gt;gi 6013290 Gb AF184280.1 AF184280</b>						BlastN
Oryza sativa polyubiquitin (RUBQ2) Gene						e-150
<b>&gt;GAN001G22*</b>						
TGGCAGAKtG	GtGACACTAA	TTTCTGGaCT	GAVACATAAT	AGCTCAAAAa	ATCATCAGAG	
AtGGATAAAAt	AAACTTTCCA	TGTGTACATT	CGTTCGTcGA	ACTAGTAGGc	ACAAACAACt	
GctCATATTT	TGTGATCTCA	TGAtAGTCTA	GGTGGGACAG	GGGGGTAAAT	ATGTAGATTT	
CCGGCCTTGT	GGCTAATGCC	GCATGACCTT	AATCTGGGAT	GTAAATGTGA	GGKGTAGGTA	
AATTAAACTG	TAAGATGGGG	GATACAAGAt	GTATATtTGT	cCTGGGGGTA	TATCGGTATA	
TGATATGAGG	tTTCCTGAGC	GGCCGCTGCG	GGGTATAAAC	CAAAAATCTG	GGTTGAAGGT	
AGCAGCGGAT	CTAGTGAAAGT	TCATWGAAGC	tGTCTCCGAG	GACAAGGaCA	GGGGTGCAGA	
GGTGACATCC	GATGCAGTTG	CTGTGTTGGA	CCAGTTTGGT	TTCATGGCCG	AGTCATGGAA	
AAAAtGGACTG	ATTTcAGAAAt	TGGGGAGGTA	GTAATATATA	TGAGGRACTG	GaTCTGCTTC	
TTGGTTTTTTT	GGCAAATTAC	CACATATGCa	TGGaAGGaCA	ACAACtCGAT	GTGTGTGGCA	
TTGGCAGTAT	GATGATGTAT	TTTTTGGTGGc	AATTGGaTGG	ACAGCcAAAC	TGAACtCCAG	
TCGTcGGKGT	GTGTCTATTT	GctAGCTAGC	AGATTATGTA	TGATTAACCG	AtCCTGAATT	
CCTGATTKTG	ATTGAtAGGG	TGTGCTCTCG	ACTTKTTTTGK	aAS		
<b>&gt;barley AV836036</b>						TIGR
similar to GP 23954312 emb Importin beta-like protein - Oryza sativa (indica cultivar-Group)						3.4e-83
<b>&gt;GAN001H20*</b>						
ACAAAVGCTA	CATACTAATG	AAGAGGGGAG	CaAAGCATTc	ATCAGGGCAG	TGTGGCATTG	
CAACACGCCC	AGTCTTTCCCT	CTTATGAaAG	GtGGTAGATC	GACTGAtTAA	AGCTCACTTG	
CTTTAAATCT	AGAATTCcAG	ATCCATCCAT	TTTAATTTGT	CAAAGTTTGT	RATAtTGGCC	
AGCaCGTGCA	CTGTGcCTAC	GTATGTKGCA	TGCGCTACTA	TAGGTCTACG	TATGTRATCC	
ATCTTGAAAA	TaAGGRtCTG	TAGCGGCCGC	TCGCAGAATG	AGTGCaATAC	TTCATATCTC	
ATTGTGTACG	CACcTATCCCT	CAAATGAAAt	GTGTGACATC	CTGTATCGAT	GTTGCTTGCT	
TTGTAATACA	AAGCGGGAGG	RACCCTTTTT	TGGTAAATGT	GTGGTATCCCT	ACTATCCAGT	
AAAAATCCGA	ACCGCTAGTT	TTTCAATTGG	CATGCTTTTA	TGTGTGGtAT	AATTC AACCT	
CCCAtTTcAC	AATAGTATCT	cCCTCTATGT	cCCGS			
<b>&gt;barley TC148309</b>						TIGR
weakly similar to (Q39986) cysteine proteinase, partial (35%)						e-135
<b>&gt;GAN001J09*</b>						
atCAATKGAT	TGGttKTGCa	TcAGAGGCAA	AASCTcCGGG	GYGAGGGGCA	AAGGCGccTa	
CAGNTGGACA	ATGtCCACMT	GtTTGAaTGC	MTGCAACATT	CaYTKCAAAG	AAcTaAGCGA	
GGCGGTAAa	RCAAaaAGGG	CGGASVTTTT	GTTTGAAGct	CCAGtTTYAG	GGAGCAAGAA	
TGCCAGCSTG	AAGAAaTGGCC	AARTVTGGTC	ATtcTTGCGT	GCAGGCGACA	AGGCACcTaa	
TADTGAVTGA	CAATGGTCCC	CTGCaGTTTG	AcGAaTaCMT	TGGGAAGAAG	GtCcGTTTCST	
TTCBTGGGGG	GAGGAHTGGt	GAAAATGGAG	CAAaAGAMTG	AAGACcTGKG	ttGGtCAAAC	
AATGAATCAA	tACATTCccc	AAAGc				
<b>barley TC139685</b>						TIGR
homologue to GB AAO72678.1 29368238 AY224558 gamma hydroxybutyrate dehydrogenase-like protein {Oryza sativa (japonica cultivar-group), complete						1.3e-17

<p><b>&gt;GAN001K12*</b></p> <p>GASGTCTTCT GGGTCTTTCT GCATCACGAC GGGCAGCTTG CGGGCAACGA GATTTGGGTC            TCGTATGc GCAGAATCGG AAGGATACCC TTCCGCAGCC AAGGCAGCAA ATGTtGCTTC            CCTCCAGCAG AGTTCACGCA GCACCACCGG CTTTtGcTCC TCCTTACTTC CAAAAGAACA            ATATAAACGG GTATCCCTCA ATCTCATCAG TGCACCATCA ACCCTTAGCC AAAAAATCCC            GCGGCC</p>	
barley TC140478	TIGR 7.8e-46
<p><b>&gt;GAN001L11*</b></p> <p>TGCcAaCTGG WKGGKTTcTg CKCTTGcGtT TTTGGCTAAG GGTGATGgT GCACGTGATG            aGAtTGAGGG AtAcCCGTtT ATAtTKTTCT TTTGGAaGTA AGGDGGAAGC aAAGCcGGtG            GtGCTAGTCG TGCAAcTCTG GCTGTGAGGG ARGCAACATT TGCTGACCAG TGGcTGCgCg            aAGMGGTATC CtTCCGATTc TGCGGcATAC GcatACCCAR GTcTCGTTGc YCGCAAGCTG            CCGcGTcGTG ATGCAGAAGA CCCAGAAGCT CaAGATACCC ASTtAASCAA TCaGGGTACC            TCTACCGtGT GTtCGtGaGG GtGGGRcCGG GGGGGcAaCY CTKTTTKCAT GTSTTGTAGA            TCTGCTTATC TTGAAGcCCT TGCBACTKWC AAGTAATGKT AGGcCATTKT AGcCTGGGCT            TGTGAACtTK ACATATCAGT TTCAGCAATC ATCATGCATG AcTGAaTAAG ATGCTcACAG            GcTAAARtA</p>	
barley TC140478	TIGR 1.5e-63
<p><b>&gt;GAN001L21*</b></p> <p>TCCACGGGTR AGCKCGGGGA TAAACCGGTG GgcTTATGcA TTGTaCCGTG CTGGCCCGTC            ACGATAACTT TGGGGACTcG CATACCAaAT CCGCGCCTCA GTTtCTCGAC GGTtGGTGCA            AGCtTGCCAA GGCCATAAAG CTCTTCGCCA GAKGCTTCAT CTGTaACTTT CCCAGAATTT            TCAACTATGT aAGAKTTTTc AGGGGAATCA GAGAGTCCTC GGGATAACAAG TaAATCCAAA            TCCTTCTGGA GGAGTTCTCT TCCGTTAATA TATATGcAG TGTTTCCACC ACCACAACtC            TTGGGCATAG GGTAATTAAA CTCTGGAATA TAAGGaGgTA TCATGCCAAG GCAGGGCTGA            CCGACAACAC CCCAGAACCC AGCACGGTAG TCATACCAG</p>	
gi 32985875 dbj AK100666.1  Oryza sativa (japonica cultivar-Group) cDNA clone:J023112F17, full insert sequence	BlastN e-102
<p><b>&gt;GAN001M04*</b></p> <p>TGACCAACAG CGACCTGGTG AtCATAGGCR AGCCCACCAA CGACGTGAAG GAGGAGTACG            ACGCGGAGGT GGAAGAGGAC GACGTcGACA ACGTTGACGA ATCCGACGGG GACGATTTCG            ACCAAGAAAC CGGCTGAGCC GTCCGGCTCC CCCAGGCTCC AGTCCCAATA CGTTGGCCTT            TCTGCAAAGC AATCTGTACG CTTGTTGCAG CCCGAGATCC CCAATTATCT CTAGTTGTtA            CTAGATCAAT TTGTGCaAGC KATCATACTT TACTTTGCTA CATGGTGTtT CGACGATTcG            GGGGGTTTTAC CTACCCTTGG ATTAGCTCGT TAATGCTGTC AGGTATTTaT CGAAACACCC            ATATGAATCA TTTCTCTATG TGAGCGGGCG C</p>	
barley TC149074 weakly similar to vitellogenin {Gallus gallus}, partial (14%)	TIGR 6.8e-81

<b>&gt;GAN001N20*</b>						
TGTGGACGCS	AGCGATTTTC	AGAGCGGAAT	AGTCCGGCCC	TGGCGCTTGC	tCCTCACGAa	
ACTGTGGGGC	GGTCAACTAT	TCTACTACAG	CAGAAGGtCG	ACTGGtCAGA	tCGGaTTTCT	
TCAGCTGACC	GTTGGKTTGT	AGGGaGCGTG	CTGTATGAGA	CTGCTGGCCC	GGtGCTCTTC	
ATGTTAGCCG	CCTTGCgTTT	CGGGTTTGGA	CACGTCACGT	GTGGGTTAAG	TGCAACACAT	
TCATTTGTAT	GctGctATAC	TAGTACTAtA	AGCGGtCAAC	TTaCTCTTaG	AAGCATCCTC	
GTGCATGACG	ATcGAcGAGC	GGSCGCTCAA	CAAcAtGTCG	TGTGGGcAAM	GTGTAcGGGG	
GTcGCSAMCT	GATCTGCcCT	CTGCAaCcGG	GGGtGGCGGR	GGRARCTGCa	GCTGCGACCG	
CGTAAcCtTT	TKATGATGAC	GATCCYGGTG	TGTGAAcTGT	GATAcTGTGT	CAARAARTTA	
tGATGCTTcC	TGTAGGAGGG	aAGCATGCTT	GctTcTAAAt	CCctCATGTA	CTGTATATAt	
TCTCctCAGA	TGCSAcCTTC	TCCTGTATCC	TCTGTaCCCC	aCGctGCCAG	CGGGCGCTGS	
GGCTTCTCTC	GGCTTGCTTT	T				
barley TC149745						TIGR
weakly similar to UP Q9CAZ0 (Q9CAZ0) F22O13.19, partial (16%)						4.0e-68
gi 2565304 Gb AF024589.1						BlastN
X Tritordeum sp. glycine decarboxylase P subunit mRNA, complete cds						5e-45
<b>&gt;GAN001016*</b>						
RGGScCtccK	GctGCCCAAR	GtGCTCCACT	ACTATGCCAA	GGaCGCAGCT	CCAGCACAGG	
CTCAGGAGAA	GGATCGAcAA	GTGCGTGGaG	TGGCTGCCCT	ACAAGTCCAA	CTTCAGATAT	
GTTGTACATA	GGGaTCTGGC	CGAGTAGGCA	GGACAGGCAC	CGGTTTACGG	CTTTGGTTTT	
GGGTTTTGTT	CTTACGGTGT	AAGTAGTTAC	CGGGTTTTAG	ATAAACCTAA	CCCATGGtGT	
GGTGTGTAAG	TGTGTGAATA	CAGCTGAACT	GTGCATTGGG	TTGGTTTTGG	TCAGAGGGGC	
TGGTGG						
barley TC142994						TIGR
similar to (Q7EZ88) Ternary complex factor-like, partial (18%)						1.7e-62
<b>&gt;GAN001P03*</b>						
TGAAAcAAAA	AAGCTTAGTT	ACAAACCCAA	ATTTGAAATT	GTACTGGCCA	GTtTACACAA	
GGRTTGCTG	GKATATTCTT	CTAAACTTAA	CTAATAACTT	AACTAGGTGC	AACTTCTGGK	
ACTTCTAAGC	KCAGGKAGGt	ACAAACTCGG	TCGAGGaAGG	CGAGAGASGC	ACAACATAGA	
TGCCTATGGC	AATAAGCAGC	AATATAAAct	GGATGARACA	TAACAGCGAC	GCGGTGCTTG	
TTCTAGACTG	CAGATGCaAG	AKcTCTGCAC	TCGCAGAAGC	TCTCTGCATT	GCGCCTCCAG	
CtTCTCTACC	ATCTCCCGTA	GTATTGCTGC	TCGGTTCTCG	GCACCACGCA	GTTTGAGTtC	
GAGCTGCCTG	TAGTCGCCGA	GCAGACATTT	CTGGtCCTCA	TAGACAGCTT	TTTGATCCT	
dbj BAD08716.1						BlastX
unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]						2e-009
<b>&gt;GAN002B02</b>						
AGAGCAAAGG	AGGGAGGAGA	ACATAGCAGG	TTTGGAACCG	TACATGAAAG	GAATTAAGAT	
GCAACAAAAT	GAAGCTTAGC	CTCATAcGTC	CACCGAGCTC	GTCACGACAC	CTTCATCAAG	
TGCAACGACT	CCAGGAAGCT	GCTTTCCTTC	CAACAACtCC	AAGCTAGCGC	CACCACCAGT	
TGAGATGTGG	CTCATAACAT	CAGCCACTCC	CACCTTCTCG	ACAGCCCGCA	CGGAGTCTCC	
GCCTCCAG						
gi 21832 emb X15233.1 TAPGKCHL						BlastX
Wheat mRNA for chloroplast phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)						e-102

<b>&gt;GAN002C11</b>						
TATACATTCA	AAACTCTTCG	ACAAAGAAAC	AAATGTGTAC	ATAATACATA	TACAACTGCC	
GGCCGAGATT	TAGACAGTGT	ATTCAATCAT	GCAAGGCCCG	CCAGACCAAT	GTATTGGCCA	
GATGTACCAA	TCCCTACTTG	CATTGCCAAC	AAACAAATCA	TTTCGCACAT	GGGACGTGGG	
GTTTTGCATG	CGCCACAGC	TTGGACTTCC	TTCTCACCGT	AATACCGAAG	GTCTCCGTCA	
TGTCCATGTC	TTCGGCCCCG	ACGCCAGAGG	GCAGCTCCCA	GTCGAAAGTGG	AAAAGGAGGC	
TAGCGAGCGC	CAGCTCCATG	TTGGCCATCC	CGAGCGACAT	GCCTGGGAGC	GGCCGCTTAG	
TACTCTTATT	TGAACCTCCT	TACAATCATC	TAGCTACAAC	TGCATACATA	TCCCCACCTC	
CTTATAAGGG	AGGGGCTTTC	AGCCGCAGTC	TCTGCCTCCC	CACACTCCTC	TTGTCTCCAA	
TATTTCCGTT	GATGTTATGA	ACCATCCTCT	CTTGCTACCA	CTGTATAATG	ATGCCTAGAC	
ATCAATGCAG	AGAACGATGG	TTCTCCGGTT	GTCTGACCAC	TCATCTGAGG	GTGTTACCGA	
AGGCGAGGAG	GGACTGTACG	TCTCTCTTCT	CGGACGGGTA	CTTGATGGGC	TTACCGGTGC	
GGCCCGGAA	GAGGANGATC	GTCGGGAAGC	TCTGTAGCTG	CAGCTCCGCC	TGCCGA	
barley TC147272						TIGR
similar to UP Q6V3B0 (Q6V3B0) Adenosine 5' phosphosulfate reductase, partial (76%)						6.1e-75
barley TC136381						TIGR
						2.3e-34
<b>&gt;GAN002E03</b>						
TCAGCCTTCT	CGCCCAGGTG	CTCCGCCGCG	CGCTCGCCCG	GTTCTAGCAG	TAGAAAATAC	
ACTAAAAAGA	GAGAGGGAAG	AAACTACTGC	ACCTTGACCT	GCACGTAGAG	TACGTTGGTG	
GTACGCGGGG	TAGAAAGGGA	CACGCAAAGT	CTACCCCGTA	GTATTTCTTT	TCTGTATTTT	
TACCGCATCG	ATTTTACCGG	CCTCAAAAGA	CTGGGAAGAA	AATGGCAGGA	GTCTGTCTTG	
TAGCACGTAT	GAGCACTCGA	AATATTTCTC	GAGGCGTACG	AGTACTCAGT	TTTCATCTCC	
AA						
barley TC147520						TIGR
weakly similar to (Q8K557) Onecut 3, partial (7%)						1.3e-62
<b>&gt;GAN002G16</b>						
TAGGGTTAGC	GGGTCATCCA	CCCCGTCCAG	ACCTACGCCA	TGTACTIONT	CTGTTTCCAC	
TACTTCAAGA	GGATCATGGA	GACCTTCTTC	GTCCACCGCT	TCAGCCACGC	GACTTCCCCC	
GTGTCAAACG	TCTTCAGAAA	CTGTGCCTAC	TACTGGACCT	TTGGAGCCTA	CATTGCCTAC	
TACTGCAACC	ACCCTCTGTA	CACCCCGTGT	AGTGACCTGC	AGATGAAGAT	TGGGTTCCGGC	
ATCGGGGTCTG	TGTGCCAGAT	CGCAAACCTC	TACTGCCACA	TCCTGCTGAG	GAACCTCAGG	
AGCCCGACCG	GCAGCGGCCG	CTACCCCATC	CGGTTCCAGT	AGCGTCTGTC	GTGCATGCGT	
ACGTACGTCA	ACCTAATACA	GTAATAAATA	AGCTGCGTAT	AATGCAGGAG	TGAAGGGTAA	
CGTGGATACT	ATATACGTAC	ACGTCGATAT	ATCGCCCTAA	ATAAGATGCA	TGGACGTATT	
GCAGCAGTGA	AGTGTGTAAC	CAGATCAATG	CATGTCATAA	CACGATTCAT	GCAAGAGTGC	
AACCATTGCA	GGTGGTGCTA	TGCCGTCTAG	CGGCCGCTGG	CAAACGATAG	TAGTATATAC	
GAGTATTACA	GATGCACAGC	GTTGAGACTT	CCTTTGCAGG	AAGCCTATTA	TAATCCGTGT	
CTGGACACTG	AAAAATCAGA	GAAAGAGAAA	AGAAGAAAAG	AAGAAAAAGG	GAGAAGGTGT	
TGGGAGCTCG	ATACTTTTGA	TTCTCATTAC	ANAGAATCGA	TCATCCGTGA	CGACGGCTGG	
GGAAAAATTT	CGAGAGGAGT	CACCTGACAG	GGNCATGCCG	CTGTGGGGGG	CGTTCACCTT	
CT						
barley TC139592						TIGR
similar to UP Q9M2U2 (Q9M2U2) Glycoprotein-like (Synaptic Glycoprotein SC2-like protein), complete						2.9e-68
barley TC130915						TIGR
UP O65189 (O65189) Glucan endo-1,3-beta-Glucosidase isoenzyme I, complete						9.0e-53
barley BE420815						TIGR
homologue to GP 22240 emb C GADPH (Zea mays), partial (30%)						3.2e-39

<p><b>&gt;GAN002I09</b></p> <p>TAGCGGTANG GGATTTCAGTA AATGCGAAAA CTCCAGTAGT TAACCTTGAG GTGGGAGAAA            TAGTTACTAC TGCTGTAGAA GCTGGATTTC TAGCACTAGA CATCGAAATT GCTTCCGCGG            CTGTCACGGT AATTGGAGGA GTCGTCGGTT TTGGAATTGT TGCGCTCATT GGGATAGCTG            CAGGTGCGCT GCTTGACTTG ATTTTTAGTT GTGGAAGTAG CAAGGTGGAG ATAACAGACG            GGCTTACAGT TTGCCGTGTG GCCCCTATGC CTCATGGTCT CGAACTCGCT CGTCTAGTTA            AGCACAATTA CCCTGAACTA AAAACCGATC ATGCTACTAC TATGATCTTT GCTATGCTAT            CTTCTGCTCT TAGTGCTAGC TACTACTGTC GTGAGTATGT AAGTGCCTAG TGTGCACTCC            TAAAATAATA CCCCCGCC CTGTCGGGAA ACTATTGTAT TCATGATGCC ATGATGAGGA            ATAAAAGTCA TGTTGATTCA AGCGGCCGC</p> <p>gi 929670 emb X82937.1 HVRNAJIP            H.vulgare mRNA for jasmonate induced protein</p>	<p>BlastN 0.0</p>
<p><b>&gt;GAN002L09</b></p> <p>TAACATATTC TTTTGCACAA AATTCTCATA ATTTACAACA TGGTCGTGCA ACTCAAACCA            CATGACAACA TATTCGTGGT GAGCACAATC TCAACTACAC CTTATTTGCT GGGGACAAAG            TTGGTGGCGA ATGACCAAGC ATTGTTGTTG ACAGGGTCAA CAATGTGGTC AGCGAGGTTT            TCAAGAGGGC CCTTGCTGTG GACGATAGCT TGCGCAAAGA AGCCAAACAT TGAGAACATG            GCCAGACGTC CATTCTTGAT CTCTTTCACC TTGAGTTCGG CAAATGCCTC AGGGTCTGCC            A</p> <p>gi 1657858 Gb U73218.1 TAU73218            Triticum aestivum chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor (Wcab) mRNA, complete cds</p>	<p>BlastN 2e-62</p>
<p><b>&gt;GAN002M10</b></p> <p>TGGGGGCGGC TTCAACTTCC AGAACCCAAA CGCGACGAAG ACGTGCGGGT GCGGCAAGTC            GTTTGCGACC AGCAAGGAAA TGCAGAGCAC AGCAACTGCC TGCAACGACT GAACTAGAAA            TATAGTGCCA GGGTGTGATA TTACCATGCA TCTTTGGTTG CTCATGCATC CGAAAATGGT            CGGATGGACA ATACCACAGG TTCACAGATA TACTCAGAAT GAATGGCTAC AGTTTGTAAAT            ACAGTTCAGT TCAGTGTGTA TCAAGATTCC AGTGGGACTT GTAAGTTGTA ACTGCTCAGT            AGTAGAATTT TAAAGATAAT CGCGTGAAGA TA</p> <p>gi 15218553 ref NP_172520.1             hesB-like domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>BlastX 5e-05</p>
<p><b>&gt;GAN003A19</b></p> <p>TGGAGGCTCC CTCATTGTTT GTCAGAAaCAG CACAGAAGAA GGATTCTAGG ATGCTGCAAA            GGAAAAAGAT TGTAGGAAGA TTTGTGTCTA GGTGTTGGAA GGCTTTGATA CTGTCAATAA            TATAGTACTG GGGTAAAGTA TAGCACGCAT GCcCTGCATG ATGGGCGTTG GCATCAGTTT            AGAGTGTATT TCCAAGGTGA AAACGGGTGT cATGTAAAAG TATGATATCC GTTGAGTTGT            ACAAAaATAAT ACTATTCAAA TCTATAAGGt ATATaTtGTa</p> <p>gi 26518369 Gb AY162186.1             Triticum monococcum extracellular invertase (exin1) mRNA, complete cds</p>	<p>BlastN 1e-29</p>
<p><b>&gt;GAN003B09</b></p> <p>TGCAATCTTT ATGTTTTACT TCCACAGGCA GAAATCATCG TTTCTGCTAC ACAACATACA            ACAACTCAAC TTCCCTGCTG AGAGCAAGGC ACGCATGGCA TGACAGCGCT ATGTAGGAAG            GAACATTACA AAGTGGTGGC AACGTGCAGA CCTAACAAATC TATATCACCC CATCCATCTC            CGGTAACCTT GTAAGCCCAT TACTTCCTAG GGTTCCTTTC CCCTTCCCGT AGCCGTTTAG            CAGTTGGTTT CATATACAGC CAGGCCTTGT AGTTCCCGAC CTTCCAAGCG TGGGTTCCTC            TCGAAGTTGC TGAGAGGAAT GTGCTCAAAC AGTCCA</p> <p>barley TC146344            homologue to (Q84JK7) Leucine-rich repeat protein, partial (94%)</p>	<p>TIGR 5.0e-70</p>
<p><b>&gt;GAN003C03</b></p> <p>TGCCAATGCT GGCCAGAAGG GTGCGCTGGG AGGATCTGGT CTCAAGAAGA GTGGGAAGAA            ATGAGTCTGC CTGCCATTC GTAATGCCCA GAAAATGATA ATCTATCTAT CTACCTATCT            GTGTCGCGCT TCACTATCTG TGGTTGA</p> <p>barley AW982800</p>	<p>TIGR 9.1e-28</p>

<p><b>&gt;GAN003C04</b>  TAAACTGTAC ATGCATCGAA ACATATAAGG CCGTCCAGGG TATAACAAGG CCAGCGGCAG  CAGCTAGCAG ATTACCAAGT CCCAAACTGG TGCCAACCTT CTCCCATGAT AACAGTAAGC  AGAAACATAA CAGGGTCCAT ACCAAGAAAA GAAAAAAGGT TTCCATTCTGA TAGTTCTACG  GTAGTTTATG GTTTATGCAG CAAAAGCACA TATCCTTCAC CAGCCCCCAC CGCCAGACCC  CCACCCACCT CCGGCATCCG GTGCTGGGAC GGCCTTCTTG GCA</p>	
<p>barley TC133300  weakly similar to UP Q8YQB7 (Q8YQB7) All3916 protein, partial (13%)</p>	<p>TIGR  1.7e-42</p>
<p><b>&gt;GAN003E17</b>  TGAAAAAGAA AGAACTTGCT CTGAGGCTGT TATTATCTTA CCATAGTCGG TTAAACATTA  GAAGACCACA CCACCCACAC GAGAGAATTT ACACATGGGC GCACACAAAG TACACACATA  CACCCATCAC TCGCTAGCAT GCGGCGAGCA AAGAGCAAAC TGAGGTAACA AAAGAAAGTT  ACAAGCACTA GTATAGTAGT ACTACTAAGC TTAGGAGAAA CTACATGCAG CCTCGGACAG  CAACGTACGT ACGCAGGATT TAGATAACCA AAAGAGCAGC AAACATGGCG TCGTCCAGA  TCGAAGTTGT CGATCGAGCA CCCCCGTCTT CCTCT</p>	
<p>&gt;barley BE422365 similar to PIR B84750 probable auxin-regulated protein [imported] -  Arabidopsis thaliana</p>	<p>TIGR  3.7e-70</p>
<p><b>&gt;GAN003E18</b>  TGGCACACGG CATCAAAACA CGAGCCCTGG GCTGGTCCGG TCTGCTCAGC AGCCTTACGT  GTTACCCCAA CACTGTCCTA CAAATACTAT AATTCTGAAC ACTAAAGACG TTGGGAAAGTA  TCTGAGCACC ATGTTGAGAA ACATTCCCAA GGCTATTCTT CCCTGCACAT TGGCGAGGAG  GGCTTCGATG GATTAAaAAT TTCTGCCCTA AGAGCTGAGG CAGTGCCAGA GCTACATTCT  CTTTAAGGAA AACATCTATC TAGATCTTAC CAGTAGAGGG CGTTGCTAAT TCATCACATT  TCACAGTCCC ATTGGaACAC TGGCTGGTGG a</p>	
<p>keine Homologie</p>	
<p><b>&gt;GAN003F10</b>  TAGACGATCA GCTCGTCGAA CCGGGACTGA GCTATCTATC CTCCCGACGG ACAAATGCTG  CTAGTAGCTT AATTATTATT TCTCGTCGGG CATTATCGCA CCCTTTGTTT AATCCATGTT  TATGAACCTC TGTGCAATGG AACTATTCCG TTGGTTGTCA ACTGATGATG ATTATATTA  AAAACCTTCG GCTCCTCTTA AGTGGTCCGG GGTGAGCAG TTTCTGTCAG CTCAGCTGCA  AAATGGACGA ACGCGCTCC GTGTAACGAA CGTGCTTTGG TTTTGTATGA CGAGTGATGG  ATGAGAGGGT ATCGC</p>	
<p>gi 3153150 emb AJ006296.1 HVVU6296  Hordeum vulgare partial mRNA for chlorophyll a/b-binding protein</p>	<p>BlastN  4e-67</p>
<p>barley TC146886  similar to UP Q75KQ4 (Q75KQ4) Expressed protein, partial (92%)</p>	<p>TIGR  9.8e-36</p>
<p><b>&gt;GAN003G19</b>  TGCAGATTAA AGTCCCGTTC ATCACCGACG ACCTCGAGAT CGAGTGCGAG GGGAAAGGAGA  AGTTCAAGTG CGGGTCCAAC GTCTTCTGGA AATGGTGAAG CTGGTGCATA TGGCGAGTGC  TGATGTATGT CAGTCAGGCT GTACCTAGAT GTCCAAACTG CACAAGTGTT TCGGCTGCGA  AGTCATCGTC TCTGTAATTT TATCATCAAG TGGAATCCTG TTTTTCACCT GTAATTGCAC  TAGTGGAAAC CTGCATATAT CCTGTCACAT CCAGCACGCA AACATTCATT AGTTAGGATC  TTTCAGGCAA TCCCCGAGCG GCCGCTCAAG CGTGTGACCA TCATGCCCAA GGACATTCAG  CTGGCTAGGA GGATCCGTGG CGAGAGGGCT TAAGCTGCTT TGCTGTGGG AATGGCTCTG  GTGGGCATAG CTCCGTGTGT CTGCTTTTGC TGCTGAACAC TTATCATGTG TCGCGAACTA  CTAATATTAG TCGTCTGTAG TAATATGTCA GACTATATT CTGTGTCGTA CTATGTTCTA  GAGCTGGATC ATTTGCTCCG TGGCCGTCTT GAAGCATCCA CATGGCGGGT TCTTATCTGA  ACCCTACATC TTATGTTCCA GGATTAGTGA TTGTGTGAAC TGTATTATG TGCTGTGTGTC  TCGTCAACCG CCCGCCATGT GTGGATTT</p>	
<p>gi 19094 emb X66428.1 HVPSANMR  H. vulgare mRNA PsaN for photosystem I subunit N</p>	<p>BlastN  e-137</p>
<p>barley TC131238  UP Q6LB28 (Q6LB28) Histone H3 variant H3.3, complete</p>	<p>TIGR  1.2e-68</p>

<b>&gt;GAN003J15</b>						
TGCCATTTAG	TACAACTAA	CTGAACCATG	CCGTCACCGT	TGTAGGTTAT	GGGCAACAAC	
AACAAAATGG	GGCTGACTCA	GTACATGCGT	CCGCCCTGG	AGCCAAGTAT	TGGATCGTGA	
AGAACTCGTG	GGGGACAACA	TGGGGCGACA	AAGGCTACAT	ACTAATGAAG	AGGGGAACAA	
AGCATTTCATC	AGGGCAGTGT	GGCATTGCAA	CACGCCAGT	CTTTCCTCTT	ATGAAAGGTG	
GTAGATCGAC	TGATTAAGC	TCACTTGCTT	TAAATCTAGA	ATTCCAGATC	CATCCATTTT	
AATTTGTCAA	AGTTTGTAA	ATTGGCCAGC	ACGTGCACTG	TGCCTACGTA	TGTTGCATGC	
GCTACTATAG	GTCTACGTAT	GTAATCCATC	TTGAAAATAA	GGATCTGTAC	GA	
gi 7489849 pir  T10518						BlastX
fruit bromelain (EC 3.4.22.33) FB1035 precursor, pineapple (fragment)						2e-17
<b>&gt;GAN003L21</b>						
TCTACTTGGC	ACAAAAAATC	TGCTAAAAAT	TACCAAGATT	CATACAACAA	CGAACGGACA	
GCTCTCTTTT	CTCTAAGATT	TCCCTCCATC	AAGTAACGTA	ATAACTTAAA	CTTCCCCGAG	
TTGAGACGGA	GTAGTAGATT	TTAGAAGAAC	CGAGGGAGTT	TCGAGTAGTT	ATACGTCAGT	
CGTATAGTAA	TACTGAACTG	AAATGTTTAA	GACGCAGTTC	GATAATCACA	TCTTTTCAGA	
GCCCAACACC	AACTAGCTTT	AATGACGTGC	AAATTTGATC	GCCGGCCAAA	CGAATCCAGA	
TGGGGTTAAA	AGATTGCCAG	ATAACGGTCA	GTAGCTTACT	GCGATTTTGT	CAGCGGCCGC	
TCGCCGAGCA	CCTCAATGAC	CCCCTACAAA	ATATGGACCT	CGAAGCTTCG	CAGGAAGACC	
GGAGGCAAGA	GTCGATCTAC	TTGCTTATAG	ATGTGATGCC	TATATGTAAT	GATGATTGCC	
ATGAATAGAT	ATAGCATAAC	TATGTGTTTT	TCAATCAATT	GCCCAACAAT	AATTTGTTTA	
CTCACTGTAT	GCTTCTACG	AGAGAGAAAC	CTCAAGCGAA	AGCTATGGGC	CCCCGGTCTA	
CTGACAAATA	TATTTACAAA	AATACTAAAT	ACCTTGTTC	CTTA		
keine Homologie						
<b>&gt;GAN003M18</b>						
TACCATTTAT	CGACTGCTTA	AATGTCAAGA	GTAATAACAA	ATGTGACTTC	TTAACTACAC	
ATAAGAATGT	TGCTTGTCAA	GCATGAAAAG	TGTACACAAC	CGAACACCTG	TCCTGGGAGC	
AATATGTATA	TACAGAAACG	GCAGACTTTA	CACACAAGGC	ACACTACACA	ACTTGGACGG	
ATGAAAGAAA	CAAGGAAGCA	AGCAACCAC	GATAAACACT	TCATTCACTC	TTGCTCCATT	
TGCGAAGAAG	GAGCGTTTTT	ACTTTAGGCC	CCAAAGCATC	CCATGACTTT	C'TTGGGAGAG	
TTGCCGGTGG	CGCGGTACTT	GGCGGCCATC	TCCTCGGCCT	TGAGGAGTTC	CTCCCCTTTC	
TTTGCCCTCGA	CCATCGCTC					
barley TC139806						TIGR
similar to UP REMO_SOLTU (P93788) Remorin (pp34), partial (77%)						9.0e-80
<b>&gt;GAN003N17</b>						
TGGCATGGTG	GGCGAAGAAG	GTACCAAGAT	GGAGAATCCA	AGCGACGAAT	AAATCAGCGC	
ATGAACGGAA	AGTAGAAATG	GCGCCACTTC	TTTGGTGGCC	CCGCTGTAGA	AACTTAAAGA	
GCAGTGGTAG	ATCGGTTCC	CTACAAGGGA	CGGCCCATGC	TCTGTGTGAT	CATCTGGTCG	
TGTAGCCGTG	GTCTTCTTTG	AACGCTGCTG	CGATGAGTGG	GCTCCAGCAC	TCAGGAATTG	
TTGCAACCTG	TTTAACTACC	TTATTAATGT	AAGAGCGAGC	GGCCGCTGGC	AACAAGTTTA	
ACTTCATTGT	TGGTCAACTG	ACCTCCTACA	TCATTAGTTG	GCCATCCAAT	CCTGAATCTA	
TGCTTGGATA	AGATCTACGA	CGTCCGATTA	CAGACAGACC	ATAAGGTCC	ACCAAAAATC	
GGCATGCAAT	CAAGTCGACA	GGTGCGGGTA	TAATTGAGCA	GAACCAACAC	CAGTAGCAAC	
CTCAACAGTT	GTAGTATGCA	ACAGTTGGGG	GGGGAGCGGG			
barley TC141457						TIGR
weakly similar to UP Q9VYD8 (Q9VYD8) CG1987-PA (RE47308p),partial (16%)						3.9e-58
<b>&gt;Hv366GL<sup>3</sup></b>						
ACCTGCATTT	CTCATCTCAA	GATCTTCATG	GGGTCTTTGA	TTTTTGGCATA	GCTTTTCTCC	
AATGTATATC	TATGATTGGC	AACGAGGATT	TAAATAGCAC	TGCTAGCAAC	AGCAGCTTAG	
GACCTCCAGG	GAGATGTAAC	AATCTCTGCT	GCTGCTACGT	TATTGAGATG	TATAGTTCAT	
ACTGAGGTAT	CGCTCCATGT	ATTATATGTC	ATGATGGGCA	AACACGGATC	AAAGTTTTC	
CGT						
barley TC139267						TIGR
similar to UP Q84VG9 (Q84VG9) Lycopene beta-cyclase, partial (22%)						6.2e-50

<p><b>&gt;Hv456GL<sup>3</sup></b>            ACATGGGCAC GCACGAAGAG CCGGCATGGA CAAAGGATGG GGTGATCaAC CAGGCATTTG            AGGAGTTCAA GGAGAGCACC AGGAAGATCG TGGAGCAGGT GGATGAGTGG AaCAACGACC            CcGvCcGGAA AAAccGACAC GGCGCCGGCA TGGTGCCGTA TGTGCTGCTC AGGCCGTCGG            ACGGTGATCC CACGGACGAG AAGATGGTGA TGGAGATGGG CATCCCcaAC AGCATCTCCA            TTTGAGCTGC CTTGTGTGTG TGTGTGTwAc TcAAActAGGC GTAAAtaAGa GtGThTtCAG            TcTcTtGGCC cGGbGGTGGG TataATGGGA ATGAGcaccA aattaTawTT wdhGGacacG            ataTaTaTaT aTaTGttksa CGaGataatc tctttctaGa GtcacaaGaT aTtacaTaAa            caaGGcaaGa ttaGaaaGTc tttTtacaGt</p>	
<p>gi 1777960 Gb U56406.1 HVU56406            Hordeum vulgare methyljasmonate-inducible lipoxygenase 2 mRNA, complete cds</p>	BlastN e-107
<p><b>&gt;Hv462GL<sup>3</sup></b>            ACCAGCcGGG GTWRtTTAAG GAGCAAaGGC ACCGTGAATG GCGGCAGAGG CANCAGTAGC            AAATGCATAC TCGCAACCGA TTGCAACAAA CCCTTGGATG GTTTCTGTAG GAGTRATGAA            GCCATCCTTG TTCCGGTCGA AAAAGGAGAC ATGTTTCTGA AGCTCCGTCA TGTTCGACGG            ATCAAACCTG GCCACGGCAT GCCCCCAGTT CCAGCTAAAG ATCCACAGAA GCANAAGAGA            TGGTANCTTC AGAGAAGCCG CTGCCANCGA TTGTGCATGA CCGGGCATTN TCGCCTGTAG            CTATNAT</p>	
<p>gi 6900307 emb AJ250283.1 HVU250283            Hordeum vulgare mRNA for putative calcium binding EF-hand protein (bci-4 Gene)</p>	BlastN e-153
<p><b>&gt;HvD0125<sup>3</sup></b>            CGCGGCCGCT CTGAGTTACC ATGGATTCTT GTTGTGGTTG AGATTTGAGA ATCATATTTG            AACTCCCGTT AAGTGAGACT AGGTGGGATC TGTAGATATG TCCACTGAAT TGAATTGGGT            GGATGGATTA TTTCAATTCTT AACAATATGT CTGCTCTCAG TTGTGAACTT GTGATCATGG            TTCTTGAGTT TTTGTTTTCAT TTGTAAATTT TAATTCCTGG TTAATACACC ATGTGCAAAA            TACAACACTT GAGGTG</p>	
<p>keine Homologie</p>	
<p><b>&gt;HvD0122<sup>3</sup></b>            CGCGGCCGCT CTAAGATTCTG CTGATCAACC ACTGCCCACC ATGGGCGCCC GCCTATAGCG            ACGCCCCTCG CCGCTGAGGT CACGTATATA TATGAATAAA CGCTCTGATC TGATCTCCAT            GTGAGGGAGA AAGGAGTCTG CATGCTGAGC CAACTCTGTA TGGCCGGCCA ATATCGTACT            ATGGTTGTTT TTTACTTTCT CTCCCTTTTG AGGAGACACG AGGCTTTTATT GTACGTTGCA            CCATGTACAC TTCCATTATA TGGATTATAC TTATATAATC ATTTTCATCCA TGTATTTTAT            TTCACAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAATTAATA TTCATTAATT GCCTGAACAG            GTAGGTCAGA CACATCACAC ATACACATCG GCTAAAGTAC AGCAAGGAGA TGACTGTTCA            GTCACTCATA CGGACGCGTG CATGCATGCC GCGTAAATAT ATATGCGCAC ACACACAGTG            TGTGTGCAAG GTACAGACAT AGGCATACTC TTTTATTTTA TTTTATTATG CTCAATATCG            TACGTATGAG CACTCCATCA ACGTAGATAT TAAGCTCCAC ACAAGCGCCG TCCATGAACC            GGCCGCGGAA NAACCCGACT GANTATAGGG CGAATTCGGG TACTCGGGCC CCCNCTCGAG            GTTCGACGGT ATCGATAANT TTTGATATCG AATTTCNGGC CGNTCG</p>	
<p>gi 1261916 emb X96979.1 HVLTP7A2B            H.vulgare mRNA for lipid transfer protein 7a2b</p>	BlastN 2e-92
<p><b>&gt;GAN04E10</b>            TGGGAGCTGG GTTTTCGCTC GGTGGATGGA TGGATGGATG GATGGATGGC CATTGTGAAT            TTCTACGGCC GATTGGATTT GTCTGCCCAA TTGTGGCTAG GTGTACAAAT GGAGGCTCCC            TCATTGTTTG TCAGAACAGC ACAGAAGAAG GATTCTAGGA TGCTGCAAAG GAAAAAGATT            GTAGGAAGAT TTGTGTCTAG GTGTTGGAAG GTTTTGATAC TGTCATAAAT ATAGTACTGG            GGTAAAGTAT AGCACGCATG CCCTGCATGA TGGCGTTGG CATCAGTTTA GAGTGTATTT            CCAAGGTGAA AACGGGTGTC ATGTAAAAGT ATGATATCCG TTGAGTTGTA CAAAATAATA            CTATTCAAAT CTATAAGGTA TATTTGG</p>	
<p>gi 26518369 Gb AY162186.1            Triticum monococcum extracellular invertase (exin1) mRNA, complete cds</p>	BlastN 3e-50

<b>&gt;HvD0126<sup>3</sup></b>						
CGCGGCCGCT	GCAAATAAAT	GCAGTTCCGG	TTTGCTTTGC	AGATCATTCA	TGTGTATGGT	
AATGTGTGGT	ATGTAGTTTC	TGTATACAAG	CAAGCTAGGT	AGATATCTGG	AGTGGTTTTTC	
GACTTGCGAG	GGAGTGGTAT	ATATGTGTGC	TGTGTACTCT	GGACGAACTT	GAATCGAATG	
TATCGACCGT	TCTGGTGCTT	AAGGATCATT	TTTCGACAGA	GGGGCTACAT	CGAGCCCGTG	
CCTTC						
keine Homologie						
<b>&gt;Hv196rh<sup>3</sup></b>						
CGCGCCGCG	CCGAGTaCGA	CCTGCCGCTG	GTGGGGAACA	AAGCGCTGGA	CTTCGCGGCG	
GAGGCTGTGT	TCGACCAGGA	GTTTCATCAAC	GTCAAGCTAT	CTGATTACAT	TGGGAAGAAG	
TATGTGATTC	TTTTCTTCTA	CCCTCTGGAC	TTCACCTTCG	TCTGCCCAAC	TGAGATTACG	
GCTTTCAGCG	ATAGACATGA	GGaGTTTCGAG	AAGATAAACA	CTGAAATTCT	TGGTGTTCG	
GTTGACAGTG	TGTTTTCCCA	TCTTGCATGG	GTGCAGACAG	AGAGGAAGTC	TGGTGGACTT	
GGTGATCTGA	AATATTCGCT	GGTTTCTGAC	GTCACCAAAT	CGATCTCAA	GTCTTTTGGT	
GTATTGATCC	CTGATCAGGG	AATTGCTCTG	AGAGGATTAT	TCATCATTGA	CAAGGAGGGT	
GTGATTCAAC	ACTCCACTAT	TAACAACCTT	GGTATTGGCC	GTAGTGTGGA	TGAGACCTTG	
AGAACCCTTC	GGGCTCTGCA	ATACGTCCAA	GAAAACCCAG	ACGAGGTCTG	CCCGGCAGGA	
TGGAAACCTG	GGGGAAAAGT	CGATGAAGCC	TGACCCTAAG	GGCAGCAAGG	AGTACTTCGC	
TGCTATCTAG	ACGTGACCTT	TGCACTCAGC	TGTGGAGTTT	TGTCATGGCC	GTTTCTCGGT	
TACATGTGTT	TTTGTGACA					
gi 861009 emb Z34917.1 HVUNKNOWN						BlastN
Hordeum vulgare mRNA for bas1 protein						0.0
<b>&gt;HvD0195<sup>3</sup></b>						
CGCGGCCGCT	TGCTGGTAAG	CAGCTTGAGG	ATGGCCGCAC	TCTGGCGGAC	TACAACATCC	
AGAAGGAGTC	GACCTCCAC	TTGGTGCTCC	GCCTCCGTGG	TGGCCTGTAA	GTGCTTGGCC	
ATGGAGCTGC	TTATGTCTCT	GGGCTCACAA	TTTAGCTGTC	TTTGAATTAT	CGGCGTGTCC	
GTCATCTGGT	CTAGCGTTAT	GTTCTTCGTT	GCTACTGTGT	TGTGGTCTAG	CGTTATGTTT	
GTTTGTGTCC	CATGAATTTT	TGTGGTGCAG	CAGATTTGGA	TGAACGTGTT	AATGAATGAA	
TAAGTGAGCC	CTAAACTTGT	CTCCAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAGCGGCC	GCGAATTCGC	
GGCCGCTGCC	GTTTCGCACAT	ATCGTAAAAA	GGCATTTACA	TGACAGCTCC	ACCGTGTGTT	
CA						
gi 21815 emb X56803.1 TAMRNAU						BlastN
T.aestivum L. mRNA for ubiquitin						1e-43
<b>&gt;Hv53MK<sup>3</sup></b>						
CGCTTGTACT	TCTGTAGCCT	CTGTCCATGG	TATGAGGATT	TTTTGTCTTT	TTTGTCTTCT	
CGCGAGAtGG	TGTATGAGTC	TTTAATATTA	GTTTTGTAGT	GCGTTGGCCT	TGATGTAAAA	
TGAAATGTAT	TGCGCACTGT	ATTCGTTTTT	TGAATAAGAA	ATAAATTGCC	GTTAAGTGAA	
AAAAAAAAAA	AAAA					
gi 38174822 emb AJ495777.1 HVU495777						BlastN
Hordeum vulgare partial mRNA for EPSP-synthase, 3' UTR						4e-63

<b>&gt;GAN04K21</b>						
TAAATNTATT	ACAGAGGCCA	TACTTTATCC	TATGTACGAT	GGCAATTCAA	CACTAGTAAG	
GTATAATGGT	AATAACTTTC	TTCTCTCTTA	CAACCCTTGC	ATTCAGGTAC	CAGCACAAGC	
TAGGAAAAC	GTAGTGAAAT	TCAGCTGACA	TCCACCATTA	TTCAGGCAGC	GCTCTCGACT	
ATAACATTGC	TGCTTGTGTG	CTTTTTTGCA	GGTCAGGTCA	CCAGGCTTGT	TCATCCGTAG	
CAGTGGATGG	GGTCGCTGCA	TCCCTTCTCC	GTGGACTGTT	TGAAGCCAAA	GCGACCGCCA	
GCGGCCGTTA	CCAAAGTTGG	CTCGGTATGT	CCAATCATT	GCCAGCCAGA	TTTCCGTAGT	
ACAAATCCTG	CCAACAGTAG	ATACACATGA	CAAATGCTAA	GTTTGTGTCC	CTCTTACCAA	
ATCTCGGGC	ATGCAGGTCT	GAAAGCCTCA	TTCATAACC	GAATACACCG	TGCCATTCTT	
GATGGTTCTC	ACCACCATTT	CCTCGAACCC	TAACAAACCT	TATGTTTCTT	CTCACCGGTC	
CCCTCGCCGC	CCTCACCTTT	CGTAATTGTA	CATCCTTTCT	TTTTTCTTCC	ATTCTAGCAC	
CCATCCCTAT	TCGTCTTGTT	CTCATCCGGA	CGATCATTCA	TCCACTCTTT	CATTCATTCT	
TTTTTTTTCT	TCATTCTCGT	ATATTTTTCTC	CCCCCTCTCAC	TTTGCCCCCA	TTTGTFTTGA	
TCTTAGTCGG	CAATCAGCGC	CCGTCTTTCA	CCCCACTGCC	TTACTTTTTTC	TCTATGTACC	
CCCCCACCT	CATTATTTTT	CTCTCTCCGC	CCGTCCATCT	CACCGCACCA	CATACAGATC	
TTGTGCCATT	NTTTTTCTCC	CACGCATCTC	GTAGAAACGT	TCCTCCGTAT	ATTATCTCCC	
gi 12230349 sp Q9SEC2 MSRA_LACSA						
Peptide methionine sulfoxide reductase (Protein-methionine-S-oxide reductase) (Peptide Met(O) reductase)						BlastX 6e-05
<b>&gt;GAN04K22</b>						
TCATGTTATC	GCTTCGTGCG	TGACGTAAGC	ACTTTTGTFTT	TTACACCAA	CACGTGCGCA	
TATAAATCAT	ACCACTACGT	ATGTGGAGAG	CATGGATTAA	ACTGTTTCCT	CCTTACTAGT	
ACGTCATTTT	TGTTTACATC	AAACACGTCC	GTTCTCTCTT	TGCCGAATGC	ACTACTCATT	
ATTAGTCTAT	CATCATGCAC	ATGCACATGC	ACGTACCTGT	TTTTCTACAT	GCATGACGAT	
ACGAGCCAAA	ACAACGGACT	GGTGTCTGGT	GTTATATATC	GTCCACGGTG	CATATACTGC	
ATCTTAGCAT	CTATACATAC	TAGTATCAGA	GATTTCGTACG	TAGGAGCATT	TGTTCCGGCAC	
GTGTGTGATA	TATGTGGTTG	CTTAATTGGT	CAACCACGTA	GTACTIONTATTA	CATGCGTATA	
TATTGGTAAT	GGCAGGCCAC	GGGGAAAGAT	GCGTCACGTC	GGGCAGC		
barley TC141424						TIGR
similar to UP HSP1_ORNAN (P35307) Sperm protamine P1, partial (50%)						0.0
<b>&gt;GAN04K24</b>						
TCCGGCGGCA	AGGCAGGGTG	CTCTGGATCT	GCCCAGCCTG	CAGCTCCCGG	CGGCGAGCAG	
CCACGGAGTG	TTCGACTGGC	TAAATGACCC	GTTCTCTGACG	CGGCTGCGCA	GCCCGTGGCA	
GGACCAGCAT	TCCATGTCCC	CTTACTCCCG	TCTGCTATAC	TAACCACAAG	CAAGTCGTGC	
AAAAACAAG	TGTGCAAGTG	CAAAAGTTGA	AGCAGAATAG	ATGGTTAGCT	GCAAGTTAAT	
TCAGTTGTGC	ATAGAATACT	ACGGAGCAAT	GCTACATGTA	CAAAGAGTTA	CCCTGCATGT	
ACAAAGAGTC	ACGTTCAAAT	TAGCAAGTTG	ACAAATTATG	CTATAAAGGA	GGGGCTCACG	
CTCACCTCAT	TGAAATAGGG	GAGAGAGAGT	TAGTTAGTTA	CTACCTTTCGT	CCTAGTTTAC	
TAGTTCTCAT	TGTAGTTAGG	GTTAAACTTT	CGATTTTTTTT	TCAAAAATAC	GACAGCGGCC	
GCTAGAACTC	GTGGGGGACA	ACATGGGGCG	ACAAAGGCTA	CATACTAATG	AAGAGGGGAA	
CAAAGCATT	ATCAGGGCAG	TGTGGCATTG	CAACACGCCC	AGTCTTTCCT	CTTATGAAAG	
GTGGTAGATC	GACTGATTAA	AGCTCACTTG	CTTTAAATCT	AGAATTCCAG	ATCCATCCAT	
TNTAATTTGT	CAAAGTTTGT	AATATTGGCC	AGCACGTGCA	GTGTGCCTAC	GTATGTTGCA	
TGCGCTACTA	TAGGTCTACG	TATGTAATCC	ATCTTGAAAT	AAGCTTTCCN	CCCCGGGGCC	
CGCCAGGTGG	ATGGATATCT	GCAGAATTCA	GGCCTGAATT	T		
gi 10241433 emb CAC09354.1						BlastX
putative oryzain alpha precursor [Oryza sativa (indica cultivar-Group)]						2e-07
barley TC137828						TIGR
similar to UP CAP_YEAST (P17555) Adenylyl cyclase-associated protein (CAP), partial (3%)						4.1e-06

<b>&gt;GAN04M17</b>						
TGGCGAAGGT	CTGGAGGACA	CGGAGAAGCT	CTTCGGTGGT	ACTGGCGATG	CCGTGGAGAA	
GGAAGATGAG	CATGGGCATG	CCAAGTCCAC	GCAGTTGACT	ACTCGGTAGT	GAGTCAACAC	
TGTATGTGGT	ATACTGTTAG	CGGTCGTCCA	AAAGTAAAAG	ATTCAATAAC	TCGCTGAATA	
TTCTACTTGG	TGAGTTTGGG	TTTTGCCGGT	CAGATTTGTA	GACATACATG	GATGCGCCTA	
TCGTACGATC	AAAGCAACAA	GCCAACAAC	ACATAACCAGC	TAAATTTGAT	CTTCTGTAAC	
TTTTTTGAATA	CTTCCACTAC	TTGTGATTCG	GATCCTGAAT	GTCAGATTCC	TAGAAGGACC	
CTGATAAGTG	ACGAAAAGTCA	ATGTTAGTTA	CAAGCACATG	GCAAGATGAC	TAGTTATGTA	
AAGATGGTAA	CTTTAGTGGA	CAAGCATGAT	AATATTTGTA	CTTTAGTTTA	TTTTTGACAA	
AAATGTGTCT	TGTATTATTA	GCGGCCGCTC	CATGAAATAC	ATAAGGTTGG	CAACTGGTTA	
ACGATATAAC	AGACAATGGT	TCAACATATC	ACATTCATTG	GTTATG		
barley TC134913						TIGR
weakly similar to (Q84KI7) Sorbitol transporter, partial (35%)						2.4e-101
<b>&gt;Hv0005EX</b>						
GAATTCCCCA	TCTCGCGTCG	CGGCGTCAGT	TCCACTCCTT	CGCCATGGGC	AAGATTAAGA	
TCGGAATCAA	CGGTTTCGGA	AGGATCGGGA	GGCTCGTCGC	CAGGGTCGCA	CTCCAGAGCG	
ACGATGTGCGA	GCTCGTCGCC	GTCAACGACC	CCTTCATCAC	CACCGAGTAC	ATGACGTACA	
TGTTCAAGTA	CGACACAGTT	CACGGCCATT	GGAAGCACAG	TGACATCAAG	CTCAAAGACG	
ACAAGACGCT	GCTCTTCGGC	GAGAAGCCAG	TTACTGTCTT	TGGCGTCAGG	AACCTGAGG	
AGATCCCGTG	GGGTGAGGCT	GGTGCTGATT	ACGTTGTGGA	ATCCACCGGT	GTCTTCACTG	
ACAAGGACAA	GGCCGCTGCT	CACTTGAAGG	GTGGTGCCAA	GAAGGTGGTC	ATCTCTGCCC	
CAAGCAAAGA	TGCCCTATG	TTTGTGGTTG	GTGTCAATGA	GGACAAGTAC	ACCTCGGATG	
TTAACATTGT	CTCAAATGCT	AGCTGCACCA	CTAACTGCCT	TGCTCCCCTA	GCTAAGGTCA	
TTAATGACAA	CTTTGGTATT	ATTGAGGGTC	TGATGACCAC	TGTTTCATGCC	ATCACTGCCA	
CACAGAAGAC	CGTTGATGGT	CCCTCAAGCA	AGGACTGGAG	AGGTGGCAGG	GCCGCAAGCT	
TTAACATCAT	CCCCAGCAGC	ACTGGTGCTG	CCAAGGCTGT	TGGTAAGGTT	CTTCCTGAGC	
TGAATGGCAA	GCTTACCGGT	ATGTCTTTCC	GGGTTCCCAC	TGTGGATGTG	TCAGTTGTTG	
ATCTCACTGT	TAGAACCGAG	AAGGCTGCAT	CATATGATGA	CATCAAGAAG	GCTATCAAGG	
CTGCTTCCGA	GGGAAAGCTC	AAGGGTATCA	TGGGTTACGT	TGAGGAAGAT	TTGGTCTCCA	
CCGACTTCGT	TGGTGACAGC	AGGTCCAGCA	TCTTTGATGC	TAAGGCTGGA	ATTGCTCTGA	
ACGACCATTT	CGTCAAGCTT	GTCTCGTGGT	ATGACAACGA	GTGGGGTTAC	AGCAACCGTG	
TTGTCGACCT	GATCCGCCAC	ATGGCCAAGA	CCCAGTAGAG	CGTTCCTGCTT	TCCTTGTGGC	
GCCTGGTCAG	AGGTGCCCCCT	TTGTCTATGG	GAATAAATGT	GGATGGTGTG	GCTAGACGCC	
TGGTTCATGT	TAGTTGGACA	TGAGTTACCA	TCTGTTTTTC	CGCACCGAGT	TGCTAGTCAA	
GTAATCTTGA	TTTATGTAAA	TCGTTTCAGTC	CATTTACAAC	TTCTGTTTGC	CTGAGTAAGT	
GTTTGTATGT	TACAGCCTGA	GTAAGTGTTT	GATGTTTACA	ACTTCTGTCT	TGCTTTTGGT	
TTGTTTGAGA	TTGTCGTTAG	TTCAGATGTT	AAAAAAAAAA	AAAAA		
gi 18977 emb X60343.1 HVGADPH						BlastN
<i>H. vulgare</i> GADPH mRNA for glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase						0.0

\* Die Sequenzen der Klone wurden im Rahmen dieser Arbeit sequenziert und entsprechen deshalb nicht immer der in der Gabi PD Datenbank veröffentlichten Sequenz.

**Tabelle 8.5: Expressionsdaten der *Dotblot* Analysen mit BTH.**

Spot labels	WP						BTH						Verhältnis	
	1			2			1			2			induziert	reprimiert
	Signalstärke	Replikat	Mittelwert	BTH/WP	WP/BTH									
<b>A - 01</b>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,14	0,12	0,09	0,04	0,05	0,09	2,89	0,35
<b>A - 02</b>	0,12	0,11	0,14	0,17	0,14	0,14	0,42	0,35	0,25	0,22	0,00	0,25	1,84	0,54
<b>A - 03</b>	0,06	0,07	0,06	0,06	0,05	0,06	0,10	0,12	0,11	0,09	0,11	0,11	1,76	0,57
<b>A - 04</b>	0,05	0,17	0,08	0,04	0,06	0,08	0,13	0,12	0,12	0,11	0,11	0,12	1,47	0,68
<b>A - 05</b>	0,02	0,04	0,03	0,04	0,02	0,03	0,09	0,11	0,10	0,09	0,10	0,10	3,25	0,31
<b>A - 06</b>	0,03	0,03	0,03	0,04	0,02	0,03	0,11	0,12	0,14	0,17	0,15	0,14	4,58	0,22
<b>B - 01</b>	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,19	0,13	0,13	0,10	0,10	0,13	2,73	0,37
<b>B - 02</b>	0,08	0,09	0,07	0,07	0,05	0,07	0,16	0,15	0,14	0,11	0,16	0,14	1,99	0,50
<b>B - 03</b>	0,13	0,15	0,13	0,11	0,11	0,13	0,22	0,20	0,19	0,16	0,20	0,19	1,55	0,65
<b>B - 04</b>	67,81	96,15	66,74	47,97	47,97	69,67	26,64	11,78	16,24	5,47	21,08	16,24	0,23	4,29
<b>B - 05</b>	0,11	0,14	0,15	0,15	0,15	0,14	0,21	0,23	0,25	0,22	0,32	0,25	1,78	0,56
<b>B - 06</b>	0,26	0,26	0,26	0,26	0,22	0,25	0,32	0,36	0,54	1,03	0,45	0,54	2,16	0,46
<b>C - 01</b>	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,21	0,12	0,13	0,10	0,09	0,13	1,79	0,56
<b>C - 02</b>	0,10	0,09	0,10	0,11	0,10	0,10	0,27	0,16	0,18	0,15	0,14	0,18	1,79	0,56
<b>C - 3</b>	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,15	0,12	0,12	0,08	0,13	0,12	2,24	0,45
<b>C - 4</b>	0,08	0,09	0,08	0,06	0,09	0,08	0,18	0,16	0,16	0,11	0,17	0,16	1,95	0,51
<b>C - 5</b>	2,36	1,57	0,89	0,89	0,92	1,44	1,50	0,78	2,16	2,71	3,65	2,16	1,51	0,66
<b>C - 6</b>	0,16	0,18	0,12	0,12	0,16	0,16	0,48	0,81	1,02	1,56	1,23	1,02	6,58	0,15
<b>D - 1</b>	0,10	0,13	0,10	0,10	0,12	0,11	1,89	0,67	0,88	0,41	0,54	0,88	7,80	0,13
<b>D - 2</b>	0,18	0,07	0,31	0,31	0,40	0,24	2,65	0,93	1,27	0,66	0,84	1,27	5,29	0,19
<b>D - 3</b>	0,22	0,35	0,28	0,28	0,36	0,30	0,57	0,35	0,51	0,42	0,70	0,51	1,69	0,59
<b>D - 4</b>	0,07	0,08	0,09	0,09	0,13	0,09	0,35	0,25	0,21	0,12	0,14	0,21	2,31	0,43
<b>D - 5</b>	0,14	0,18	0,14	0,14	0,16	0,16	0,54	0,57	0,57	0,59	0,58	0,57	3,68	0,27
<b>D - 6</b>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,09	0,07	0,12	0,15	0,15	0,17	0,16	0,15	2,22	0,45
<b>E - 1</b>	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,27	0,12	0,16	0,12	0,12	0,16	2,51	0,40

Spot labels	WP						BTH						Verhältnis	
	1			2			1			2			induziert BTH/WP	reprimiert WP/BTH
	Signalstärke	Replikat	Mittelwert											
<b>E - 02</b>	0,18	0,22	0,20	0,21	0,20	0,20	11,12	4,79	5,49	1,64	4,42	5,49	27,12	0,04
<b>E - 03</b>	6,76	22,68	12,76	6,03	15,55	12,76	87,10	19,17	67,48	52,52	111,14	67,48	5,29	0,19
<b>E - 04</b>	0,12	0,15	0,17	0,17	0,22	0,17	0,24	0,23	0,24	0,22	0,29	0,24	1,47	0,68
<b>E - 05</b>	0,79	0,53	0,52	0,33	0,42	0,52	0,59	0,63	0,66	0,64	0,78	0,66	1,28	0,78
<b>E - 06</b>	3,40	13,10	5,02	0,87	2,69	5,02	2,13	3,04	4,02	4,64	6,29	4,02	0,80	1,25
<b>F - 01</b>	0,52	0,56	0,57	0,55	0,66	0,57	84,35	21,39	31,49	8,10	12,11	31,49	55,00	0,02
<b>F - 02</b>	0,19	0,24	0,25	0,30	0,28	0,25	117,43	34,34	41,63	6,26	8,50	41,63	164,88	0,01
<b>F - 03</b>	0,14	0,20	0,24	0,25	0,36	0,24	0,58	0,50	0,46	0,32	0,45	0,46	1,95	0,51
<b>F - 04</b>	0,14	0,18	0,17	0,12	0,22	0,17	0,21	0,23	0,24	0,26	0,28	0,24	1,48	0,67
<b>F - 05</b>	0,04	0,07	0,07	0,06	0,10	0,07	0,15	0,17	0,14	0,11	0,13	0,14	2,07	0,48
<b>F - 06</b>	2,24	6,03	3,39	1,51	3,79	3,39	2,13	1,69	2,04	2,53	1,82	2,04	0,60	1,66
<b>G - 01</b>	155,46	133,90	225,10	102,41	508,63	225,10	21005,56	21749,18	18695,07	13252,11	18773,45	18695,07	83,05	0,01
<b>G - 02</b>	0,16	0,15	0,20	0,23	0,24	0,20	36,76	32,22	22,03	7,60	11,56	22,03	113,00	0,01
<b>G - 03</b>	0,06	0,08	0,08	0,08	0,10	0,08	0,19	0,13	0,16	0,16	0,18	0,16	2,05	0,49
<b>G - 04</b>	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,14	0,20	0,15	0,13	0,13	0,15	2,09	0,48
<b>G - 05</b>	0,04	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,13	0,12	0,12	0,10	0,13	0,12	2,11	0,47
<b>G - 06</b>	0,23	0,31	0,27	0,25	0,29	0,27	0,67	0,60	0,51	0,43	0,36	0,51	1,90	0,53
<b>H - 01</b>	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,17	0,16	0,14	0,12	0,10	0,14	2,40	0,42
<b>H - 02</b>	0,08	0,05	0,06	0,04	0,05	0,06	0,16	0,15	0,14	0,12	0,13	0,14	2,55	0,39
<b>H - 03</b>	0,66	0,91	0,96	0,92	1,35	0,96	2,13	2,26	1,58	1,21	0,74	1,58	1,65	0,61
<b>H - 04</b>	2,37	5,60	3,11	1,91	2,55	3,11	8,79	13,48	6,77	3,64	1,16	6,77	2,18	0,46
<b>H - 05</b>	0,05	3,22	0,85	0,05	0,07	0,85	0,12	0,11	0,12	0,15	0,10	0,12	0,14	7,06
<b>H - 06</b>	0,95	3,75	1,65	0,70	1,21	1,65	1,16	1,77	0,94	0,39	0,44	0,94	0,57	1,76
<b>A - 01:2</b>	0,09	0,08	0,09	0,08	0,10	0,09	0,13	0,10	0,11	0,11	0,12	0,11	1,28	0,78
<b>B - 01:2</b>	0,21	0,22	0,23	0,23	0,26	0,23	0,47	0,46	0,42	0,41	0,35	0,42	1,84	0,54

Spot labels	WP				BTH				Verhältnis		
	1		2		1		2		induziert	reprimiert	
	Signalstärke	Replikation	Signalstärke	Replikation	Signalstärke	Replikation	Signalstärke	Replikation	BTH/WP	WP/BTH	
<b>C - 01:2</b>	0,26	0,24	0,28	0,25	0,26	0,43	0,43	0,38	0,36	1,55	0,64
<b>D - 01:2</b>	0,12	0,13	0,14	0,13	0,13	0,42	0,39	0,61	0,35	3,38	0,30
<b>E - 01:2</b>	0,09	0,10	0,17	0,11	0,12	18093,57	19744,49	11789,98	2529,56	110037,13	0,00
<b>F - 01:2</b>	0,06	0,04	0,05	0,04	0,05	0,81	1,38	2,33	0,55	26,23	0,04
<b>Mittel</b>	456,37	278,30	395,12	5,15		3,90	12,31	6,86	445,83		
<b>Median</b>	0,24	0,22	0,28	0,12		0,12	0,15	0,15	0,30		

**Tab 8.6: Expressionsdaten der BTH-Gene nach *Bgh*-Inokulation.**

spot labels	mock						<i>Bgh</i>						Verhältnis	
	1			2			1			2			induziert	reprimiert
	Signal	Replikat	Mittelwert	Signal	Replikat	Mittelwert	Signal	Replikat	Mittelwert	Signal	Replikat	Mittelwert	Bgh/ mock	mock/Bgh
<b>A - 01</b>	208,529	232,881	294,700	260,325	249,11	123,333	106,090	84,680	57,507	92,90	0,37	2,68		
<b>A - 02</b>	1399,649	1871,189	1631,453	1650,902	1638,30	869,599	697,354	734,011	750,878	762,96	0,47	2,15		
<b>A - 03</b>	312,290	356,911	321,385	306,928	324,38	124,489	89,538	173,502	222,235	152,44	0,47	2,13		
<b>A - 04</b>	282,429	255,154	88,110	99,784	181,37	73,773	67,621	106,523	117,994	91,48	0,50	1,98		
<b>A - 05</b>	183,170	182,983	114,454	128,110	152,18	51,746	41,266	51,817	58,371	50,80	0,33	3,00		
<b>A - 06</b>	298,912	329,647	153,175	139,784	230,38	72,858	56,254	62,222	144,346	83,92	0,36	2,75		
<b>B - 01</b>	389,575	533,531	190,406	110,851	306,09	68,775	72,011	66,555	50,680	64,51	0,21	4,75		
<b>B - 02</b>	472,051	439,494	589,968	647,332	537,21	372,950	351,450	371,450	428,707	381,14	0,71	1,41		
<b>B - 03</b>	763,074	782,140	2069,927	1961,393	1394,13	984,032	870,927	1916,059	1811,536	1395,64	1,00	1,00		
<b>B - 04</b>	6543,601	6376,445	9305,580	9126,034	7837,92	1920,356	1526,068	3909,095	4398,499	2938,50	0,37	2,67		
<b>B - 05</b>	885,404	1001,804	149,115	128,764	541,27	91,156	69,084	91,840	124,432	94,13	0,17	5,75		
<b>B - 06</b>	2637,260	2761,971	2175,473	2061,159	2408,97	1333,293	903,761	1290,283	1362,666	1222,50	0,51	1,97		
<b>C - 01</b>	489,329	572,492	295,885	198,692	389,10	120,830	235,102	134,392	129,044	154,84	0,40	2,51		
<b>C - 02</b>	712,890	754,938	2050,051	2046,557	1391,11	1010,484	1247,486	1758,570	1794,931	1452,87	1,04	0,96		
<b>C - 03</b>	399,282	563,115	79,374	116,776	289,64	65,581	86,880	320,874	334,998	202,08	0,70	1,43		
<b>C - 04</b>	560,059	492,470	85,961	89,668	307,04	80,212	103,459	162,945	129,064	118,92	0,39	2,58		
<b>C - 05</b>	4562,455	3755,989	346,719	358,856	2256,00	286,050	203,708	524,855	263,961	319,64	0,14	7,06		
<b>C - 06</b>	1925,894	1428,880	1483,760	1591,287	1607,46	1506,840	693,312	1264,298	757,839	1055,57	0,66	1,52		
<b>D - 01</b>	842,838	988,583	679,410	544,328	763,79	512,421	1105,697	612,646	902,876	783,41	1,03	0,97		
<b>D - 02</b>	4048,065	3884,911	3445,789	3765,151	3785,98	2462,724	3081,108	3588,586	3896,452	3257,22	0,86	1,16		
<b>D - 03</b>	1182,081	1677,499	6156,733	6450,867	3866,80	5312,706	5289,590	6952,168	5973,063	5881,88	1,52	0,66		
<b>D - 04</b>	690,737	643,501	55,017	77,841	366,77	84,366	39,255	109,706	85,511	79,71	0,22	4,60		
<b>D - 05</b>	1936,224	1678,508	747,254	1122,481	1371,12	1121,991	349,809	1454,009	569,214	873,76	0,64	1,57		
<b>D - 06</b>	670,460	388,528	686,605	821,294	641,72	500,396	368,085	651,221	372,198	472,98	0,74	1,36		
<b>E - 01</b>	775,177	771,124	124,970	107,754	444,76	119,640	308,518	151,118	299,357	219,66	0,49	2,02		

Spot labels	mock						Bgh						Verhältnis	
	1			2			1			2			induziert	reprimiert
	Signal	Replikat	Signal	Replikat	Mittelwert	Signal	Replikat	Mittelwert	Signal	Replikat	Mittelwert	Bgh/ mock	mock/Bgh	
<b>E - 02</b>	1351,748	1138,497	242,492	259,433	748,04	265,969	434,964	487,185	539,418	431,88	0,58	1,73		
<b>E - 03</b>	22555,219	23186,603	8308,755	10472,683	16130,82	6553,472	7620,973	9285,228	9151,995	8152,92	0,51	1,98		
<b>E - 04</b>	1067,590	1207,027	193,657	202,606	667,72	393,809	371,473	639,782	581,126	496,55	0,74	1,34		
<b>E - 05</b>	2752,267	2996,764	1148,480	1641,233	2134,69	959,058	636,458	1047,490	987,398	907,60	0,43	2,35		
<b>E - 06</b>	16244,191	18869,793	4933,078	7764,703	11952,94	4162,813	3367,259	5677,701	3210,799	4104,64	0,34	2,91		
<b>F - 01</b>	17498,305	16337,862	7056,398	7514,408	12101,74	4390,933	4397,430	5195,725	5571,612	4888,93	0,40	2,48		
<b>F - 02</b>	1736,798	1668,465	874,905	727,564	1251,93	652,605	657,668	1076,747	1178,047	891,27	0,71	1,40		
<b>F - 03</b>	1526,297	1833,153	1699,971	1712,564	1693,00	1042,555	1090,657	1646,581	1486,068	1316,47	0,78	1,29		
<b>F - 04</b>	1130,027	853,585	55,929	76,887	529,11	59,559	71,333	90,525	116,090	84,38	0,16	6,27		
<b>F - 05</b>	633,111	699,742	246,544	127,260	426,66	115,969	140,215	320,949	260,826	209,49	0,49	2,04		
<b>F - 06</b>	16834,937	21167,613	9696,797	13034,254	15183,40	5774,981	6112,638	9807,607	6008,536	6925,94	0,46	2,19		
<b>G - 01</b>	49313,406	54961,845	26564,491	27116,266	39489,00	24022,090	19737,969	20754,993	16307,598	20205,66	0,51	1,95		
<b>G - 02</b>	761,117	815,662	667,530	744,466	747,19	749,264	459,020	1162,473	725,137	773,97	1,04	0,97		
<b>G - 03</b>	478,030	451,883	89,071	118,618	284,40	90,840	70,327	229,789	155,170	136,53	0,48	2,08		
<b>G - 04</b>	566,557	509,749	55,558	49,701	295,39	49,341	34,570	104,683	92,680	70,32	0,24	4,20		
<b>G - 05</b>	414,327	423,484	54,891	51,413	236,03	50,222	40,780	79,006	41,627	52,91	0,22	4,46		
<b>G - 06</b>	2095,182	2281,942	1105,916	1068,445	1637,87	1282,882	1702,939	2060,354	1627,855	1668,51	1,02	0,98		
<b>H - 01</b>	567,111	581,222	221,990	219,274	397,40	146,158	126,016	147,419	76,233	123,96	0,31	3,21		
<b>H - 02</b>	403,040	456,143	142,190	157,312	289,67	96,468	50,481	114,597	64,730	81,57	0,28	3,55		
<b>H - 03</b>	7702,627	9024,918	7449,721	9591,347	8442,15	4973,657	4364,434	7058,427	4397,668	5198,55	0,62	1,62		
<b>H - 04</b>	2393,824	2592,606	1006,812	1091,673	1771,23	808,431	748,396	1570,691	1173,604	1075,28	0,61	1,65		
<b>H - 05</b>	427,676	548,311	82,176	90,404	287,14	66,357	58,380	112,955	64,076	75,44	0,26	3,81		
<b>H - 06</b>	12816,145	23973,700	9212,960	10777,033	14194,96	4067,264	4303,921	4140,580	2801,900	3828,42	0,27	3,71		
<b>A - 01:2</b>	412,209	385,695	214,353	197,799	302,51	549,364	725,088	983,007	1343,749	900,30	2,98	0,34		
<b>B - 01:2</b>	3262,816	3731,172	1993,459	1987,189	2743,66	1641,595	1870,872	2651,47	3415,302	2394,81	0,87	1,15		

Spot labels	mock				Bgh				Verhältnis	
	1		2		1		2		induziert	reprimiert
	Signal	Replikat	Signal	Replikat	Signal	Replikat	Signal	Replikat	Bgh/ mock	mock/Bgh
<b>C - 01:2</b>	3798,287	4285,665	2170,29	2361,474	1831,674	2143,858	2633,004	3816,88	0,83	1,21
<b>D - 01:2</b>	1636,649	1691,57	654,023	644,323	1133,469	1316,641	1183,793	2254,754	1,27	0,79
<b>E - 01:2</b>	379,213	320,676	250,551	283,629	561,433	1062,406	439,393	1145,949	2,60	0,38
<b>F - 01:2</b>	146,863	111,747	170,34	112,045	383,774	422,661	249,416	214,349	2,35	0,43
<b>Mittel</b>	4195,67	4720,90	2443,36	2740,06	1767,31	1688,44	2214,21	1927,00		
<b>Median</b>	1098,81	1070,15	673,47	687,45	607,02	647,06	1015,25	830,36		

Tab 8.7: Expressionsdaten der Dotplot-Analysen nach MeJA-Behandlung.

Spot labels	mock						MeJA						Verhältnis	
	1			2			1			2			induziert	reprimiert
	Signalstärke	Replikat	Mittelwert	Signalstärke	Replikat	Mittelwert	Signalstärke	Replikat	Mittelwert	Signalstärke	Replikat	Mittelwert	MeJA/mock	mock/MeJA
<b>A - 1</b>	0,686	0,726	0,91	1,04	1,194	0,91	0,533	0,66	0,48	0,496	0,54	0,6	0,6	1,7
<b>A - 2</b>	3,679	2,475	7,44	10,8	12,813	7,44	1,049	1,086	0,928	0,948	1,00	0,1	0,1	7,4
<b>A - 3</b>	1,026	0	1,71	2,495	3,303	1,71	0,952	0,809	0,753	0,641	0,79	0,5	0,5	2,2
<b>A - 4</b>	0,886	0	0,80	1,166	1,166	0,80	31615,552	25353,987	31615,552	31616,891	30050,50	37353,0	37353,0	0,0
<b>A - 5</b>	0,741	0	0,60	0,854	0,807	0,60	0,575	0,6	0,74	0,788	0,68	1,1	1,1	0,9
<b>A - 6</b>	0,931	0	0,79	1,198	1,021	0,79	0,768	0,642	0,83	0,539	0,69	0,9	0,9	1,1
<b>B - 1</b>	0,612	0,562	0,99	1,946	0,824	0,99	0,599	0	0,557	0,436	0,40	0,4	0,4	2,5
<b>B - 2</b>	0,898	0,985	1,85	3,126	2,372	1,85	0,889	0	0,881	0,781	0,64	0,3	0,3	2,9
<b>B - 3</b>	5,174	1,992	445,78	1121,65	654,31	445,78	1,926	1,509	1,434	1,468	1,58	0,0	0,0	281,4
<b>B - 4</b>	28322,149	29414,307	29442,42	29864,552	30168,663	29442,42	19,626	8,335	13,852	8,9	12,68	0,0	0,0	2322,3
<b>B - 5</b>	5,273	10	13,13	21,036	16,202	13,13	1,495	0,385	1,364	1,184	1,11	0,1	0,1	11,9
<b>B - 6</b>	42,189	44,886	47,15	78,636	22,903	47,15	5,666	5,747	2,263	2,5	4,04	0,1	0,1	11,7
<b>C - 1</b>	0,685	0,625	0,60	1,095	0	0,60	0,56	0,627	0,647	0,411	0,56	0,9	0,9	1,1
<b>C - 2</b>	1,072	0,94	1,56	1,634	2,579	1,56	0,839	0,851	0,841	0,651	0,80	0,5	0,5	2,0
<b>C - 3</b>	0,713	0,669	0,91	1,05	1,227	0,91	0,698	0,744	0,656	0,53	0,66	0,7	0,7	1,4
<b>C - 4</b>	1,058	0	0,90	1,26	1,268	0,90	0,835	0,752	0,78	0,823	0,80	0,9	0,9	1,1
<b>C - 5</b>	31565,839	31572,722	19193,94	8929,869	4707,346	19193,94	1765,016	7552,834	37,003	557,667	2478,13	0,1	0,1	7,7
<b>C - 6</b>	0,739	0	0,73	1,13	1,043	0,73	0,685	0	0,474	0,768	0,48	0,7	0,7	1,5
<b>D - 1</b>	73,964	7,368	32,16	9,659	37,641	32,16	176,85	341,564	3241,815	8436,718	3049,24	94,8	94,8	0,0
<b>D - 2</b>	2,6	2,278	3,48	2,98	6,065	3,48	1,063	1,119	1,166	1,001	1,09	0,3	0,3	3,2
<b>D - 3</b>	27303,042	20883,846	26279,36	27903,675	29026,879	26279,36	102,622	56,52	627,183	2084,978	717,83	0,0	0,0	36,6
<b>D - 4</b>	0,898	0,803	0,83	0,8	0,832	0,83	0,746	0,629	0,791	0,867	0,76	0,9	0,9	1,1
<b>D - 5</b>	0,847	0	0,72	1,064	0,978	0,72	0,614	0,655	0,571	0,62	0,62	0,9	0,9	1,2
<b>D - 6</b>	0,694	0,9	0,82	0,934	0,763	0,82	0,542	0,71	0,637	0,467	0,59	0,7	0,7	1,4
<b>E - 1</b>	0,69	0,906	0,80	0,806	0,797	0,80	0,442	0,448	0,753	0,659	0,58	0,7	0,7	1,4

Spot labels	mock				t	MeJA				Verhältnis		
	1		2			1		2		induziert MeJA/mock	reprimiert mock/MeJA	
	Signalstärke	Replikat	Signalstärke	Replikat		Signalstärke	Replikat	Signalstärke	Replikat			
<b>E-2</b>	0,899	0,768	0,901	0,951	0,88	0,759	0,871	1,001	1,05	0,92	1,0	1,0
<b>E-3</b>	27679,045	28194,547	29588,659	31022,008	29121,06	13937,55	3507,178	23207,641	21520,306	15543,17	0,5	1,9
<b>E-4</b>	3,729	1,909	3,207	2,504	2,84	2,084	1,43	1,463	2,046	1,76	0,6	1,6
<b>E-5</b>	95,444	2,468	9,685	11,424	29,76	4,957	3,993	8,217	7,07	6,06	0,2	4,9
<b>E-6</b>	14757,968	963,309	28303,733	26209,625	17558,66	6730,512	128,081	28472,541	29164,26	16123,85	0,9	1,1
<b>F-1</b>	100	225,007	182,028	165,708	168,19	1,352	2,851	9,347	5,45	4,75	0,0	35,4
<b>F-2</b>	0,66	0,432	0,528	0,466	0,52	0,431	0,591	0,412	0,57	0,50	1,0	1,0
<b>F-3</b>	4,915	1,915	7,204	6,974	5,25	1,606	2,081	3,531	7,162	3,60	0,7	1,5
<b>F-4</b>	6,491	3,915	1,398	1,456	3,32	1,305	1,366	1,221	2,031	1,48	0,4	2,2
<b>F-5</b>	0,886	0,713	0,831	0,875	0,83	0,588	0,571	0,706	0,944	0,70	0,8	1,2
<b>F-6</b>	462,039	1697,054	22,127	26,58	551,95	7,843	5,795	6,259	39,08	14,74	0,0	37,4
<b>G-1</b>	23485,502	2027,155	28421,422	30425,364	21089,86	19,08	66,897	10175,021	1453,861	2928,71	0,1	7,2
<b>G-2</b>	0	0,609	1,483	1,22	0,83	0,901	0,964	1,745	1,576	1,30	1,6	0,6
<b>G-3</b>	0,258	0,899	1,27	1,16	0,90	0,53	0,547	0,774	0,971	0,71	0,8	1,3
<b>G-4</b>	0	0,77	0,888	0,839	0,62	0,69	0,563	0,427	0,794	0,62	1,0	1,0
<b>G-5</b>	1	0,893	0,941	0,776	0,90	0,608	0,495	0,501	0,814	0,60	0,7	1,5
<b>G-6</b>	28037,372	31011,151	19429,16	3522,918	20500,15	22654,313	22908,085	5893,466	26020,911	19369,19	0,9	1,1
<b>H-1</b>	1,041	0,759	1,092	1,537	1,11	0,434	0,473	0,728	0,711	0,59	0,5	1,9
<b>H-2</b>	0	0,806	1,361	1,329	0,87	0,465	0,483	0,656	0,652	0,56	0,6	1,5
<b>H-3</b>	609,341	39,612	13024,336	8941,185	5653,62	1,388	1,212	3,324	6,239	3,04	0,0	1859,3
<b>H-4</b>	583,21	97,295	731,17	222,635	408,58	6,693	3,455	3,503	10,523	6,04	0,0	67,6
<b>H-5</b>	1,271	1,021	3,29	2,731	2,08	1,458	1,567	1,778	2,931	1,93	0,9	1,1
<b>H-6</b>	8,23	17540,44	14712,742	7912,313	10043,43	3,644	5,909	574,888	9993,222	2644,42	0,3	3,8
<b>A-01:2</b>	3,458	4,235	2,035	2,168	2,97	0,874	0,968	0,897	1,254	1,00	0,3	3,0
<b>B-01:2</b>	0,335	0,512	0,247	0,145	0,31	0,158	0,137	0,1245	0,269	0,17	0,6	1,8

Spot labels	mock				t	MeJA				Verhältnis		
	1		2			1		2		induziert	reprimiert	
	Signalsärke	Replikatk	Signalsärke	Replikatk		Signalsärke	Replikatk	Signalsärke	Replikatk	MeJA/mock	mock/MeJA	
<b>C - 01:2</b>	43,247	40,489	39,847	40,689	41,07	40,294	43,658	40,678	38,763	40,85	1,0	1,0
<b>D - 01:2</b>	0,873	0,765	1,187	0,874	0,92	1,057	1,107	1,182	0,850	1,05	1,1	0,9
<b>E - 01:2</b>	0,412	0,378	0,412	0,498	0,43	0,547	0,438	0,861	0,524	0,59	1,4	0,7
<b>F - 01:2</b>	0,245	0,268	0,227	0,432	0,29	0,147	0,102	0,135	0,168	0,14	0,5	2,1
<b>Mittel</b>	3393,05	3033,46	3749,22	3207,41		1428,21	1111,54	1925,30	2426,05			
<b>Median</b>	1,05	0,92	1,79	1,85		0,93	0,92	0,96	0,99			

**Tabelle 8.8: Sequenzen von weiteren in dieser Arbeit untersuchten Genen.***Bci2* -ORF-

Acc. num. AJ508712

**ATGGCAACCA** ACAAGAgTAT TAAGAGCGTG GTTATTTGTG TTCTCATATT GGGTTTAgTT  
 CTGGAGCAGG TCCAAGTAGA AGGCAAGAGT TGCTGCaAGA aCACGACGGG CAGAAACTGC  
 TACAACGCCT GCCATTTTCGC CGGTGGTTCC CGACCAGTCT GCGCAACTGC TTGTGGTTGT  
 AAAATCATAA GCGGCCCAAC ATGTCCTAGG GACTATCCTA AGCTGAATCT TCTCCCTGAA  
 TCCGGTGAAAC CAAATGCGAC TGAGTACTGC ACAATTGGAT GCAGGACTTC CGTCTGTGAC  
 AACATGGACA ATGTTTCCCG TGGCCAAGAG ATGAAATTCG ACATGGGACT CTGCAGCAAC  
 GCATGTGCCG GTTTCTGTAA TGATGGTGAT GTCATTCAGT CTGTTGAAGC **CTAA**

*Bci9* -ORF-

ACTCGCATTG GCCACCCACC AGACCACACC CCACCAGCTC **GCCATGGCTC** ATGGCTTGGG  
 CATCCTCCTC CTCCTCCTGG CCTCCTCGTT CGCCGGCTCC GCCTTCGCCG CCGATGCGAC  
 GGTGCTCAGC CGGAAGGCCG GTGCTGGCGC CATTGCCGGG GAGGATCCCG AGCTGAAGGC  
 GGCGCCGGGG AAGTACGCGG TGATCTTCGA CGCCGGAAGC ACGGGCACGC GCGTGCACGT  
 CTTCCGGTTC GACAAGAAGA TGGAGCTCGT CGACGTCGGC GACGACATCG AGGTCTTCGC  
 CAAGGTGGAG CCGGGGCTGA GCTCGTACGC CGGACGGCCG CAGGAGGCCG CCAAGTCCAT  
 CACACCCCTG CTGGAGAAGG CTAAGAGCGC CGTGCCTCGC TGGCTCATGA AGAAAACACC  
 CGTTAAACTA GGGGCGACGG CTGGACTCAG ACTTATCGGA GATGACAAGG CAGAGCAAAT  
 TCTTGAAAGCA GTGAGGGATG CCGTCCACAG CAAGACCAAA TTCCAGTACA ATCCCAGTTG  
 GATCAATGTT CTCAAGGGGT CTCAGGAAGG ATCTTACCTA TGGGTTGCTC TGAATTACCT  
 GCTGGGTAAG CTGGGAGGAG ACTACTCCAA GACGGTGGCA GTGATCGACC TTGGAGGTGG  
 GTCCGTGCAG ATGGCATATG CCATCTCAGC GAACGCCGCA GCTGCCGCTC CCACGGTGCC  
 TCAAAGGGAG GACCCATACG TCACCAAAGA GTACCTCAA GGAAGAGATT ACAACGTCTA  
 CGTTCACAGC TACTTGCCT ACTGGCGCAC GGTTCGAAG GTAGAGATCT TCAAGGCCAA  
 AAACGGACCA GTCAGCTACT GCGTGCTGCG CGGATACGAT GGCAAATACA CCTACAACGG  
 GGAGCAATAC GACGCCATAG CAGCACCGCA AGGAGCGGCG TACGAAAAGT GCAGAGAGGA  
 CGTGACCAGG GCGCTGAGAA TCAGCGCGCC ATGCGCGGCC AAGAAGTGA CCTTCAACGG  
 CGCGTGGAAC GGCGGCGGCG GCCCCGGCCA GGCCGAGCTC TACGTCACCT CCAGCTTCTA  
 CTACATGGCA GCAGACGTCG GCCTGATCGA CAGCGAGGCG AGCAGCGGGA AGACCACGCC  
 GGCGGCGTTC AGGGCCGCCG CCGAGGAGAT CTGCCCGATG AGCTTCCTGG AGGCCAAGGC  
 CGCGTACCCC AAGGTGCGGT CCGTGGACGC GCCCTACATC TGCATGGACC TTGTCTACCA  
 GTACTCCCTG CTCGTGGACG GGTTCGGCTT GGAGCCGACC AAGGAGATCA CCGTGGCGCA  
 GAAGGTGAAG CACGGGGAGT ACTTCATCGA GGCCGCGTGG CCGCTCGGGG AGGCCATCGA  
 GGCCGTCTCG CCCACCAAGC GGCTCAACGA TGCATGATCT TGTACGTACA GTATTGGTTG  
 ATATGATTGC TAATCCGGCC CTAGCTCGCG CAG**TAAGGGC** ATCTCCAAAT CCCGCGGCCA  
 TGG

*HvEds5* -teilweise-

GTGCACTGTT TGGGGTGAGC CCCTGTCACA AACTGCACAG TCCTTTATGC CGGAGATGAT  
 ATACGGAGCT AACCgCAAT TGATGAAGGC AAGATGCTGC TCAAGTCACT CGTAATTATT  
 GGAGCTATAG CTGGACTGAC TGTAGGGAAC GGCTGGAACG ATTGTTCCMT GGCTTTTTCC  
 YAGGTATGTT TACCAATGAT CMAATGGTTG TACAACAGAT GCACAAAGTG CBKGATTYCC  
 ATATTTCACT GCATTGTTCG TGACACCTTC AGTACACAGC CTCGAAGGAG CATTACTGGC  
 TGAAGAGAT CTC

Fett gezeichnet sind die Start- bzw. Stoppcodons.



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit diese Arbeit im Rahmen der SAR-Forschergruppe (FOR 343) am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Aart J. E. van Bel danke ich für die Betreuung als Professor aus dem fachlich zuständigen Fachbereich und für sein stets großes Interesse bezüglich des Fortgangs meiner Arbeit.

Bei Herrn Dr. Gregor Langen möchte ich mich für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und die ständige Versorgung mit neuem Wissen bedanken.

Danken möchte ich auch Dr. Fredi Altpeter und seiner Arbeitsgruppe am IPK Gatersleben für die Generierung der transgenen Pflanzen und Prof. Dr. Uwe Sonnewald mit seiner Arbeitsgruppe, die ebenfalls am IPK Gatersleben tätig war, für Herstellung der GAN-Filter.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Phytopathologie und Angewandte Zoologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die tolle Arbeitsatmosphäre. Bei Martina Claar möchte ich mich für tatkräftige Unterstützung bei vielen Versuchen bedanken. Dr. Patrick Schäfer danke ich für seine Mitarbeit bei der Herstellung der GAN-Filter und seine Einweisung in die Methode. Besonderer Dank geht an Sibylle von Rüden und Dr. Holger Schultheiß für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung und ihr Interesse während meines Studiums und meiner Promotion.