

Lisa Silke Greiderer, BSc

Molekularbiologische Charakterisierung transgener Gerste- und  
Weizenlinien mit einer Überexpression der  
Callosesynthase AtGSL05 und deren Auswirkungen auf eine  
Infektion mit *Fusarium graminearum*

**MASTERARBEIT**

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

Masterstudium Pflanzenwissenschaften

eingereicht an der

**Technischen Universität Graz**

Betreuerin und Betreuer

Ao. Univ.-Prof. Dr.phil., Maria Müller

Institut für Pflanzenwissenschaften, Graz

Prof. Dr. Christian A. Voigt

Molekulare Phytopathologie, Hamburg

Graz, April 2016

## EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

---

Datum

---

Unterschrift

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich von Herzen bei Ao. Univ. Prof. Dr. phil., Frau Maria Müller der Karl-Franzens-Universität Graz und Prof. Dr. Christian A. Voigt der Universität Hamburg für die herzliche Betreuung und kompetente Unterstützung während meiner Masterarbeit bedanken, insbesondere für die Ermöglichung diese Arbeit grenzüberschreitend und in Kooperation mit der „Molekularen Phytopathologie Hamburg“ verfassen zu dürfen.

Dabei gebührt auch großer Dank den Mitgliedern der Arbeitsgruppe AMP III, besonders Annemarie und Tobias, für die Einschulung, die Betreuung und den Spaß im Labor.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern Helga und Sigurd Greiderer, unter anderem für die Möglichkeit zu studieren, nachzudenken und zu lernen und meiner Schwester Karen Rike, die mir trotz der geographischen Distanz immer nah geblieben ist.

Ich freue mich, mich auf diesem Weg bei all meinen global verstreuten Freunden und treuen Wegbegleitern bedanken zu können – für die Freundschaft, die Inspiration und das gemeinsame Lachen! Danke an Graz, mit all den lieben Menschen, die mich durchs Leben begleiten! Danke an das Lusitanogestüt Coudelaria Quinta do Sol für den wunderbaren Ausgleich! Abschließend ein herzliches Dankeschön an das Wohnheim Grandweg 16 – ihr habt meine Aufenthalts- und Masterarbeitszeit in Hamburg zu einem einzigartigen Kapitel meines Lebens gemacht!

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>6</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>7</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>9</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>11</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>12</b>
<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>13</b>
DIE KULTURGRÄSER WEIZEN UND GERSTE .....	13
<i>Weizen als Nutzpflanze</i> .....	14
<i>Gerste als Nutzpflanze</i> .....	15
DIE PFLANZLICHE ZELLWAND .....	17
PFLANZLICHE ABWEHRMECHANISMEN GEGEN BIOTISCHE FAKTOREN.....	19
DAS KOHLENHYDRAT CALLOSE.....	21
<i>Callose in der Pflanzenabwehr</i> .....	22
DAS PFLANZENPATHOGEN <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> .....	25
ABWEHR IN GERSTE UND WEIZENPFLANZEN UND DIE VERÄNDERUNG DES ZELLMETABOLISMUS.....	28
<i>Mykotoxine und die pflanzliche Abwehrreaktion</i> .....	30
FORSCHUNGSANSÄTZE ZUR BEKÄMPFUNG VON FHB IN GETREIDEN .....	30
<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>32</b>
<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>33</b>
<i>TRITICUM AESTIVUM</i> UND <i>HORDEUM VULGARE</i> .....	33
<i>Genetische Modifikation des Gerste- und Weizensaatguts</i> .....	33
<i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> .....	34
SELEKTION TRANSGENER PFLANZEN VIA HYGROMYCIN-BLATTASSAY .....	35
NACHWEIS DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN GENOMISCHER DNA.....	36
<i>Isolierung der gDNA nach Waite</i> .....	36
<i>Elektrophoretische Auftrennung der isolierten Nukleinsäuren</i> .....	36
<i>PCR-Nachweis der Callose Synthase AtGSL05 in genomischer DNA</i> .....	37
EXPRESSIONSANALYSE VON ATGSL05 IN ÄHREN- UND BLATTGEWEBE .....	39
<i>RNA Isolierung aus Blattgewebe</i> .....	39
<i>RNA Isolierung aus der Ähre</i> .....	40
<i>Photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA</i> .....	40
<i>cDNA Synthese</i> .....	41
<i>Qualitative PCR in Gerste und Weizen</i> .....	42
<i>Quantitative RT-qPCR in Gerste und Weizen</i> .....	43
SOUTHERN BLOT DER WEIZENLINIEN .....	45
<i>Herstellung der Sonde</i> .....	45
<i>Restriktionsverdau der genomischen DNA</i> .....	46

<i>Auftrennung und Blotting der genomischen DNA</i> .....	48
INFEKTIONSVERSUCH DER WEIZENÄHREN MIT <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> .....	50
INFEKTIONSVERSUCH DER GERSTEÄHREN MIT <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> .....	51
FLUORESCENZMIKROSKOPIE UND KONFOKALE LASER SCANNING MIKROSKOPIE .....	51
PRIMER, ENZYME, CHEMIKALIEN UND ARBEITSLÖSUNGEN .....	53
<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>63</b>
NACHWEIS DER HYGROMYCIN-RESISTENZ IN ATGSL05-ÜBEREXPRESSIONSLINIEN .....	63
<i>Hygromycin-Resistenz in transgenen Weizenlinien</i> .....	63
<i>Hygromycin-Resistenz in transgenen Gerstelinien</i> .....	65
NACHWEIS DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN DER GENOMISCHEN DNA TRANSGENER LINIEN .....	65
EXPRESSIONSANALYSE DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN ÄHREN- UND BLATTGEWEBE IN WEIZEN- UND GERSTELINIEN .....	67
<i>Isolierung der RNA und Qualitätsbestimmung mittels Spektrophotometer</i> .....	67
<i>Qualitative Expressionsanalyse der Callosesynthase AtGSL05 in Weizenlinien</i> .....	68
<i>Qualitative Expressionanalyse der Callosesynthase AtGSL05 in Gerstelinien</i> .....	69
QUANTITATIVE EXPRESSIONSANALYSE DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN WEIZEN- UND GERSTELINIEN.....	69
<i>Expression der Callosesynthase AtGSL05 in Blatt- und Ährengewebe transgener Weizenlinien</i> .....	69
<i>Verifizierung der PCR Produkte anhand der Schmelzkurven</i> .....	71
<i>Expression der Callosesynthase AtGSL05 in Blattgewebe transgener Gerstelinien</i> .....	72
SOUTHERN BLOT TRANSGENER WEIZENLINIEN .....	73
INFEKTION DER ÄHREN VON TRITICUM AESTIVUM MIT <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> .....	75
INFEKTION DER ÄHREN VON <i>HORDEUM VULGARE</i> MIT <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> .....	78
CALLOSE-DETEKTION IN DER ÄHRE DURCH KONFOKALE LASER-SCANNING MIKROSKOPIE .....	81
<b>DISKUSSION</b> .....	<b>84</b>
ÜBEREXPRESSION DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN TRANSFORMIERTEN GERSTE- UND WEIZENLINIEN.....	84
AUSWIRKUNGEN DER ÜBEREXPRESSION DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN GERSTE- UND WEIZENPFLANZEN AUF EINE INFEKTION MIT <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> .....	89
<b>AUSBLICK</b> .....	<b>92</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>93</b>

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: PCR-Programm – Nachweis AtGSL05 in genomischer DNA .....	38
Tab. 2: PCR-Programm – Nachweis AtGSL05 und Aktin in cDNA .....	43
Tab. 3: PCR-Programm für RT-qPCR – Nachweis AtGSL05 und Aktin in cDNA .....	44
Tab. 4: PCR-Programm zur AtGSL05-spezifischen Sondenherstellung für den Southern Blot .....	46
Tab. 5: Primernamen, Primersequenz in 5' → 3' Orientierung und Bindestelle.....	53
Tab. 6: Restriktionsenzyme, Konzentration, Erkennungssequenz mit Schnittstelle (↓) und Hersteller .....	53
Tab. 7: Fertige Pufferlösungen, Zusammensetzung und Hersteller.....	54
Tab. 8: Verwendete Enzyme und Hersteller.....	55
Tab. 9: Liste der Chemikalien und deren Hersteller.....	55
Tab. 10: Benötigte Geräte, Instrumente und Hersteller.....	57
Tab. 11: Zusammensetzung der Arbeitslösungen und Puffer .....	58
Tab. 12: Zusammensetzung der verwendeten Medien .....	61

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Die Kulturgräser Gerste- und Weizen: genutzt zu Forschungszwecken im Zuge dieser Arbeit.....	13
Abb. 2: Struktur von Callose.....	21
Abb. 3: Formierung effektiver Papillen im Zuge einer Pilz-Pflanze-Interaktion .....	23
Abb. 4: <i>Fusarium graminearum</i> .....	25
Abb. 5: Weizenblüten zum Zeitpunkt der Anthese .....	26
Abb. 6 : Plasmidkarte des Vektors pIPKb005_AtGSL5-GFP .....	33
Abb. 7: Blattassays zur Selektion transformierter Pflanzen via Hygromycin-Exposition bei Weizen....	64
Abb. 8: Hygromycin-sensitive Weizenpflanzen mit unterschiedlich starker Vergilbung .....	64
Abb. 9: Hygromycin-Blattassay der Linie 7B-1 in Gerste .....	65
Abb. 10: Qualitativer PCR-Nachweis der Callosesynthase AtGSL05 in pflanzlicher gDNA.....	66
Abb. 11: Spektrophotometrische RNA-Analyse .....	68
Abb. 12: Qualitativer Nachweis der Expression Aktins via RT-PCR in Weizen.....	68
Abb. 13: Qualitativer RT-PCR Nachweis der Callosesynthase AtGSL05 in cDNA von Gerste.....	69
Abb. 14: Formel zur Berechnung der Relativen Expressionsstärke in Prozent, ermittelt aus den CP-Werten für Aktin und AtGSL05.....	70
Abb. 15: Relative Expressionsstärke der Callosesynthase AtGSL05 im Blattgewebe von Weizen .....	70
Abb. 16: Relative Expressionsstärke der Callosesynthase AtGSL05 im Ährgewebe von Weizen .....	71
Abb. 17: Schmelzkurvenverläufe bei der Amplifikation der Callosesynthase AtGSL05 in Weizen .....	72
Abb. 18: Relative Expressionsstärke der Callosesynthase AtGSL05 im Blattgewebe von Gerste.....	73
Abb. 19: Vorbereitungen zum Southern Blot der genomischen Weizen DNA .....	74
Abb. 20: Southern Blot in Weizen.....	75
Abb. 21: <i>Fusarium graminearum</i> auf Weizen .....	77
Abb. 22: Relative Infektionsstärke [%] der Ähren bei einer Infektion von Weizen mit <i>Fusarium graminearum</i> 7 Tage nach Inokulation.....	78

Abb. 23: Relative Infektionsstärke [%] der Ähren bei einer Infektion von Gerste mit <i>Fusarium graminearum</i> 14 Tage nach Inokulation.....	79
Abb. 24: <i>Fusarium graminearum</i> auf Gerste 14 Tage nach punktueller Inokulation.....	80
Abb. 25: CLSM-Aufnahmen im Bereich des Rachisknotens bei einer Infektion von Weizen mit <i>F. graminearum</i> .....	82
Abb. 26: CLSM-Aufnahme der Weizenlinie E04-B nach einer Infektion mit <i>Fusarium graminearum</i> ..	83
Abb. 27: Callosesynthasekomplex in Phloemzelle von Weizen.....	83



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ad	Auf ein angegebenes Volumen auffüllen
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BAP	6-Benzyl-Aminopurin
AtGSL05	<i>Arabidopsis thaliana</i> glucan synthase like 05
BamHI	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>B.distachyon</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>
Bp	Basenpaare
cDNA	Complementary DNA
cm	Zentimeter
CSPD	Dinatrium -3-(4 Methoxyspirol [1, 2- Dioxetan - 3, 2'-(5'-Chloro) Tricyclodecan]-4-yl) Phenylphosphat
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
Da	Dalton
Dai	Days after inoculation
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotide
DON	Desoxynivalenol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
<i>F. graminearum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
FHB	Fusarium Head Blight
gDNA	Genomische DNA
GFP	Green Fluorescent Protein
hpt	Hygromycin-B Phosphotransferase
<i>H. vulgare</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
Hz	Hertz
H <sub>2</sub> O Mili-Q	Entionisiertes Wasser
Kb	Kilobasen
M	Molar

min	Minute
ml	Mililiter
mM	Milimolar
ng	Nanogramm
NheI HF	Restriktionsenzym aus <i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i> High Fidelity
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT-qPCR	Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction
SSC	Natriumcitratsalzlösung
Tab.	Tabelle
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TaGstA1	Weizen Glutathion-S-Transferase 1 Promotor
tDNA	Transfer DNA
TBE	Puffer aus Tris-HCl, Borsäure und EDTA
TE	Puffer aus Tris-HCl und EDTA
WT	Wildtyp
μl	Mikroliter

## ZUSAMMENFASSUNG

Der hemibiotrophe Pilz *Fusarium graminearum* trägt maßgeblich zum globalen Ernteverlust bei domestizierten Süßgräsern wie Weizen und Gerste bei. Das dabei verursachte Schadbild der Ährenfusariose äußert sich durch Ausbleichen und Absterben der Ähren, sowie durch folglich mangelnde Karyopsenbildung bzw. eine Kontamination des Saatguts durch gesundheitsschädliche Pilztoxine. Aus diesem Grund ist die Förderung der Pathogenabwehr in der Wirtspflanze durch Züchtungsmaßnahmen bzw. gentechnischer Veränderung der Pflanzen von besonderem Interesse.

In Anlehnung an die bereits beschriebene Korrelation zwischen der Bildung des Kohlenhydrats Callose in dem verwandten Süßgras *Brachypodium distachyon* und einer erhöhten Toleranz gegenüber *F. graminearum*, wurden Weizen- und Gerstepflanzen hinsichtlich einer Überexpression der in der Pathogenabwehr bedeutsamen Callosesynthase AtGSL05 modifiziert.

Im Zuge dieser Arbeit wurde eine molekularbiologische Charakterisierung transformierter Gerste- und Weizenlinien hinsichtlich der Callosesynthase AtGSL05 im Blatt- und Ährengewebe durchgeführt. Dabei konnte die Integration der Gensequenz in die genomische DNA der Pflanzen und deren erfolgreiche Expression in der Zelle nachgewiesen werden. Überdies hinaus wurde bei mikroskopischen Analysen via konfokaler Laser Scanning Mikroskopie Ablagerungen des Kohlenhydrats Callose im Bereich des Rachisknotens detektiert, wobei auch eventuell der Proteinkomplex der Callosesynthase in Weizenzellen beobachtet werden konnte.

Bei den anschließenden punktuellen Ähren-Infektionsversuchen zur Toleranz gegenüber *F. graminearum* zeigte sich bei Gerste ein Phänotyp entsprechend einer Typ II Resistenz in sowohl AtGSL05 tragenden Pflanzen, als auch im Wildtyp. In Weizen zeigten AtGSL05-tragende Pflanzen einen verminderten Infektionsgrad im Vergleich zu Pflanzen des Wildtyps, jedoch keine vollständige Resistenz. Dies könnte jedoch die Grundlage einer Resistenzentwicklung gegenüber des Phytopathogens bilden.

## SUMMARY

The hemibiotrophic fungus *Fusarium graminearum* is one of the most invasive phytopathogens of wheat and barley and the reason for crop losses all over the world. Infected plants show the phenotype of Fusarium Head Blight. In this case the spikes do not produce fertile grain and the caryopses can show a high contamination rate with unhealthy toxins produced by the invading fungus. For this reason the pathogen defense against *F. graminearum* is a main topic of breeding and genetical modification processes to elevate the resistance level in host plants.

Recent studies of the model grass *Brachypodium distachyon* describe a positive correlation between the synthesis of callose and the resistance level in plants during an infection with *F. graminearum*. Because of these examinations genetically modified plants of wheat and barley with an overexpression of the callose synthase AtGSL05, which plays an important role in pathogen defense, were created and analyzed.

In the following study we did a molecular characterization of wheat and barley regarding the artificial overexpression of the callosesynthase AtGSL05 in the two tissue types of leaves and spikes. The integration of the gene of interest into genomic DNA and the effective, cellular expression were verified. Moreover the microscopic analyses through confocal laser scanning microscopy showed the presence of callose in the rachisnode during an infection with *F. graminearum*. Additionally we even may have detected the proteincomplex callosesynthase in wheat cells.

Further investigations concerning the resistance level of genetically modified plants against an infection with *F. graminearum* were carried out. In barley these studies revealed a type II resistance in both wildtype and genetically modified plants. The infectionlevel in genetically modified plants of wheat decreased when compared to the wildtype, but no complete resistance was detected.

# EINLEITUNG

## DIE KULTURGRÄSER WEIZEN UND GERSTE

Die monokotylen Kulturpflanzen Weizen (*Triticum* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gehören zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*), genauer zum Tribus der *Triticeae*. Bei den Blütenständen der Gerste- und Weizenpflanzen handelt es sich um endständige Ähren, die nach der Befruchtung Körner ausbilden. Die Wurzelsysteme der Gräser sind tiefgründig und reich verzweigt und ermöglichen der Pflanze eine stabile Verankerung im Erdreich. Die hohe Biegsamkeit der langen Halme schützt diese auch bei starkem Wind gegen Bruch und doch sind die reifen Ähren durch Schneiden leicht zu ernten. Domestizierte Kulturgräser unterscheiden sich von ihren wilden Vorfahren meist durch eine erhöhte Spindelfestigkeit und Samengröße, sowie einen verringerten mechanischen Schutz des Kornes. Ein weiteres Züchtungsziel von besonderer Wichtigkeit ist die Widerstandsfähigkeit gegen Witterungseinflüsse, sowie zahlreiche, ertragsmindernde Schädlinge (Miedaner, 2014).

Durch gezielte gentechnische Veränderung der Pflanzen könnte der Prozess der Merkmalsoptimierung beschleunigt und beispielsweise die Toleranzgrenze gegenüber bedeutsamen Pathogenen angehoben werden.



**Abb. 1.:** Die Kulturgräser Gerste- und Weizen genutzt zu Forschungszwecken im Zuge dieser Arbeit: (a) Vollentwickelte, gesunde Weizenpflanzen der Sorte „Bob White“ mit frisch gebildeten Ähren; (b) Weizenähren zum Zeitpunkt der Anthese; (c) Domestizierte Gerstepflanzen der Sorte „Golden Promise“ mit Ähren, die soeben die Blattscheide verlassen.

## WEIZEN ALS NUTZPFLANZE

Weizen (*Triticum* L.) zählt mit Mais und Reis zu den bedeutendsten Kulturpflanzen der Menschheit (Miedaner, 2010). Im Laufe der Zeit wurden durch unterschiedliche Kreuzungsversuche zur Anpassung der Pflanze an biotische und abiotische Stressfaktoren, sowie zur Ertragssteigerung über 25 000 Subtypen geschaffen (Shewry, 2009). Mit einem Anteil von 95% an der globalen Weizenproduktion spielt der Weichweizen *Triticum aestivum*, auch Brot- oder Saatweizen genannt, dabei die wichtigste Rolle (Miedaner, 2010), (Peng et al., 2011).

Einerseits als substantieller Nahrungsbestandteil der Weltbevölkerung, andererseits als bedeutsames Futtermittel, umfasste die weltweite Produktion an Weizen alleine im Jahr 2014 fast 730 Millionen Tonnen. Mit 43,3% stellt Asien dabei den Hauptproduzenten dar, gefolgt von Europa mit 34,2%. Innerhalb Europas trägt vor allem Frankreich maßgeblich zur Weizenproduktion bei (<http://faostat3.fao.org>).

Seinen Ursprung findet die Geschichte des Weizens etwa 8000 vor Christus in Mesopotamien im Zuge des Wechsels von Jäger- und Sammlertum zur Ansiedelung, Domestizierung und Nutzung von Landwirtschaft (Carlá, 2012) (Shewry, 2009). Bei der Ausbreitung des Weizens verlief die Hauptroute beginnend bei Anatolien bis nach Griechenland, erstreckte sich weiter über das Balkangebiet bis zur Donau und erreichte über Italien, Frankreich und Spanien schließlich Großbritannien und Skandinavien. In China ist Weizen seit etwa 1000 v. Chr. vertreten; in Amerika und Australien stellt Weizen erst seit wenigen Jahrhunderten einen Bestandteil der Landwirtschaft dar (Shewry, 2009). Heutzutage verteilen sich die Anbaugelände des Weizens über die gesamte Welt und nehmen global mehr als 200 Millionen Hektar Anbaufläche in Anspruch (Miedaner, 2014).

Die ersten kultivierten Weizenarten waren Einkorn (*Triticum monococcum*) mit einem diploiden und Emmer (*Triticum dicoccum*) mit einem tetraploiden Genom. Die heutige Kulturpflanze *T. aestivum* geht aus der Kreuzung dieser beiden Getreidearten und der zusätzlichen Hybridisierung mit dem nicht-verwandten Wildgras *Triticum tauschii* bzw. *Aegilops tauschii* hervor (Shewry, 2009). Daraus resultierte das hexaploide Genom von *T. aestivum*, mit drei Chromosomensätzen zu je sieben Chromosomen. Insgesamt ist das Erbgut auf 42 Chromosomen verteilt. Obwohl bisher 96 Tausend Gene des Weichweizens entschlüsselt werden konnten, gelang aufgrund der Größe und Komplexität des Weizengenoms noch keine vollständige Genomsequenzierung (Miedaner, 2014).

Je nach Sorte schieben Weizenpflanzen eine unterschiedliche Anzahl an endständigen Ähren. Ähren sind zusammengesetzte Blütenstände mit einer gestreckten Hauptachse, der Ährenspindel oder Rachis (Miedaner, 2014). Entlang der Ährenspindel sitzen wiederum mit Blüten gefüllte Ährchen. Weizen bildet pro Ährchen zwei bis neun Blüten aus, wobei wiederum fünf zu Körnern ausreifen können. Jede Einzelblüte enthält drei Antheren und eine zweigefiederte Narbe (siehe Abb. 5). Weizenblüten sind selbstbefruchtend und chasmogam, wobei die intensiv gelben Antheren zum Zeitpunkt der Anthese zwischen den Spelzen hervortreten (Aufhammer, 2003). Die Bestäubung und Befruchtung der Narbe findet anschließend durch den Pollen derselben Blüte statt (Miedaner, 2010).

## GERSTE ALS NUTZPFLANZE

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist das älteste Kulturgetreide der Menschheit und ebenfalls dem Tribus der *Triticeae* angehörig (Miedaner, 2014). Insgesamt umfasst die Gattung *Hordeum* 32 Arten mit diploiden, tetraploiden und hexaploiden Genotypen. Bei *Hordeum vulgare* L. handelt es sich um eine einjährige Pflanze mit doppeltem Chromosomensatz und insgesamt 14 Chromosomen (Pourkheirandish und Komatsuda, 2007). Ihre Wildform, *Hordeum spontaneum* Koch, wurde in der Türkei erstbeschrieben und besiedelt heute weite Teile Asiens, darunter Pakistan, Afghanistan, Indien, Nepal, Tibet. Sie ist der direkte Vorfahre der heutigen Kulturpflanze und auf Primär- und Sekundärstandorten zu finden (Badr et al., 2000), (Pourkheirandish und Komatsuda, 2007).

Die früheste Domestikation und Kultivierung geschah vor 10 000 Jahren im israelisch-jordanischen Raum und im südlichen Teil des Fruchtbaren Halbmondes durch den Anbau zweizeiliger Gerste (Badr et al., 2000). Die Schlüsselmerkmale der Domestizierung waren eine unbrüchige Rachis, nackte Karyopsen und die Sechszelligkeit der Ähre (Pourkheirandish und Komatsuda, 2007).

Unter allen Getreiden zeichnet sich Gerste vor allem durch ihre hohe Anspruchslosigkeit hinsichtlich Wachstumsbedingungen und der daraus resultierenden breiten ökologischen Anpassungsfähigkeit aus. In den Alpen gedeiht sie bis zu einer Seehöhe von 1900, in Tibet sogar bis zu 4700 Metern. Dadurch erfuhr der Anbau von Gerste vor allem durch die Auslagerung der landwirtschaftlich genutzten Flächen auf rauere Standorte einen Aufschwung (Miedaner, 2014).

In Deutschland ist Gerste heutzutage die dritt wichtigste Kulturpflanze (Miedaner, 2014). Im Jahre 2014 belief sich die weltweite Produktion auf 144 Millionen Tonnen. Trotz des asiatischen Ursprungs und der hohen Anpassungsfähigkeit erfolgt die Hauptproduktion mit knapp 65% in

Europa. Der größte Anteil fällt auf Russland, gefolgt von Frankreich und Deutschland (<http://faostat3.fao.org>).

Im Gegensatz zu Weizen eignet sich das Gerstekorn nicht zur Weiterverarbeitung zu Brot und zeigt im Vergleich zu anderen Getreiden einen höheren Protein- und Faseranteil, aber geringeren Stärkegehalt (Prasad et al., 2014). Etwa 80 bis 90 % der weltweit produzierten Gerste entfallen auf Futtermittel für Vieh und 10 % für die Produktion von Alkoholika. Nur selten dient Gerste noch als direktes Nahrungsmittel für den Menschen (Gianinetti, 2016). Dabei zeigt die Konsumierung von Gerste als Vollkornprodukt bzw. als Pulver getrockneter Blätter deutlich positive Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit. Sie hilft bei der Neutralisierung von Toxinen und der Reinigung der Leber, verlangsamt die Absorption von Glukose und Cholesterin und wirkt antibakteriell (Prasad et al., 2014).

Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche morphologisch unterschiedliche Gerste-Typen hervorgebracht. Dazu zählen Sommer- und Wintergerste, begrannte und unbegrannte, sowie bespelzte und unbespelzte Formen und die zwei- bzw. sechszeilige Gerste mit unterschiedlicher Blütenanzahl (Gianinetti, 2016). Sommergerste reift bereits nach einer kurzen Periode von 60-70 Tagen, während ein vollständiger Entwicklungszyklus von Wintergerste bis zu 180 Tagen dauert (Dickson, 2016). Eine vollständig ausgebildete Pflanze bildet einen zentralen Halm mit zwei bis fünf Verzweigungshalmen aus. Die Blätter der Gerste sind linear und alternierend angeordnet. Das Blatt besteht aus Blatthütchen (Ligula), Blattohr (Auricula), Oberblatt (Lamina) und der Blattscheide (Vagina), die den Halm vollkommen umgibt (Australian Government, 2008). Gerste zählt zu den Selbstbestäubern und bringt kleistogame Blüten hervor (Gianinetti, 2016). Bei Gerste und anderen echten Getreiden entwickeln sich die Einzelblüten in Abhängigkeit der Position im Blütenstand. Die Blüte beginnt grundsätzlich im Zentrum der Ähre und breitet sich Richtung Spitze und Basis aus. Somit umfasst ein Blütenstand zahlreiche Blüten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Der Aufbau der Ähren ist einzigartig unter den Vertretern der *Triticeae*. Die Ährchen sind direkt an die zentrale Achse (Rachis) angehaftet (Pourkheirandish and Komatsuda, 2007). Jedes Ährchen besteht aus zwei Hüllspelzen (Glumae) und einem Floret mit Deckspelze (Lemma), Vorspelze (Palea) und den eingeschlossenen Reproduktionsmerkmalen. Jede Deckspelze kann sich zu einer Granne erweitern bzw. bildet sich bei manchen Arten eine sogenannte Kapuze aus (Australian Government, 2008). Die gebildeten Körner sind mit Deck- und Vorspelze fest verwachsen (Franke et al., 1997). An jedem Knotenpunkt der Rachis sitzen drei Florets. Im Wildtyp und der zweizeiligen Form ist nur das zentrale Floret fruchtbar und die zwei Kornreihen stehen sich versetzt gegenüber. In der kultivierten, sechszeiligen Gerste sind jedoch alle drei Florets fertil (Hockett, 2000).



Neben ihrer Rolle als domestiziertes Wildgras stellt Gerste auch einen vielseitig genutzten Modellorganismus dar. Aufgrund der hohen genetischen Variabilität zugunsten von Anpassungen an Stressfaktoren, sowie des diploiden Genoms eignet sich die Pflanze besonders für die Forschung an Getreiden. Ein weiterer wichtiger Faktor ist, dass die sieben Chromosomenpaare der Gerste das Basisgenom aller Vertreter der *Triticeae* repräsentieren (Gianinetti, 2016). Die Entschlüsselung des Erbmaterials würde jedoch unter anderem einen wesentlichen Schritt zur Resistenzschaffung in *Triticeen* beitragen.

## DIE PFLANZLICHE ZELLWAND

Die pflanzliche Zellwand spielt eine maßgebliche Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen, die quasi alle Lebensbereiche der Pflanze wie Wachstum, Entwicklung, Erhaltung und Reproduktion umfassen. Zellwände sind dynamische Strukturen und sorgen für mechanische Stabilität im Höhenwachstum, ermöglichen den Stofftransport in Leitgeweben, erlauben die Anpassung an hohe Turgordrücke, agieren als Diffusionsbarriere für Makromoleküle und bilden eine wichtige physische Barriere gegen Schädlinge (Taiz und Zeiger, 2007).

Bei der pflanzlichen Zellwand handelt es sich um ein Abscheidungsprodukt des Protoplasten und einen integralen Bestandteil lebender Zellen. Sie bildet das formgebende Exoskelett der Zellen und besteht grundsätzlich aus den drei Schichten Primärwand, Mittellamelle und Sekundärwand. Für den Aufbau sind zahlreiche Proteine und Polysaccharide von großer Bedeutung (Bresinsky et al., 2008). Die Zellwände von Pflanzen können in ihrer Zusammensetzung stark variieren, wobei diese Heterogenität auch die unterschiedlich evolvierten Infektionsstrategien der Pathogene reflektiert (Malinovsky et al., 2014).

Die vier Basiskomponenten der Primärwand sind Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektine (Gibson, 2012). Bei letzteren handelt es sich um saure, hydrophile Polysaccharide mit enormem Quellungsvermögen, die den Austausch von Kationen ermöglichen (Bresinsky et al., 2008). Weiters dienen sie in Form eines hydrierten Gels der Einbettung des Kohlenhydratgerüsts und verhindern eine fehlerhafte Aggregation der Fibrillen (Taiz und Zeiger, 2007).

Die makromolekulare Verbindung Zellulose ist der Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände und das häufigste Polysaccharid der Welt (Bresinsky et al., 2008). Aus dem Grundbaustein Glucose bilden sich lange, unverzweigte, lineare Homopolymere, die aus 7000 bis 15000 Glucose-Monomere bestehen können (Gibson, 2012). Die Einheiten sind entlang der Molekülachse um  $180^\circ$  gegeneinander verdreht und werden zusätzlich durch Wasserstoffbrücken beidseits der  $\beta$ -

1,4-glykosidischen Bindung fixiert. In weiterer Folge bilden sich durch die strikte Parallelorientierung der Glucosemoleküle Elementarfibrillen und vor allem bei Sekundärwänden Mikrofibrillen aus. Diese Fibrillen sind maßgeblich für die Gerüstfunktion der Zellwand verantwortlich (Bresinsky et al., 2008). Aufgrund des stark kondensierten Aufbaus ist Cellulose größtenteils resistent gegen eine Hydrolasen-vermittelte Degradierung und somit ein wichtiger Faktor in der Abschwächung des Pathogenangriffs (Malinovsky et al., 2014).

Im Gegensatz zu Zellulose können Hemizellulosen unterschiedlich aufgebaut sein. Die Vertreter dieser heterogenen Polysaccharidgruppe sind kurzkettig, amorph und bestehen aus 500 bis 3000 Monomeren (Gibson, 2012). Es handelt sich vor allem um  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,4-verknüpfte Glukane, sowie um Xyloglukane, wobei Hemizellulosen oftmals Seitenketten mit unterschiedlichen Zuckerstrukturen aufweisen (Bresinsky et al., 2008). Eine grundlegende Aufgabe der Hemizellulosen besteht darin, an die Oberfläche von Zellulose binden und ein zusammenhängendes Netzwerk aus Fibrillen zu schaffen. Die Zusammensetzung der verschiedenen Hemizellulosen kann jedoch je nach Art, Gewebe und Entwicklungszustand der Pflanze variieren (Taiz und Zeiger, 2007). In beispielsweise Pollenschläuchen oder in Zellplatten sich teilender Zellen findet man das Kohlenhydrat Callose, das ebenfalls zu den Hemizellulosen zählt und zusätzlich eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr einnimmt (Voigt, 2014). Die Biosynthese der Callose und Cellulose erfolgt an der Plasmamembran (Gibeaut und Carpita, 1994). Die übrigen Komponenten der Zellwand werden innerhalb des Golgi-Apparates assembliert, in den Apoplasten sekretiert und an der Zellwand mit den Mikrofibrillen der Cellulose assoziiert (Bashline et al., 2014).

Bei Lignin handelt es sich um einen phenolischen Komplex mit amorpher Struktur. Lignifizierungen kommen vor allem bei Sekundärwänden vor und sorgen für eine Erhöhung der Formsteifheit, Festigkeit und bilden eine undurchlässige Barriere für Wasser und Toxine (Gibson, 2012) (Malinovsky et al., 2014) (Bellincampi et al., 2014).

## PFLANZLICHE ABWEHRMECHANISMEN GEGEN BIOTISCHE FAKTOREN

Die pflanzliche Zellwand ist die Schnittstelle für Interaktionen zwischen Pflanze und Pathogenen bzw. Symbionten. Während biotrophe Organismen die Wirtszellen am Leben erhalten, versuchen nekrotrophe Parasiten das Gewebe nachhaltig zu schädigen (Lionetti und Métraux, 2014).

Grundsätzlich verläuft eine erfolgreiche Infektion der Pflanze durch einen nekrotrophen Pilz in folgenden Stufen: Konidienanhaftung an der Wirtsoberfläche, Sporenkeimung, Penetration der Zellwand und Läsionbildung, Zersetzung des Gewebes und schlussendlich Sporulation (Bellincampi et al., 2014).

Sowohl biotrophe als auch nekrotrophe Parasiten können den Wirtsmetabolismus beeinflussen, um sich im Organismus zu etablieren (Lionetti und Métraux, 2014). Grundsätzlich muss eine Affinität zwischen Pflanze und Pathogen bestehen, damit eine Interaktion zu Stande kommen kann. In weiterer Folge entscheidet sich, ob die beiden Interaktionspartner kompatibel sind und eine Infektion des Gewebes möglich ist, oder ob erfolgreiche Abwehrreaktionen der Pflanze für eine schlussendliche Inkompatibilität sorgen (Börner, 2009). Grundsätzlich lässt sich zwischen einer allgemeinen, Pathogen-unspezifischen und einer spezifischen Abwehrreaktion unterscheiden. Bei der spezifischen Abwehr besitzt die Pflanze ein Resistenzgen passend zum Avirulenzgen des Pathogens und führt zur Auslösung der Hypersensitivitätsantwort (HR) in der Zelle (Bresinsky et al., 2008). Dieser Abwehrmechanismus umfasst die Oxidation von Phenolen, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Phytoalexine, eine Steigerung der Zellatmung, die Abgabe von Ethylen und Salicylsäure, die Genaktivierung von Resistenzvorgängen, sowie die Einlagerung von Lignin und Callose zur Stärkung der Zellwand. Diese rasche und lokal begrenzte Immunantwort resultiert in der gezielten Bildung von Nekrosen, um die Ausbreitung des Pathogens einzudämmen (Börner, 2009).

Die allgemeine, basale Abwehr wird durch nicht-wirtsspezifische Elicitoren ausgelöst. Bei diesen sogenannten PAMPS (*pathogen associated molecular patterns*) handelt es um biotische Faktoren, wie beispielsweise Chitin, Ergosterol und Flagellin, die in allen Pathogenklassen zu finden und meist mit einer essentiellen Bedeutung für das Überleben des Pathogens assoziiert sind. Die Erkennung durch PR-Rezeptoren an der Außenseite der pflanzlichen Plasmamembran führt zur Auslösung der *pattern triggered immunity* (PTI) (Bresinsky et al., 2008) (Voigt & Somerville, 2009). Von der Pflanze selbst werden *damage associated molecular patterns* (DAMPs) hergestellt, die wiederum von spezifischen Rezeptoren erkannt werden (Bellincampi et al., 2014). Durch die folgende Umprogrammierung der Zelle auf Transkriptionsebene wird im Zellkern die Expression weiterer PR-Gene aktiviert und die Abwehrreaktion durch zusätzliche Komponenten, wie

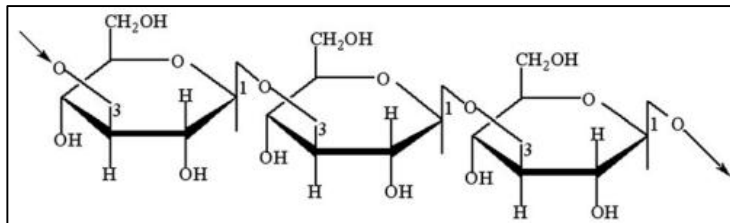
Reaktive Sauerstoffspezies, degradative Enzyme und Phytoalexine, Lignin und Callose unterstützt (Bresinsky et al., 2008), (Börner, 2009), (Malinovsky et al., 2014).

Neben der lokal begrenzten, raschen Abwehrreaktion ist auch die Induktion einer systemischen Abwehr in der Pflanze möglich. Bei dieser *systemic acquired resistance* (SAR) zeigen die Induktoren keinen unmittelbaren, toxischen Einfluss auf das Pathogen und führen auch zu keinen unmittelbaren Auswirkungen in der Zelle. Salicylsäure oder Ethylen stellen wichtige Signalmoleküle dieser Abwehrreaktion dar. Nach der anfänglichen lokalen Akkumulierung werden die Signalmoleküle systemisch in der Pflanze verbreitet. Dies wiederum aktiviert SAR-Gene, die unter anderem für PR-Proteine codieren (Börner, 2009).

Das zelluläre Geschehen in der Pflanze stellt ein ständiges Wechselspiel zahlreicher Komponenten dar, die sich gegenseitig hinsichtlich Synthese und Abbau beeinflussen und ihre Rolle im Zellgeschehen definieren. Eine erfolgreiche Verteidigung auf Zellwand-Ebene bietet der Pflanze die Gelegenheit auf weitere hochkomplexe Abwehrmechanismen zu verzichten und sich dadurch Kraft zu sparen (Underwood, 2012).

## DAS KOHLENHYDRAT CALLOSE

Callose besteht aus  $\beta$ -1,3- verknüpften D-Glukose-Einheiten, wobei die resultierenden Glukankettenhelikale Duplex- und Triplexstrukturen ausbilden können (siehe Abb.2) (Buchanan et al., 2000).



**Abb. 2: Struktur von Callose:** Glukankette aus  $\beta$ -1,3-glykosidisch verknüpften Glukosemonomeren (Chen und Kim, 2009).

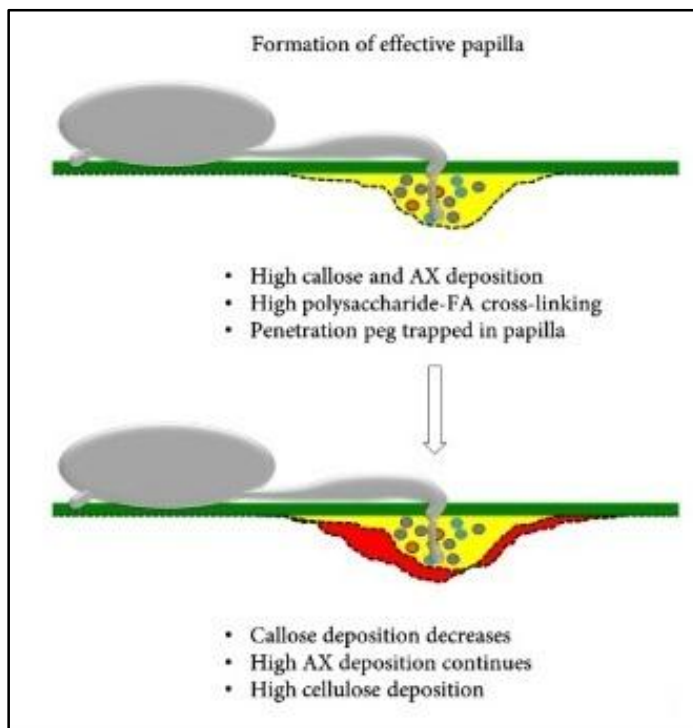
Das amorphe Kohlenhydrat zählt zu den strukturgebenden Polysacchariden der Zellwand und schützt die Pflanzenzelle gegen mechanischen Druck. Ein verstärkter Abbau der Callose durch den gezielten Einsatz von beispielsweise Lyticase vermindert die zelluläre Steifheit und steigert die Viskoelastizität (Parre & Geitmann, 2005). Callose wird während sämtlichen Entwicklungsschritten in der Pflanze gebildet und ist in zahlreiche Prozesse wie Pollenentwicklung, funktionelle Megasporenselktion, Zellplattenformation, Regulation der Plasmodesmata, Entwicklung und Regulation der Siebporen, Pollenschlauchwachstum und in die Stressantwort auf abiotische und biotische Faktoren involviert (Chen und Kim, 2009). Außerdem könnte Callose als Schlüsselmolekül für biologische Silifizierung dienen (Law und Exley, 2011). Bei biotischem Stress kann Callose an den Penetrationsstellen mit den Cellulosepolymeren der Zellwand interagieren und generiert ein dreidimensionales Kohlenhydrat Netzwerk in Form eines Callose-Layers. Diese zusätzliche Versiegelung vermindert das Eindringen Zellwand-degradierender Enzyme und schützt die pflanzliche Zellwand vor Hydrolyse (Eggert et al., 2014). Die helikalen Ketten zeigen überdies eine Gel-bildende Eigenschaft, die mit der Stopfen-artigen Versiegelung von Zellwandschädigungen bedingt durch Pathogenpenetration in Verbindung gebracht werden (Verma und Hong, 2001). Vermutlich erfolgt die Degradierung des Homopolymers durch  $\beta$ -1,3-Glukanasen; die Produktion der Callose durch Callosesynthasen mit UDP-Glukose als Substrat (Chen und Kim, 2009). Ähnlich zur Cellulosesynthese handelt es sich auch bei der Callosesynthese um ein Membran-assoziiertes Protein (Verma und Hong, 2001). Hinsichtlich der Callose-Biosynthese konnten aus *Arabidopsis thaliana* zwölf Gene isoliert werden, wobei jedes Gen mehrere Funktionen einnehmen kann. In der Nomenklatur nach Verma und Hong (2001) sind diese als AtCals1 bis 12, nach Richmond und Somerville (2000) als AtGSL1

bis 12 beschrieben. Die Gene der Callosesynthese liegen auf mehreren Chromosomen verteilt vor. Die codierten Proteine umfassen etwa eine Länge von 2000 Aminosäuren und bestehen mit Ausnahme von GSL1 und GSL5 aus zahlreichen Exons und Introns. Die Callosegene GSL1 und GSL5 enthalten nur zwei und drei Exons und sind auf Chromosom vier lokalisiert (Hong et al., 2001). Alle Vertreter der GSL-Proteine enthalten multiple Transmembrandomänen mit einem zum Zytoplasma exponierten, hydrophoben Loop mit der Funktion als Substratbindestelle und Glykosyltransferasedomäne (Chen und Kim, 2009). Für die Bildung der Callose im Zuge der Immunantwort ist das Gen AtGSL5 (AtCalS1) von besonderem Interesse. Aufgrund der mit GSL5 im Zusammenhang stehenden Resistenz in Mehltau (Powdery Mildew) ist das Gen auch unter der Bezeichnung PMR4 bekannt. (Chen und Kim, 2009). Weitere Funktionen von GSL1 und GSL5 konnten auch der Pollen- und Sporophytenentwicklung, sowie deren Fruchtbarkeit zugesprochen werden (Enns et al., 2005). Im intakten Pflanzengewebe sind Calloseablagerungen vor allem bei Plasmodesmata, Tüpfelrändern und Siebporen zu finden. Bei Gametophyten und Pollenmutterzellen tritt sie in Form von provisorischen Zellwänden auf (Eschrich, 1995). Bezüglich Zellwandaufbau und Permeabilität führte die Überexpression der Callosesynthase GSL2 in Tabak zur massiven Akkumulierung von Callose in der Zellwand und zu einem veränderten Plasmolyse- und Zytolyseverhalten (Xie et al., 2012).

#### *CALLOSE IN DER PFLANZENABWEHR*

Die Bildung von Papillen im Zusammenhang mit der Penetration eines pilzlichen Pathogens wurde bereits im Jahre 1863 von DeBary beobachtet. Obwohl die biochemische Zusammensetzung der Papillen variieren kann, wird Callose seit 1895 als Hauptbestandteil beschrieben. Weitere wichtige Komponenten können Cellulose, Arabinoxylan, Phenole, Reaktive Sauerstoffspezies, Lignin, Thionine und Proteine wie Peroxidasen darstellen. Strukturell zeigen Papillen einen geschichteten Aufbau mit einem inneren Kern aus Callose und einer äußeren Schicht aus Cellulose (siehe Abb. 3). Arabinoxylan ist sowohl in den inneren, als auch in der äußeren Schichten vertreten (Voigt, 2014), (Chowdhury et al., 2014). Der Hauptunterschied zwischen effektiven und ineffektiven Papillen scheint in der Polysaccharid-Komposition und nicht in der Konzentration der Phenole zu liegen (Chowdhury et al., 2014). Obwohl Callose maßgeblich am Aufbau der Papillen beteiligt ist, kommt es auch in Knock out Mutanten mit stillgelegten Callosegenen zur typischen,

jedoch Callose-freien Ausbildung von Papillen nahe pilzlicher Appressorien (Jacobs, 2003).



**Abb. 3: Formierung effektiver Papillen im Zuge einer Pilz-Pflanze-Interaktion.** Formierung effektiver Papillen an der Zellwand ■ während der Interaktion von *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* ■ mit Gerste durch primäre Bildung von Callose in Verbindung mit Arabinoxylenen ■, sowie Polysaccharid-Ferulasäure-Vernetzungen zur Begrenzung des Infektionsschlauchs (penetration peg). Sekundäre Anlagerung von Cellulose-Arabinoxylenen ■ und gleichzeitige Abnahme der Callosebildung. Fortlaufende Präsenz von Phenolen ● während des Infektionsprozesses (Chowdhury et al., 2014)

Grundsätzlich wird angenommen, dass die Formierung von Papillen keine vollständige Resistenz im Organismus hervorruft, jedoch eine physikalische Barriere schafft und die Schnelligkeit des Infektionsprozesses herabsetzen kann (Voigt und Somerville, 2009). In effektiven Papillen von Gerste bei einer Infektion mit *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* konnte eine signifikant erhöhte Konzentration von Callose nachgewiesen werden (siehe Abb.3). Zusätzlich wird die Zellwand durch die Quervernetzung von Arabinoxylenen, Cellulosen und Phenolen verstärkt (Chowdhury et al., 2014). Dies könnte der Pflanze einen zeitlichen Vorsprung verschaffen, um die Aktivierung und Expression jener Gene einzuleiten, die in weiterer Folge für eine erfolgreiche Pathogenabwehr entscheidend sind (Voigt und Somerville, 2009). Im Zuge ultrastruktureller Untersuchungen des Infektionsprozesses von *Uromyces vignae* auf nicht-Wirts Erbsenpflanzen konnte neben der Papillenbildung zusätzlich eine manschettenartige Formierung der Calloseablagerungen um die penetrierende Hyphe, sowie die Bildung von Wasserstoffperoxid beobachtet werden (Mellersh und Heath, 2001). Die Annahme, dass eine Penetrationsresistenz in Zusammenhang mit erhöhtem Callosevorkommen in effektiven Papillen steht, wurde durch eine breite Untersuchung von Pflanzen-Pathogen-Interaktionen im Jahre 1992 von Stone und

Clarke bestärkt (Chowdhury et al., 2014). In *Arabidopsis* führt die Überexpression von GSL5 zu erhöhten Callosemengen in den Zellen und zu einer vollständigen Resistenz der Pflanze gegenüber des adaptierten, biotrophen Mehltaus *Golovinomyces cichoacearum* und des nicht adaptierten Mehltaus *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*. Zusätzlich konnte weder eine durch Salicylsäure, noch durch Jasmonat induzierte Abwehrreaktion beobachtet werden (Ellinger et al., 2013). Auch nach Jacobs et al. (2003) weisen *Arabidopsis* Pflanzen mit einer Expression von GSL5 eine gesteigerte Toleranz gegenüber biotrophen Pathogenen auf. Hier resultierte die Stilllegung von GSL5 durch dsRNA interference in einer Reduktion von Wund- und Papillarcallose während einer Infektion der Blätter mit *B. graminis*, *S. fusca* und *Golovinomyces orontii* (Jacobs, 2003). Die Beobachtungen in *A. thaliana* konnten auch auf monokotyle Pflanzen erweitert werden. Bei einem Infektionsversuch mit dem Schaderreger *Blumeria graminis* konnte festgestellt werden, dass eine transiente Überexpression der Stress-induzierten Callosesynthase GSL5 zu einer erhöhten Resistenz in Gerstepflanzen führt (Chowdhury et al., 2014). Vermehrte Calloseablagerungen konnten auch bei Virusinfektionen in Blättern festgestellt werden (Eschrich, 1995) und Ablagerungen bei Plasmodesmata limitierten die Ausbreitung von Pflanzenviren von Zelle zu Zelle (Bellincampi et al., 2014). In Citrus führte die Stilllegung des Gens GSL6 via RNA interference zur vollständigen Abwesenheit von Calloseablagerungen und einer erhöhten Empfänglichkeit der Pflanzen gegenüber *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Enrique et al., 2011). In einer anderen Studie wurde die fehlende Callosebildung mit einer gesteigerten Anfälligkeit auf eine Infektion mit *Pseudomonas syringae* in Verbindung gebracht (Malinovsky et al., 2014). Im Widerspruch zu den Beispielen für eine positive Korrelation zwischen Callosebildung und Resistenz steht die Beobachtung von Nishimura et al. Hier konnte bei jenen Mutanten von *A. thaliana*, die keine Expression und Ablagerung von Callose zeigten, eine erhöhte Resistenz gegenüber Mehltau verzeichnet werden. Diese Beobachtung konnte wiederum mit einer Hyperaktivität der Salicylsäureabwehr in Verbindung gebracht werden (Nishimura et al., 2003). Es besteht die Vermutung, dass GSL5 durch ein Resistenzgen überwacht wird und bei fehlender Expression die Effektor-getriggerte Immunantwort über Salicylsäure induziert wird (Malinovsky et al., 2014).



## DAS PFLANZENPATHOGEN *FUSARIUM GRAMINEARUM*

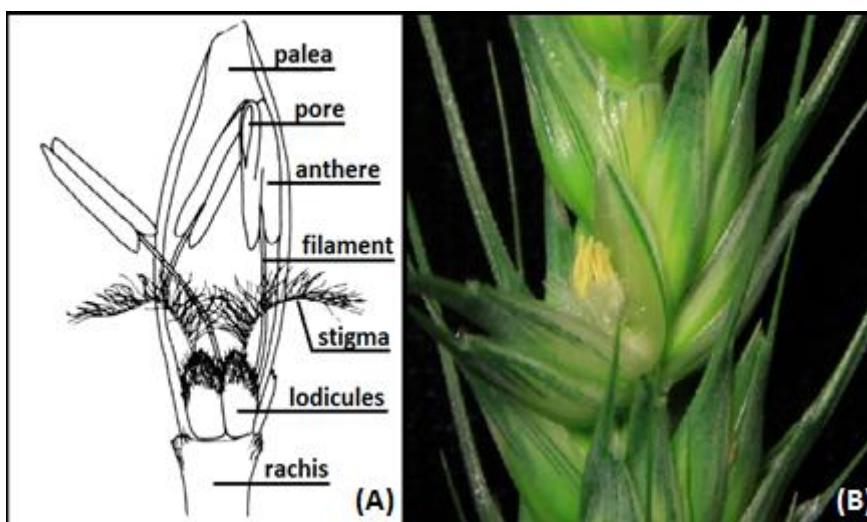
Das Pflanzenpathogen *Fusarium graminearum* mit der Hauptfruchtform *Gibberella zeae* gehört zu den echten Pilzen, zum Stamm der Ascomyceten. Es handelt sich um einen Haupterreger des erstmals im Jahre 1884 in England beschriebenen Krankheitsbildes Fusarium Head Blight (FHB) (siehe Abb.4). Dieses hat sich im letzten Jahrhundert global stark ausgebreitet und befällt unter den Süßgräsern vor allem die Gattungen *Triticum*, *Hordeum*, *Oryza*, und *Avena* (Goswami und Kistler, 2004). Auch innerhalb der Art *F. graminearum* kommt es wiederum zur Aufspaltung in zahlreiche Stämme (Bottalico und Perrone, 2002). Die genetische Variation innerhalb der Spezies ist sehr hoch und beeinflusst die Toxinproduktion, Wirtsinteraktion, Reproduktion und Aggressivität des Pathogens (Osborne und Stein, 2007).

Das Krankheitsbild FHB wird durch zahlreiche klimatische und agronomische Faktoren bedingt. Den größten Einfluss üben Niederschlag und Temperatur zur Blütezeit und auch Stickstoffdüngung, Bodenbearbeitung, Fungizide und Wirtsgenotyp aus (Bottalico und Perrone, 2002). Für eine erfolgreiche Infektion und Etablierung im Bestand werden Standorte der temperaten und semitropischen Zone bevorzugt (Goswami und Kistler, 2004). *F. graminearum* überwintert auf abgestorbenen Getreidehalmen und bildet im Frühjahr unter feuchten Bedingungen Konidien und Ascosporen aus (Shands und Dickson, 1953). Die asexuellen Verbreitungseinheiten sind in Abb. 4 dargestellt. Die Ausbreitung erfolgt primär durch den sexuell gebildeten Sporentypus und wird durch Wind und Regen unterstützt.



**Abb. 4:** *Fusarium graminearum*. (a) Asexuelle Verbreitungseinheiten (Konidien) ([www.apsnet.org](http://www.apsnet.org)); (b) *T. aestivum* mit Ährenfusariose.

Bei Weizen kann eine erfolgreiche Infektion der Ähre mit vom Zeitpunkt der Anthese bis hin zur Stufe der Teigreife stattfinden. Die Ähren der Gerstepflanzen zeigen die höchste Empfänglichkeit zum Zeitpunkt des Verlassens der Blattscheide (McMullen et al., 2012). Die Wirtspflanze kann durch das Pathogen auf quasi allen Ebenen, wie Wurzelstock, Halm, Blatt und Ähre angegriffen und massiv geschädigt werden (Atanasoff, 1920). Während der ersten 48 bis 72 Stunden zeigt *F. graminearum* Eigenschaften eines biotrophen Organismus, und schwenkt nach etwa 72 Stunden zur nekrotrophen Lebensweise um (Boddu et al., 2006). Das Krankheitsbild FHB ist bereits wenige Tage nach einer Infektion erkennbar (Atanasoff, 1920). Die Infektion äußert sich in braunen und schwarzen, nekrotischen Läsionen der Hüllspelzen und einer Verbräunung des Blütenstands (Goswami und Kistler, 2004). Nach der initialen Infektion eines Ährchens kommt es zur weiteren Ausbreitung des Pilzes in den angrenzenden Blüten (siehe Abb. 5). Bei der weiteren Kolonisierung unterscheidet man zwischen vertikalem und horizontalem Mechanismus. Beim horizontalen Mechanismus werden die Antheren und Hochblätter angegriffen. Beim vertikalen Mechanismus über Antheren und Rachis nutzt der Pilz Leitbündel- und Parenchymgewebe, um benachbarte Ährchen zu infizieren. Im Bereich der Rachis kommt es zur Chlorose, Nekrose und zum Verschluss des Leitbündelgewebes (Ribichich et. al, 2000). Die Hyphen wachsen in Weizen vorwiegend in eine Richtung und kolonisieren zuerst inter-, dann intrazellulär die Kortikalzellen und Leitelemente im Zentrum des Rachis. Die infizierten Zelltypen sind umgeben von lebendem Sklerenchym und Epidermiszellen, wodurch die Symptome oft erst relativ spät makroskopisch zu erkennen sind (Brown et al., 2011).



**Abb. 5: Weizenblüten zum Zeitpunkt der Anthese.** (A) Schematischer Aufbau einer Blüte (Hockett, 2000). (B) Geöffnete Weizenblüte mit deutlich erkennbaren, gelben Antheren.

Im weiteren Infektionsverlauf kann es aufgrund der durch den Pilz hervorgerufenen Blockade der Wasser- und Nährstoffzufuhr auch in den gesunden Bereichen oberhalb der Infektionsstelle zu einem Vertrocknen und Ausbleichen des Gewebes kommen (Atanasoff, 1920). Dadurch wird die Bildung vollständig ausgebildeter, gesunder Körner oft verhindert (Aufhammer, 2003). Infizierte Ähren tragen Karyopsen mit unterschiedlicher Befallsstärke, wobei die Körner meist kleiner, entfärbt und in ihrer Keimfähigkeit eingeschränkt sind. Der Grad der Deformierung steht wiederum in Zusammenhang mit dem Infektionszeitpunkt der Ähre (Atanasoff, 1920). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass das Gewebe Fusarium-geschädigter Körner durchzogen von Hyphen ist, wodurch es zu ausgeprägten strukturellen Veränderungen innerhalb, sowie an der Oberfläche des Kornes kommt. Besonders betroffen sind dabei die Ablagerungen von Stärke (Jackowiak et al., 2005).

Neben dem grundsätzlichen Ernteverlust durch verminderte Kornbildung stellen die oftmals gebildeten Toxine Desoxynivalenol (DON), Nivalenol und Zearalenon einen höchst problematischen Faktor dar (Goswami und Kistler, 2004). Die Konsumierung der Mykotoxine zeigt negative Auswirkungen auf die menschliche und tierische Gesundheit, wie Immunsuppression, Wachstumsverringering und Störung des Östrogenhaushaltes (Placinta et al., 1999), (Bohm, 1992). In der Pflanze wirkt sich die Produktion der Mykotoxine inhibitorisch auf die pflanzliche Proteinsynthese aus und steigert die Virulenz des Pathogens (Boddu et al., 2006). Obwohl die Pflanze durch Metabolisierung der Toxine, wie beispielsweise der Glykosilierung von DON, diese für sich zu entgiften vermag, könnte die gesundheitsschädigende Wirkung aufgrund der Zersetzung der modifizierten Toxine im Verdauungstrakt von Tier und Mensch erhalten bleiben (Berthiller et al., 2015).

Das am häufigsten produzierte Mykotoxin ist DON, wobei unterschiedliche Stämme bzw. Populationen auch acetylierte DON-Derivate hervorbringen können (Osborne und Stein, 2007). Weltweit konnten Kontaminationsraten in hohem Ausmaß gemessen werden. In Weizen wurden potenziell gefährliche Level an DON in Deutschland, Polen, Japan, Neuseeland, USA, Kanada und Argentinien verzeichnet. Bei Gerste waren vor allem Norwegen, Japan und USA von hohen DON-Kontaminationen betroffen (Placinta et al., 1999).

## ABWEHR IN GERSTE UND WEIZENPFLANZEN UND DIE VERÄNDERUNG DES ZELLMETABOLISMUS

Obwohl sich die Krankheits-Phänotypen in Weizen und Gerste unterscheiden, zeigen die Resultate von Boddu et al. (2006), dass viele in Weizen beobachtete Aspekte bezüglich der Entwicklungs- und Infektionsstrategie auch auf den Infektionsverlauf von Gerste zutreffen. Bei Gerste und bei Weizen erfolgt die Infektion der Blüten durch die direkte Penetration der Zellwände via Infektionsschlauch-ähnlichen und korallenartigen Strukturen. Die Entwicklung der Infektionsstrukturen und anderer morphologischer Veränderungen tritt bei Weizen zwischen 12 und 24 Stunden früher als bei Gerste auf. Diese Verzögerung könnte mit den physiologischen Unterschieden zwischen Gerste- und Weizenblüten zusammenhängen. Der spätere Zeitpunkt der Auskeimung der Konidien bei Gerste könnte der Pflanze einen zeitlichen Vorteil verschaffen, auf die Penetration zu reagieren und eine weitere Ausbreitung zu verhindern (Boddu et al., 2006).

Auch in hoch empfänglichen Gerstesorten breitet sich die Infektion nicht aus. Meist beschränkt sie sich auf die initial infizierten Blüten und entspricht dem Erscheinungsbild einer Typ II Resistenz in Weizen. Molekularbiologische Untersuchungen führten zu einem Nachweis von *quantitativen trait loci* für eine FHB Resistenz auf jedem der sieben Chromosomen von Gerste (Boddu et al., 2006).

Es konnten drei Stufen der Infektion in Gerste beobachtet werden:

In der biotrophen Phase des Pathogens, zwischen 0 und 48 Stunden nach Inokulation, kommt es zu keiner Penetration der Zellwände, es herrscht eine geringe Akkumulation an Desoxynivalenol und es kann nur eine geringe Induktion an Wirtstranskripten beobachtet werden. Zwischen 48 und 96 Stunden liegt der Beginn der Trichothecen-Biosynthese und es erfolgt der Wechsel zur nekrotrophen Lebensphase. Gleichzeitig erkennt die Wirtspflanze die Infektion und beginnt mit unterschiedlichen Abwehrstrategien. Nach 72 Stunden ist die höchste Konzentration an abwehrspezifischen Transkripten zu verzeichnen. Zwischen 96 und 144 Stunden sinkt die Anzahl der Transkripte wieder, die Konzentration an DON steigt um das 3,5 fache und es werden Nekrosen sichtbar (Boddu et al., 2006).

Gerste nutzt zum eigenen Schutz vermutlich eine Kombination aus basaler und spezifischer Abwehr auf die Pathogenpenetration (Boddu et al., 2006). Während früher Infektionsstadien von Gerste mit *F. graminearum* korrelieren die Infektionslevel mit dem Grad an induzierter Proteom Degradierung. In empfänglichen Ähren zeigt sich nach zwei beziehungsweise drei Tagen nach Inokulation eine erhöhte Expression an Proteinen, die mit oxidativer Stressantwort, PR Proteinen und gesteigertem Energiemetabolismus assoziiert ist. Gleichzeitig ist eine leichte

Proteomdegradierung nach zwei Tagen nach Inokulation bemerkbar. Im Unterschied dazu konnte in resistenter Gerste bisher keine Veränderungen der Proteine assoziiert mit oxidativer Antwort beobachtet werden (Yang et al., 2013). In Gerste konnten sechs funktionale Klassen an Genen identifiziert werden, die für eine Abwehrreaktion codieren, darunter metabolische und regulatorische Proteine, Transportproteine und Enzyme mit diversen Funktionen. Die Interaktion mit *F. graminearum* führte zur Induktion des Phenylpropan-Weges und zur Hochregulation des Tryptophanweges und der Shikimatkinase (Boddu et al., 2006). Durch den Vergleich der Expressionsprofile konnten nach Zhang neun Typen induzierter bzw. hochregulierter Proteine ermittelt werden, die mit einer FHB Resistenz in Verbindung stehen. Diese sind in Mechanismen zur Degradierung pilzlicher und zur Verstärkung pflanzlicher Zellwände an Wirt-Pathogen Interaktionsstellen involviert (Zhang et al., 2013). Im Gegensatz dazu breiten sich in Weizenähren die Krankheitssymptome deutlich innerhalb der Ähre aus (Boddu et al., 2006). Bei einer Infektion mit *F. graminearum* reagiert Weizen mit der Induktion unterschiedlicher Abwehrreaktionen (Boddu et al., 2006). Es kommt zur erhöhten Transkription von Gen-Klassen, die in Verbindungen mit biotischem Stress stehen. Es wird ein Set an Pathogenese-bezogenen PR-Genen und Genen, die in Beziehung zur oxidativen Stressantwort stehen lokal und systemisch aktiviert (Boddu et al., 2006). Als Hauptmechanismen gegen FHB in Weizen werden die Jasmonat- und Ethylen abhängigen Abwehrreaktionen, sowie die Suppression fungaler Virulenzfaktoren angenommen.

Einen zusätzlicher Schlüsselmechanismus bei Pflanzen stellt eine physikalische und chemische Barriere gegen die Zellpenetration, genannt Cell Wall Apposition (CWA) dar (Zhang et al., 2013). Im Zuge der Infektion kommt es im pflanzlichen Gewebe zu Verdickungen der Zellwand. Außerdem konnte eine inter- und intrazelluläre Ablagerung amorphen Materials beobachtet werden, die aber keine effektive Barriere gegen das Pathogen darstellte. Bei der horizontalen Infektion wurde eine durch vermutlich Callose hervorgerufene Verstopfung des Phloems beobachtet (Ribichich et al., 2000). In sowohl teilweise resistenten, als auch empfänglichen Sorten konnte eine lokale und systemische Akkumulation mit biotischem Stress in Verbindung stehender Transkriptome in der Pflanze beobachtet werden (Boddu et al., 2006). Bei inokulierten Weizenpflanzen zeigte sich sowohl in resistenten, als auch empfänglichen Pflanzen fünf Tage nach Inokulation eine verminderte Expression vieler Proteine des Kohlenhydratmetabolismus und der Photosynthese. Verstärkt exprimierte Gene codierten für Antioxidantien, den Jasmonat- und Ethylensignalweg, die Phenylpropan-Biosynthese, Synthese antimikrobieller Komponenten und Aminosäuren, Detoxifizierung, Zellwandverstärkung, und Stickstoffmetabolismus (Yang et al., 2013). Gegen eine basale Penetration des Pilzes ist vor allem Wasserstoffperoxid von großer Bedeutung. Die Pathogen-induzierte Bildung des Oxidationsmittels sorgt für eine Peroxidase-abhängige Lignifizierung der Zellwand. Sechs bis zwölf Stunden nach Inokulation war eine

Akkumulierung von Peroxidase-Gen-Transkripten vermerkbar. Für den Abbau pilzlicher Strukturen sorgen beispielsweise von der Pflanze synthetisierte Chitinasen. Diese hydrolysieren Chitin, die primäre strukturelle Komponente der pilzlichen Zellwand, zu kleineren Oligomeren. Die Überexpression von Chitinase in transgenen Weizenpflanzen konnte direkt mit einer signifikanten Resistenzsteigerung gegen FHB in Verbindung gebracht werden (Zhang et al., 2013).

#### MYKOTOXINE UND DIE PFLANZLICHE ABWEHRREAKTION

Bei einer Infektion von Weizen bzw. Wildgräsern zeigten sich bei *F. graminearum* DON Akkumulierungen und eine Veränderung des Proteoms der Transkriptionsregulation, Abwehrantworten, Nährstoffspeicherung und Stärkebiosynthese (Yang et al., 2013). Die Produktion der Mykotoxine wirkt sich inhibitorisch auf die Proteinbiosynthese aus und steigert auch die Virulenz des Pathogens (Boddu et al., 2006). Auch wenn DON keine essentielle Komponente während der initialen Pilzinfektion darstellt, sorgt das Toxin während des Kolonisierungsprozesses für eine Unterdrückung von Wirtsabwehrreaktionen, wie die Ausbildung von Zellwandverdickungen im Rachisknoten. DON kann jedoch durch Glykosilierung in der Pflanze teilweise detoxifiziert werden (Moretti et al., 2014).

Untersuchungen zu Trichothecen in Weizen zeigten, dass bei einer fehlenden Synthese des Mykotoxins, eine Einwanderung des Pilzes in den Rachisknoten durch die Ausbildung von Zellwandverdickungen verhindert wird. Durch die Bildung von Trichothecen kann dieser Abwehrmechanismus wiederum inhibiert werden. In Weizen führte die konstitutive Überexpression einer Trichothecen-Acetyltransferase zu teilweiseem Schutz gegen die Ausbreitung von FHB unter Gewächshausbedingungen. Die induzierte Abwehrreaktion kann durch deacetylierte Trichothecene verhindert werden. In Gerste wird unabhängig von der An- oder Abwesenheit des Mykotoxins die Ausbreitung der Fusarium-Hyphen im Bereich des Rachisknotens und der Rachilla inhibiert und könnte das Erscheinungsbild einer Typ II Resistenz erklären (Jansen et al., 2005).

#### FORSCHUNGSANSÄTZE ZUR BEKÄMPFUNG VON FHB IN GETREIDEN

Die Entwicklung und Veröffentlichung einer neuen Getreidesorte ist ein langjähriger Prozess. Vor 1990 beschäftigten sich nur wenige Unternehmen in Amerika mit dem Züchtungsziel der FHB Resistenz. Zur Findung jener Gene die eine FHB Resistenz verstärken wurden bereits molekulare Marker eingesetzt (Anderson, 2007). Die Methode des QTL (*quantitative trait locus*) - Mappings stellt eine Hauptmaßnahme der Resistenzfindung gegen *F. graminearum* dar (Yang et al., 2013).

So konnten bereits zahlreiche QTLs für eine Resistenz gegen FHB gefunden werden, wobei eine Kombination von QTL die Wirkung gegen FHB zu erhöhen scheint (Anderson, 2007). Sowohl in Weizen als auch Gerste wurden bereits unterschiedliche transgene Pflanzen mit einer gesteigerten Resistenz unter Gewächshausbedingungen generiert. Die Weizenpflanzen wurden beispielsweise hinsichtlich einer Überexpression einer  $\beta$ -1-3-Glukanase, Chitinase oder eines Pektin-Methylesterase-Inhibitors modifiziert. Im Zuge einer fünfjährigen Feldstudie konnte in Gerste eine reduzierte DON Akkumulierung aufgrund der künstlichen Expressionen eines Thaumatin-like Proteins und Trichothecen-Transporter erreicht werden (Yang et al., 2013).

Grundsätzlich erfordert die Entwicklung sinnvoller Bekämpfungsstrategien das Verständnis der Epidemiologie des Krankheitssystems und der Ökologie des Schaderregers. Der Schutz der Getreidearten gegen eine Infektion mit *F. graminearum* und die Eindämmung des Schadensausmaßes wird nur durch eine integrierte Behandlung und Vorsorge möglich sein. Diese wiederum umfasst nicht nur den Anbau resistenter Sorten, sondern auch die Applikation chemischer Hilfsmittel. Darüber hinaus wird auch der Gebrauch von Technologien zur Wetterbeobachtung und Abschätzung des damit verbundenen Infektionsrisikos an Bedeutung gewinnen (Osborne und Stein, 2007).

## ZIELSETZUNG

Ziel dieser Masterarbeit war die molekularbiologische Charakterisierung hinsichtlich der Callosesynthase AtGSL05 genetisch modifizierter Gerste und Weizenpflanzen auf Genom- und Transkriptomebene, sowie die mikroskopische Detektion spezifischer Calloseablagerungen im Zuge der Pathogenabwehr in Weizen. Zusätzlich sollte in Pflanzen mit nachweislicher Expression der künstlich eingebrachten Callosesynthase AtGSL05 die Stärke des Ährenbefalls durch das Phyopathogen *Fusarium graminearum* untersucht und ein eventueller Zusammenhang zwischen Resistenzlevel und Callosebildung aufgezeigt werden.



# MATERIAL UND METHODEN

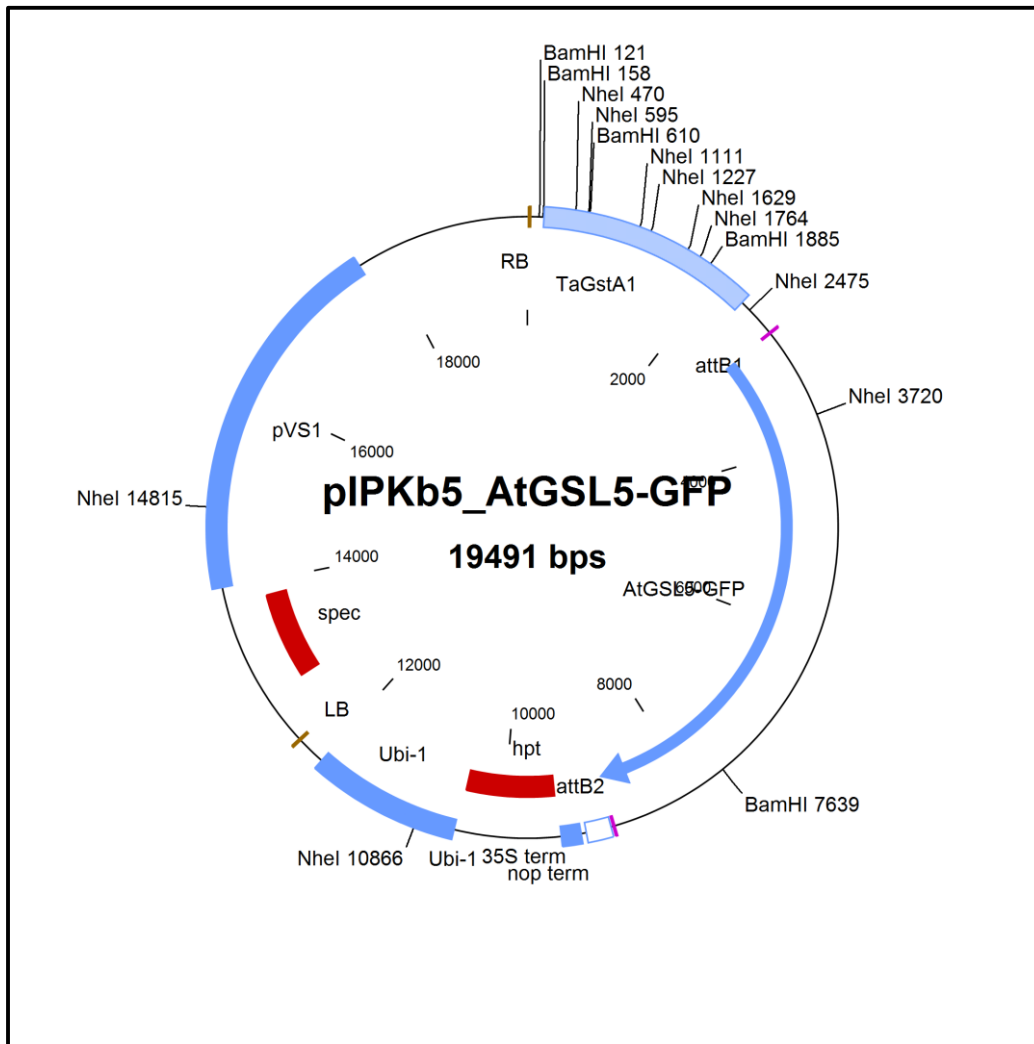
## *TRITICUM AESTIVUM UND HORDEUM VULGARE*

Für die Arbeiten mit Weizen wurde die Sorte „Bob White“ gewählt, die Arbeiten in Gerste wurden mit dem Kultivar „Golden Promise“ durchgeführt. Die Charakterisierung und Untersuchungen hinsichtlich einer Resistenz auf *Fusarium graminearum* erfolgte anhand transgener Weizen- und Gerstelinien mit einer Überexpression der Callosesynthase AtGSL05. Bei den transgenen Weizenlinien handelt es sich um E01-A, E01-B, E04-B, E04-C und E07-A. Für Gerste wurden die Linien 3E-1, 5A-1, 7B-1, 7C-1 gewählt. Als Kontrolle diente der jeweilige Wildtypus von Gerste und Weizen.

Die Karyopsen wurden über Nacht auf befeuchtetem Filterpapier vorgekeimt und die Keimlinge anschließend in Anzuchterde transferiert. Die Pflanzen wurden unter konstanten Bedingungen in einer Klimakammer herangezogen. Hierfür wurden Langtagbedingungen mit 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit gewählt. Die Luftfeuchtigkeit betrug 70%, die Temperatur 20°C.

## *GENETISCHE MODIFIKATION DES GERSTE- UND WEIZENSAATGUTS*

Das Saatgut für die Anzucht der Gerste- und Weizenpflanzen stammt aus dem Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, Sachsen-Anhalt. Die Pflanzen wurden hinsichtlich einer Überexpression der Callosesynthase AtGSL05 modifiziert. Die Gensequenz stammt ursprünglich aus Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) und wurde mittels *Agrobacterium tumefaciens* medierter Transformation in das Genom der Wirtspflanzen eingebracht. Als Vektor diente das Plasmid pIPKb005\_AtGSL5-GFP. Bei den IPKb-Plasmiden handelt es sich um Binärvektoren speziell hergestellt für die Transformation von Getreiden zugunsten einer Überexpression. Der gewählte Vektor zeigt eine Epidermis-spezifische Expression des Transgens mit terminal fusioniertem GFP-Tag. Das Konstrukt steht unter Kontrolle des Promotors TaGSTA1 aus *Triticum aestivum*. Der Selektionsmarker, eine Hygromycin-Phosphotransferase (hptR), steht unter der Kontrolle des ubiquitären Promotors ZmUBI1 isoliert aus *Zea mays* (Himmelbach et al., 2007). Die Bezeichnungen NheI und BamHI markieren Schnittstellen zweier Restriktionsendonukleasen. Die Plasmidkarte ist in Abb. 6 dargestellt.



**Abb.6 : Plasmidkarte des Vektors pIPKb005\_AtGSL5-GFP.** AtGSL5-GFP = Sequenz für Callosesynthase AtGSL05 mit fusioniertem GFP-Tag; RB = Right Border; LB = Left Border; TaGstA1 = Weizen Glutathion-S-Transferase 1 Promotor; Ubi-1 = Ubiquitin 1 Promotor; hpt = Hgromycin Resistenzgen für Pflanzenselektion; pVS1 = *Agrobacterium* Origin of Replication; spec = Spectinomycin Resistenzgen für Bakterienselektion; NheI = Schnittstelle für Endonuklease NheI HF; BamHI = Schnittstelle für Endonuklease BamHI.

### *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Sämtliche Infektionsversuche der Ähren von Gerste- und Weizenpflanzen wurden mit asexuellen Sporen des natürlich vorkommenden Pathogens *Fusarium graminearum* durchgeführt. Hierfür wurde mit dem Stamm 8.1 gearbeitet.

Für die Anzucht des Ascomyceten wurden Platten mit Synthetic Nutrient Poor Agar (SNA) nach Nirenberg 1981 vorbereitet. Die Zusammensetzung ist Tab. 12 zu entnehmen. Es wurde eine Suspension mit 1000 Konidien unter der Sterilbank aufgebracht und mit einem abgeflamten Drigalskyspatel gleichmäßig verteilt. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen und bei 28°C und

16 Stunden Licht gelagert. Die Konidienernte erfolgte nach etwa 21 Tagen unter der Sterilbank. Der Pilzrasen wurde mit H<sub>2</sub>O Mili-Q benetzt und mit einem sterilen Drigalskyspatel abgeschabt. Die Suspension wurde abgenommen und durch einen Wilson-Sieb mit einer Porengröße von 200 µm filtriert, um Pilzmyzel und Agar-Rückstände zu entfernen. Die Konidien wurden mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt, auf eine Konzentration von 10 Konidien/µl eingestellt und in Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Lagerung der Konidien erfolgte bei -70°C.

## SELEKTION TRANSGENER PFLANZEN VIA HYGROMYCIN-BLATTASSAY

Die Selektion erfolgreich transformierter Pflanzen erfolgte durch die Untersuchung jeder Pflanze auf eine Hygromycin-B Resistenz. Bei Hygromycin handelt es sich um ein Aminoglykosid-Antibiotikum, mit inhibitorischer Wirkung auf die Proteinsynthese in sowohl Pro-, als auch Eukaryonten (Gonzalez et al., 1978). Bei Hygromycin-sensitiven Pflanzen verursacht es ein rasches Absterben der Blattstücke. Aufgrund der Kopplung der Callose-Synthase an eine Hygromycin-Resistenz im Plasmid, konnten erfolgreich transformierte Pflanzen mittels Hygromycin-Selektionsmedium aussortiert werden.

Um einem natürlichen Vergilben der Blätter vorzubeugen wurde das auf Plant-Agar basierende Medium mit Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (MS-Salz), sowie dem Phytohormon 6-Benzylaminopurin (BAP) versetzt. MS-Salz dient der Anreicherung des Mediums mit Mikro- und Makronährstoffen; das synthetisch hergestellte Cytokinin 6-Benzylaminopurin bewirkt bei pflanzlichen Gewebekulturen eine Förderung des Pflanzenwachstums (Sigma-Aldrich). Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tab. 12 angeführt.

Bei der Medien-Zubereitung wurden Plant-Agar (Duchefa) und MS-Salz (Sigma-Aldrich) eingewogen, mit sterilem H<sub>2</sub>O Mili-Q auf das entsprechende Volumen aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend wurde das Medium auf etwa 50°C abgekühlt, unter der Sterilbank mit 6-Benzylaminopurin und Hygromycin-B versetzt und in sterile Petrischalen gegossen.

Für die Blatt-Assays wurden zwei Zentimeter lange Blattstücke zwei Wochen alter Pflanzen unter der Sterilbank auf dem Selektivmedium platziert. Nach erfolgter Applikation wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und in einem RUMED - Klimaschrank der Firma Rubarth Apparate GmbH gelagert. Die Licht-Exposition erfolgte täglich für 16 Stunden bei einer Temperatur von 22°C und 65%-iger Luftfeuchtigkeit. Die Auswertung der Platten erfolgte nach 10 Tagen.

## NACHWEIS DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN GENOMISCHER DNA

Nach der Selektion der transgenen Pflanzen wurde die genomische DNA der Weizen- und Gerstepflanzen auf das künstlich eingebrachte Gen der Callose-Synthase AtGSL05 untersucht. Als Kontrolle dienten die jeweiligen Wildtypen, sowie jene Pflanzen der vermeintlich transgenen Linien, die im Zuge der Hygromycin-basierten Selektion keine Resistenz gegen das Antibiotikum aufzeigten.

### *ISOLIERUNG DER gDNA NACH WAITE*

Für den Integrationsnachweis des Gens AtGSL05 in der genomischen DNA der transgenen Pflanzen wurde gDNA drei bis vier Wochen alter Pflanzen isoliert. Hierfür wurden etwa 2 cm große Blattstücke jeder Pflanze in Schraubdeckelreaktionsgefäße mit zwei Stahlkugeln überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial mittels Schwingmühle der Firma Retsch zerkleinert. Um ein Antauen des Materials zu verhindern, wurden die Mahlbecher aus Stahl ebenfalls in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Das Mahlen der Proben erfolgte bei einer Frequenz von 30 Hz für drei Minuten. Die Proben wurden bis zur Zugabe des Puffers in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Proben wurden mit 800 µl Waite-Puffer (siehe Tab. 11) versetzt und durch kräftiges Mischen am Vortex homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 800 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Gemisches im Verhältnis 25:24:1 der Firma Roth. Die Proben wurden zwei Minuten am Vortex gemischt und für drei Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 800 µl Isopropanol und 80 µl 3M Natriumacetat pH=5,2 versetzt, die Probe invertiert und der Fällungsansatz bei -20°C über Nacht weggefroren. Die gefällten Nukleinsäuren wurden durch zehn minütiges Zentrifugieren bei 13 000 rpm und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen; der Waschschriff des Pellets umfasste die Zugabe von 800 µl Ethanol [70 %] und die ein-minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet bei 37°C am Heizblock getrocknet. Die gereinigten Nukleinsäuren wurden in 100 µl TE-Puffer pH=8,0 (siehe Tab. 11) gelöst. Zur Reinigung der Probe von ebenfalls isolierter RNA erfolgte ein 30 minütiger RNase-Verdau. Hierfür wurde jeder Probe 4 µl RNase A (1000x) (Thermo Scientific) zugefügt und die Proben bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 300rpm am Heizblock (Bioer Technology) inkubiert.

### *ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER ISOLIERTEN NUKLEINSÄUREN*

Die isolierte gDNA wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung auf eine mögliche Degradierung der Nukleinsäuren untersucht. Es wurden 5 µl des gDNA Isolats mit 1 µl Loading Dye (Thermo Scientific) versetzt und auf 1 %-iges Agarose-Gel aufgetragen. Als Größenstandard

dienten 2 µl des 1kb Plus DNA-Markers der Firma Invitrogen. Die Auftrennung erfolgte in TBE-Puffer 1x (siehe Tab. 11) bei 100 Volt für 30 Minuten in einer Mupid One System Gelkammer (Takara Bio Inc.). Das Gel für 15 Minuten einer Ethidiumbromid-Lösung (siehe Tab. 11) ausgesetzt. In dieser Zeit kommt es zur Interkalierung der Ethidiumbromid-Moleküle in die Nukleinsäurestränge, wodurch Nukleinsäuren durch die anschließende Anregung im UV-Licht detektiert werden können.

#### *PCR-NACHWEIS DER CALLOSE SYNTHASE ATGSL05 IN GENOMISCHER DNA*

Um die Integration des Gens AtGSL05 in der genomischen DNA nachzuweisen wurde eine qualitative PCR mit spezifischen Primern für die gewünschte Callosesynthase durchgeführt. Hierfür wurde die Primer AG\_intra\_GSL5\_for mit der Sequenz 5'ATGAAGACTTCTACCGGCAG-3' und AB04\_AtGSL5\_rev mit der Sequenz 5'-CGTGAAGCTCGAGCAAAGC-3' gewählt. Dieses Primerpaar bindet innerhalb der Sequenz von AtGSL05, wodurch es bei erfolgreich transformierten Pflanzen zur Amplifizierung eines Fragments von 2500 bp kommt. Da bereits geringste Mengen an DNA für eine erfolgreiche Reaktion ausreichen, erfolgte eine 1:10 Verdünnung des Isolats mit H<sub>2</sub>O Mili-Q. Der PCR-Ansatz setzte sich folgend zusammen:

##### PCR-Ansatz (20 µl):

1,0 µl gDNA  
0,6 µl dNTPs  
4,0 µl Green GoTaqReaction Buffer [5x]  
0,1 µl GoTaq G2 DNA Polymerase  
2,0 µl AG\_intra\_GSL5\_for  
2,0 µl AB04\_AtGSL5\_rev  
10,3 µl H<sub>2</sub>O Mili-Q

Die PCR erfolgte in einem TProfessional ThermoCycler (Biometra); das Temperaturprotokoll wurde folgendermaßen gewählt: Zu Beginn der PCR durchliefen die Proben eine einmalige, 2 minütige Phase zur Denaturierung der DNA-Stränge bei 94°C. Der erste Schritt der sich wiederholenden Zyklen war eine Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 54°C für 30 Sekunden; entsprechend der Fragmentlänge von 2 500 bp wurde eine Elongationszeit für 2 Minuten und 30 Sekunden bei 72°C gewählt. Diese drei Schritte wurden insgesamt 34mal wiederholt. Die finale Elongation verlief bei 72°C für 5 Minuten (siehe Tab.1).

Tab.1: PCR-Programm – Nachweis AtGSL05 in genomischer DNA

	Temperatur [°C]	Zeit [Sek]	Zyklen
<i>Initiale Denaturierung</i>	94	120	
<i>Denaturierung</i>	94	30	} 34x
<i>Primeranlagerung</i>	54	30	
<i>Elongation</i>	72	150	
<i>Finale Elongation</i>	72	300	
<i>Pause</i>	4	∞	

Zur Überprüfung der PCR Amplifikation wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 10 µl des PCR-Amplifikats, sowie 5 µl des DNA-Markers auf ein 1%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Es wurde kein Loading Dye zusätzlich zu den Proben hinzugefügt, da dieser bereits im Reaktionspuffer enthalten war. Die Auftrennung erfolgte in TBE-Puffer 1x (siehe Tab. 2) bei 100 Volt für 30 Minuten. Die Detektion der Nukleinsäuren wurde mittels Ethidiumbromid-Lösung und UV-Licht-Exposition durchgeführt.

## EXPRESSIONSANALYSE VON ATGSL05 IN ÄHREN- UND BLATTGEWEBE

Nach der Sicherstellung der Integration der Sequenz für AtGSL05 in der genomischen DNA wurden die Pflanzen auf die Expression des gewünschten Gens im Blatt, sowie in der Ähre untersucht. Dazu wurde eine RNA-Isolierung vorgenommen, diese in cDNA revers transkribiert und die entsprechende Basensequenz mittels qualitativer und quantitativer PCR nachgewiesen. Als Kontrolle diente die isolierte RNA des Wildtyps.

### *RNA ISOLIERUNG AUS BLATTGEWEBE*

Bei der Isolierung der RNA aus transgenem Pflanzengewebe, sowie aus dem Wildtyp wurden stets RNase-freie Reagenzien gewählt, um einer möglichen Degradierung der RNA vorzubeugen. Es wurden 2 cm große Abschnitte junger Blätter in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Schraubdeckelgefäßen mit zwei Stahlkugeln mittels Schwingmühle (Retsch) zerkleinert. Die Zermahlung erfolgte bei einer Frequenz von 30 Hz für drei Minuten. Die Mahlbehälter wurden ebenfalls in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die pulverisierten Proben wurden bis zur Weiterverwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Blattmaterial wurde mit 500 µl peqGold Trifast (PEQLAB), einem Gemisch aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, versetzt und anschließend mittels Vortex homogenisiert. Das Homogenat wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben invertiert und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei 12000 rpm. Der klare Überstand wurde mit der Pipette abgenommen und in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte durch Inkubation der Proben für 20 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 300 µl Ethanol [75 %] gewaschen. Dazwischen lag jeweils ein Zentrifugationsschritt für 20 Minuten bei 13000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde durch Abgießen vom Überstand getrennt und für 20 Minuten bei 40°C am Heizblock getrocknet. Das Nukleinsäuregemisch wurde in 50 µl DEPC Wasser gelöst. Um isolierte DNA aus den Proben zu entfernen wurde ein 30 minütiger DNase I Verdau (Thermo Scientific) bei 37°C durchgeführt.

#### DNase I Verdau-Ansatz (100µl):

50,0 µl Nukleinsäureisolat  
10,0 µl DNase Puffer (10x)  
0,5 µl RNase Inhibitor Ribolock  
5,0 µl DNase I  
34,5 µl DEPC Wasser

Der Reaktionsstopp erfolgte durch die Zugabe von 10 µl EDTA und Erhitzen der Probe auf 65°C für 10 Minuten. Es folgte ein erneuter Fällungsschritt. Die Proben wurden mit 11,0 µl 3 M Natriumacetat pH=5,2, 5 µl Glykogen und 315 µl Ethanol [100 %] versetzt, durch invertieren gemischt und die RNA über Nacht bei -70°C gefällt.

Die RNA wurde durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4°C pelletiert und zweimal mit Ethanol [70 %] gewaschen, wobei für 20 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde jeweils verworfen und die Reaktionsgefäße auf Handtuchpapier vorsichtig abgeklopft. Die isolierte RNA wurde am Heizblock für 10 Minuten bei 40 °C getrocknet, bis keine Ethanolrückstände im Reaktionsgefäß mehr sichtbar waren. Die RNA wurde in 50 µl DEPC Wasser gelöst. Die Qualität und die Konzentration der isolierten RNA wurden photometrisch mittels Spektrophotometer des Typus NanoVue™ Plus (GE Healthcare) bestimmt.

### *RNA ISOLIERUNG AUS DER ÄHRE*

Die Genexpression variiert innerhalb unterschiedlicher Gewebetypen in Pflanzen (Referenz). Für die weiterführenden Infektionsversuche mit *Fusarium graminearum* ist vor allem eine Expression der Callosesynthase AtGSL05 im Ährgewebe von entscheidender Bedeutung. Für die Expressionsanalyse wurden Ähren zum Zeitpunkt der Anthese ausgewählt und mittels Mörser und Pistill zerkleinert. Zur Inaktivierung eventuell vorhandener RNAsen, wurden die Porzellanschalen zuvor für 4 Stunden bei 260°C im Ofen gebacken und anschließend zuerst bei -70°C und dann im flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Es wurden frische Ähren nachweislich transgener Pflanzen, sowie des Wildtyps geerntet, in 15 ml Falcon Tubes transferiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Ähren wurden unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff fein zermahlen. Bereits gebildete Kornansätze wurden mittels einer Pinzette entfernt, da ein hoher Stärkegehalt in der Probe die RNA Isolierung erschwert und einen störenden Einfluss auf nachfolgende PCR Amplifikationen ausüben kann. Nach der Pulverisierung des Pflanzenmaterials wurde die Ähren-RNA auf dieselbe Weise wie Blatt-RNA extrahiert.

### *PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER ISOLIERTEN RNA*

Um sowohl die Konzentration, als auch die Qualität der isolierten RNA zu ermitteln wurden 2 µl jeder Probe am Spektrophotometer vermessen. Als Referenzflüssigkeit wurde DEPC Wasser verwendet. Die Konzentration wurde durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Ein OD<sub>260</sub>-Wert von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml RNA.

Der Reinheitsgrad der RNA wurde durch das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt, wobei ein Wert um 2,0 als Optimum definiert



ist. Der Kurvenverlauf des Absorptionsspektrums über einen Wellenlängenbereich von 320 bis 350 nm gab Aufschluss über die Qualität der isolierten RNA. Der Hochpunkt der Kurve, somit das Absorptionsmaximum, liegt im Optimalfall bei einer Wellenlänge von 260 nm. Anhand der Messdaten wurden jene Proben für die Weiterverarbeitung ausgewählt, deren RNA-Konzentrationen, Reinheitsgrade und Kurvenverläufe dem Soll-Wert entsprachen.

### *cDNA SYNTHESE*

Für den Expressionsnachweis von AtGSL05 im transgenen Blatt- und Ährengewebe wurde die RNA in cDNA transkribiert. Dies erfolgt mittels des thermostabilen Enzyms Thermo Scientific Maxima Reverse Transkriptase (Thermo Scientific), welche über eine RNA- und DNA-abhängige Polymerase-Aktivität, sowie eine RNase H Aktivität verfügt. Im Zuge der cDNA Synthese wird komplementär zum RNA Strang ein neuer DNA Strang gebildet. Im weiteren Verlauf wird der RNA Strang durch die RNase H abgebaut und die Einzelstrang-DNA zur Doppelstrang-DNA vervollständigt.

Für die cDNA Synthese wurde der Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific) verwendet. Es wurden 500 ng RNA pro Ansatz eingesetzt; das entsprechende Volumen wurde mithilfe der photometrischen Konzentrationsbestimmung berechnet.

#### cDNA Synthese Ansatz (10 µl):

500 ng RNA

2,0 µl Reactionmix [5x]

0,5 µl Maxima Enzym Mix

→ ad 10 µl RNase free Water PCR grade

Der Reaktionsmix (Thermo Scientific) enthält Reaktionspuffer, dNTPs, oligo(dT)<sub>18</sub> und random Hexamerprimer; der Maxima Enzym Mix enthält die Enzyme Maxima Reverse Transkriptase und Ribolock RNase Inhibitor. Die reverse Transkription wurde mittels Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Da für die cDNA Synthese random Hexamer Primer verwendet wurden, wurden die Ansätze zunächst für 10 Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend für 30 Minuten auf 50°C erhitzt, wobei in diesem Schritt die Umschreibung von RNA in cDNA stattfindet. Abschließend werden die Reaktionsansätze für 5 Minuten auf 85°C erhitzt und es kommt zu einer Inaktivierung der Enzyme. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

## QUALITATIVE PCR IN GERSTE UND WEIZEN

Für den Expressionsnachweis von AtGSL05 in den transgenen Gerste- und Weizenlinien wurde zuerst eine qualitative PCR durchgeführt.

Hierfür wurden Primer gewählt, die innerhalb der Coding Region von AtGSL05 binden und ein für AtGSL05 spezifisches Fragment von 114 bp amplifizieren. Der forward Primer AB03-AtGSL5-fwd-exp ist die 18 Nukleotid lange Sequenz 5'-ATCCAATACGCCCGTGAC-3', beim reverse Primer AB04-AtGSL5-rev handelt es sich um die 18 Nukleotid lange Sequenz 5'-CGTGA ACTCGAGCAAAGC-3'. Zur Überprüfung der Intaktheit der cDNA und der PCR-Bedingungen wurde als Referenzgen Aktin gewählt, welches sowohl in transgenen Pflanzen, als auch im Wildtyp exprimiert wird. Hierfür wurden der forward Primer BS116\_Ta-Act-fw mit der 21 Nukleotid langen Sequenz 5'-ATCATCCTGTGTTGCTGACTG-3' und der reverse Primer BS117\_Ta-Act-rev mit der 21 Nukleotid langen Sequenz 5'-GATTGCGACATACATTGCTGG-3' verwendet. Das Primerpaar bindet in der Coding Region des Referenzgens und dient der Amplifizierung eines Aktin-spezifischen Fragments von 180 bp. Für den PCR Ansatz wurde die synthetisierte cDNA 1:20 in H<sub>2</sub>O Mili-Q verdünnt und hiervon 1,0 µl als Matritze eingesetzt.

### PCR-Ansatz (20 µl):

1,0 µl cDNA (1:20 verdünnt)  
0,6 µl dNTPs  
2,0 µl AB03-AtGSL5-fwd-exp bzw. BS116\_Ta-Act-fw  
2,0 µl AB04-AtGSL5-rev bzw. BS117\_Ta-Act-rev  
0,1 µl GoTaq G2 DNA Polymerase  
4,0 µl GreenGoTaqReaction Buffer [5x]  
0,3 µl H<sub>2</sub>O Mili-Q

Für jede Primerpaarung wurde ein Mastermix aus den PCR-Komponenten angesetzt, in den PCR Tubes vorgelegt und mit 1,0 µl der cDNA gemischt. Die Amplifizierung der Aktin-, sowie der AtGSL05-spezifischen Fragmente verlief unter denselben Bedingungen in einem TProfessional ThermoCycler (Biometra). Die initiale Denaturierung der DNA Stränge verlief bei 94° für 2 Minuten. Der Denaturierungsschritt zu Beginn eines jeden Zyklus wurde auf 30 Sekunden bei 94°C festgelegt. Die Primer-Anlagerung erfolgte für 30 Sekunden bei 55°C. Für die zyklische Elongationszeit wurde entsprechend der Länge der Aktin- und AtGSL05-Fragmente eine Dauer von 30 Sekunden bei 72°C gewählt. Diese drei Schritte wurden insgesamt 30mal durchgeführt. Abschließend folgte eine finale Elongation für 5 Minuten bei 72°C (siehe Tab. 2).

Tab. 2: PCR-Programm – Nachweis AtGSL05 und Aktin in cDNA

	Temperatur [°C]	Zeit [Sek]	Zyklen
<i>Initiale Denaturierung</i>	94	120	
<i>Denaturierung</i>	94	30	} 29x
<i>Primeranlagerung</i>	55	30	
<i>Elongation</i>	72	30	
<i>Finale Elongation</i>	72	300	
<i>Pause</i>	4	∞	

#### QUANTITATIVE RT-QPCR IN GERSTE UND WEIZEN

Für die quantitative Expressionsanalyse der Callose-Synthase in Blatt- und Ährgewebe transgener Weizen- und Gerstelinen wurde eine RT-qPCR mittels LightCycler 480 Real-Time PCR System II (Roche) durchgeführt. Als Referenzgen diente Aktin. Wie bereits bei der qualitativen PCR wurde zur Amplifizierung der Sequenz von AtGSL05 die Primerpaarung AB03-AtGSL5-fwd-exp und AB04-AtGSL5-rev gewählt. Für die Amplifizierung des Aktin-Fragments in Weizen diente die Primerpaarung AG-Ta-Actin\_for und AG-Ta-Actin\_rev, in Gerste die Primerpaarung AG-Hv-Actin\_for und AG-Hv-Actin\_rev (siehe Tab. 5).

Als Template-Material diente jene 1:20 verdünnte cDNA, die auch für die qualitative PCR eingesetzt wurde. Die RT-qPCR wurde mittels Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix [2x] (Thermo Scientific) durchgeführt. SybrGreen ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der in die DNA interkaliert und somit eine Messung der amplifizierten DNA Menge ermöglicht. Da es sich bei SybrGreen um einen lichtempfindlichen Cyanin-Farbstoff handelt, wurden die Proben mit Alufolie abgedeckt und eine Lichtexposition der Proben und Mastermixe weitgehend vermieden. Sämtliche Arbeiten wurde auf Eis durchgeführt.

Der Mastermix enthielt bereits eine Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten PCR Puffer. Es mussten daher nur die entsprechenden Primer und die cDNA hinzugefügt werden.

PCR-Ansatz (20 µl):

- 5,0 µl cDNA
- 10,0 µl Maxima™ SYBRGreen Master Mix [2x]
- 1,0 µl AB03-AtGSL5-fwd-exp // AG\_Ta\_Actin\_for // AG\_Hv\_Actin\_for
- 1,0 µl AB04-AtGSL5-rev // AG\_Ta\_Actin\_rev // AG\_Hv\_Actin\_rev
- 3,0 µl H<sub>2</sub>O PCR grade

Um Konzentrationsabweichungen der Komponenten in den einzelnen PCR-Ansätzen zu vermeiden wurde zuerst ein Super-Mastermix aus Wasser, Primern und Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix angesetzt. Aufgrund der Berücksichtigung eines Pipettierfehlers wurden bei der Erstellung des Super-Mastermixes die Volumina jeder Komponente mit 0,1 multipliziert.

Da für den AtGSL05-Nachweis jeder Probe drei Messungen durchgeführt werden sollten, wurden 16,5 µl jeder cDNA Probe mit 49,5 µl Super-Mastermix vermischt und hiervon dreimal 20 µl auf eine 96 Well Platte aufgetragen. Bei der Expressionsanalyse des Referenzgens wurden nur zwei Replikate pro Probe angefertigt. In diesem Fall wurden 11,0 µl cDNA mit 33,0 µl Super-Mastermix vermischt und zweimal 20 µl auf dieselbe Platte aufgetragen. Für die Wasserkontrollen wurde der Super-Mastermix mit 16,5 µl H<sub>2</sub>O PCR grade (Roche) vermischt und hiervon wurden ebenfalls drei Replikate auf die Platte aufgetragen. Die Temperaturabfolge im Cycler, sowie die entsprechenden Zeiten sind in Tab. 3 dargestellt. Es wurden 45 Zyklen durchgeführt. Während eines jeden Zyklus' wird die Fluoreszenz der Probe, die proportional mit der Menge der PCR Produkte zunimmt, erfasst.

Tab. 3: PCR-Programm für RT-qPCR - Nachweis AtGSL05 und Aktin in cDNA

	Temperatur [°C]	Zeit [Sek]	Zyklen
<i>Initiale Denaturierung</i>	94	120	
<i>Denaturierung</i>	94	30	} 44x
<i>Primeranlagerung</i>	55	30	
<i>Elongation</i>	72	30	
<i>Finale Elongation</i>	72	300	
<i>Pause</i>	4	∞	

Für die Auswertung wurden die CP Werte aller Replikate der Proben erfasst und die Schmelzkurven betrachtet. Die CP Werte geben Auskunft ab welchem Zyklus eine AtGSL05- bzw. Aktinamplifizierung nachgewiesen werden konnte. Die Schmelzkurven dienen der Absicherung, dass es sich bei dem Amplifikat auch tatsächlich um das gewünschte Produkt handelt.

## SOUTHERN BLOT DER WEIZENLINIEN

Die Anfertigung eines Southern Blots sollte Aufschluss darüber geben, wie oft das Transgen AtGSL05 in das Genom der Weizenpflanzen integriert wurde. Weiters sollte mithilfe des Southern Blots festgestellt werden, ob es sich bei den Linien E01-A, E01-B, E04-B, E04-C und E07-A tatsächlich um genetisch unterschiedliche Linien handelt.

### *HERSTELLUNG DER SONDE*

Für den Southern Blot wurde eine neue Sonde synthetisiert, die spezifisch an einen Sequenzteil des AtGSL05-GFP Konstrukts im Genom bindet. Als Template fungierte der Vektor pYES AtGSL05\_GFP\_SSS1. Als forward Primer diente der Primer AB03-AtGSL5-fwd-exp. Der reverse Primer BS102\_sGFP-exp-r mit der Sequenz 5'-CTGAACTTGTGGCCGTTTAC-3' bindet 85 bp des GFP-Tags des Vektors. Die Größe der Sonde umfasste 519 bp.

#### PCR - Ansatz (25 µl):

1,0 µl Vektor  
5,0 µl GoTaq Buffer [5x]  
0,5 µl dNTPs  
5,0 µl Dig-labeled UTPs  
1,0 µl AB03-AtGSL5-fwd-exp  
1,0 µl BS102\_sGFP-exp-r  
0,5 µl GoTaq G2 Polymerase  
14,5 µl H<sub>2</sub>O Mili-Q

Bei Digoxigenin handelt es sich um ein 390.5 Da großes Steroid und wird im Zuge des Southern Blots von einem Anti-Digoxigenin Antikörper gebunden. Die Interaktion von Digoxigenin, Antikörper und dem chemilumineszenten Substrats CSPD ermöglicht die Detektion der gewünschten DNA Fragmente. Der Kontrollansatz enthielt keine Digoxigenin-markierten UTPs und wurde daher mit 16,0 µl H<sub>2</sub>O Mili-Q aufgefüllt. Das Endvolumen betrug 25,0 µl. Die PCR erfolgte in einem TProfessional ThermoCycler (Biometra). Das Temperaturprofil wurde folgend gewählt: Die initiale Denaturierung erfolgte für 2 Minuten bei 94°C. Die sich wiederholenden 30

Zyklen setzten sich aus einem Denaturierungsschritt für 30 Sekunden bei 94°C, der Primer-Anlagerung für 30 Sekunden bei 56°C und der Elongation für 60 Sekunden bei 72°C zusammen. Nach den 30 Zyklen folgte eine finale Elongation für 5 Minuten bei 72°C (siehe Tab.4).

Tab. 4: PCR-Programm zur AtGSL05-spezifischen Sondenherstellung für den Southern Blot

	Temperatur [°C]	Zeit [Sek]	Zyklen
<i>Initiale Denaturierung</i>	94	120	
<i>Denaturierung</i>	94	30	} 29x
<i>Primeranlagerung</i>	56	30	
<i>Elongation</i>	72	30	
<i>Finale Elongation</i>	72	300	
<i>Pause</i>	4	∞	

Die Sonde wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen; die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt für 30 Minuten. Das Gel wurde in einer Ethidiumbromidlösung für 15 Minuten gefärbt und die Banden im UV-Licht detektiert. Der PCR Ansatz der Sonde wurde bis zur Durchführung des Southern Blots bei -20°C gelagert. Für den Southern Blot wurde die Sonde für fünf Minuten bei 100°C am Thermoblock aufgeköcht, für fünf Minuten auf Eis abgekühlt und in 30 ml des Hybridisierungspuffers DIG Easy Hyb™ (Sigma-Aldrich) aufgenommen.

#### RESTRIKTIONSVERDAU DER GENOMISCHEN DNA

Es wurde gDNA nachweislich transgener Pflanzen wie unter Punkt beschrieben isoliert und die Qualität und Konzentration mittels NanoVue™ Plus Spektrophotometer (GE Lifesciences) bestimmt. Für den Verdau wurde das Typ-II Restriktionsenzym BamHI (ThermoFisher Scientific) gewählt. Die Schnittstellen der Endonuklease BamHI liegen außerhalb der Sequenz der Callosesynthase AtGSL05. Die Endonuklease stammt aus dem Mikroorganismus *Bacillus amyloliquefaciens*. Sie erkennt und bindet die symmetrische, palindromische Sequenz 5'-G↓GATCC-3' in doppelsträngiger DNA. Der Schnitt erfolgt daraufhin durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen zwischen den Guanin-Basen beider Stränge und unter der Ausbildung eines 5'-Überhangs (George und Chirikjian, 1982). Die Reaktion erfolgte in Buffer G mit BSA [10x] (Fermentas) (siehe Tab. 7).

#### Ansatz Restriktionsverdau (150 µl):

100,0 µl gDNA

15,0 µl Buffer G mit BSA [10x]

3,0 µl Restriktionsenzym BamHI [10U/µl]

32,0 µl H<sub>2</sub>O Mili-Q

Der Ansatz wurde entsprechend des Temperaturoptimums des Restriktionsenzym bei 37°C über Nacht inkubiert (ThermoFisher Scientific).

Für die Extraktion der geschnittenen gDNA wurden die Ansätze mit 15 µl 3 M Natrium Acetat und 300 µl Isopropanol vermischt und für zwei Stunden bei -20 °C gefällt. Die Proben wurden in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge für 30 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Die Proben wurden erneut in der gekühlten Zentrifuge für 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, die Proben auf Handtuchpapier abgeklopft und für 10 Minuten am Heizblock bei 37°C getrocknet. Das Pellet wurde in 40 µl H<sub>2</sub>O Mili-Q resuspendiert.

Bei der Positivkontrolle handelte es sich um das Plasmid pYES AtGSL05\_GFP\_SSS1. Für den Restriktionsverdau wurde das Restriktionsenzym NheI HF (New England Biolabs) gewählt. Das Restriktionsenzym schneidet außerhalb der AtGSL05 Sequenz. Bei NheI HF handelt es sich um eine Typ II - Restriktionsendonuklease aus *Neisseria mucosa* mit der symmetrischen Erkennungssequenz 5'-G↓CTAGC-3'. Die Schnittstelle liegt zwischen den Nukleinbasen Guanin und Cytosin (<http://rebase.neb.com/rebase/enz/NheI.html>). Der Zusatz HF steht für ein „High Fidelity“ Produkt von New England BioLabs mit verbesserte Leistungsfähigkeit.

Für den Restriktiosansatz wurden 6,0 µl Plasmid mit 2,0 µl Restriktionsenzym und 2,0 µl CutSmart Buffer [10x] (NewEnglandBiolabs) vermischt und mit H<sub>2</sub>O Mili-Q auf 20 µl aufgefüllt. Der Restriktionsverdau erfolgte gemäß des Temperaturoptimums der Endonuklease bei 37°C über Nacht.

#### Ansatz Restriktionsverdau (20,0 µl):

6,0 µl Plasmid

2,0 µl CutSmart Buffer [10x]

2,0 µl NheI HF [20U/µl]

10,0 µl H<sub>2</sub>O Mili-Q

Die Reaktion wurde durch fünfminütiges Erhitzen der Probe auf 80°C gestoppt und in einem Verhältnis von 1:10 mit H<sub>2</sub>O Mili-Q verdünnt.

Zur Überprüfung des Restriktionsverdaus wurden 5,0 µl der Proben und 3,0 µl des verdauten Plasmids, sowie ein 1kb Plus Marker als Größenstandard auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in 1 %-igem TBE Puffer für 30 Minuten bei 80 Volt. Die Auswertung des Gels wurde mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht Bestrahlung durchgeführt.

#### *AUFTRENNUNG UND BLOTTING DER GENOMISCHEN DNA*

Das Gel für den Southern Blot wurde aus 0,8%-iger Agarose gegossen. Als Größenstandard dienten ein DNA MolecularWeight Marker VII – Dig labeled (Roche) und ein 1 kb Plus Marker (Invitrogen). Diese wurden mit 5,0 µl Loading Dye [6x] und 20,0 µl H<sub>2</sub>O Mili-Q vermischt. Von der Positivkontrolle wurden 2,0 µl Plasmid mit 5,0 µl Loading Dye [6x] und 20 µl H<sub>2</sub>O Mili-Q vermischt. Von den Proben wurde der gesamte Restriktionsverdau mit 8,0 µl Purple Loading Dye [6x] versetzt und gemeinsam mit den Markern und der Positivkontrolle auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde noch im trockenen Zustand beladen und die Proben im 1%-igem TBE-Puffer zuerst bei 100 Volt für zehn Minuten und anschließend bei 120 Volt für 2 Stunden aufgetrennt. Der Auftrennungsprozess wurde mittels Ethidiumbromid und UV-Licht Bestrahlung überprüft.

Im Zuge der Vorbehandlung des Gels wurde es anschließend im Wasserbad gewaschen und für 15 Minuten in einem Depurinationspuffer bestehend aus 0,25 M Salzsäure unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur depuriniert. Im darauffolgenden Denaturierungsschritt zur Trennung der DNA-Stränge wurde das Gel für zwei mal 15 Minuten mit Denaturierungspuffer aus 0,5 M Natriumhydroxid und 1,5 M Natriumchlorid versetzt und bei Raumtemperatur langsam und konstant geschüttelt. Die Neutralisierung in 0,5M Tris-Salzsäure pH=7,5 und 1,5M Natriumchlorid erfolgte ebenfalls zweimal zu je 15 Minuten unter leichtem Schwenken. Das Gel wurde 10 Minuten in 20x SSC Puffer equilibriert. Sämtliche Pufferanfertigungen und Arbeitslösungen des Southern Blots sind Tab. 11 zu entnehmen.

Anschließend wurde die aufgetrennte DNA aus dem Agarosegel auf eine neutrale Nylonmembran unter Ausnutzung der Kapillarkräfte übertragen. Dazu wurde ein Blot nach folgendem Schema aufgebaut: Es wurde eine Plastikschaale mit ausreichend 20x SSC Puffer befüllt und darüber eine Glasplatte gelegt. Es wurde eine Brücke aus Whatman-Filterpapier (GE Healthcare) mit den Maßen 30 cm x 15 cm in 2x SSC Puffer vorbehandelt und auf die Glasplatte transferiert. Die Enden der Brücke ragten dabei in den Puffer, um den Blot konstant mit Feuchtigkeit zu versorgen. Darauf wurden ein weiteres Stück Filterpapier mit den Maßen 15 x 15cm und schließlich das Gel gelegt.



Als Membran wurde die Nylonmembran Amersham Hybond-NX des Herstellers GE Healthcare gewählt. Die Membran wurde in 2x SSC Puffer vorbehandelt und auf das Gel aufgebracht. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Gel bilden, da diese eine erfolgreiche Übertragung der DNA behindern. Auf die Membran wurden drei weitere Stücke des Filterpapiers, sowie ein Stapel Handtuchpapier gelegt. Damit die durch das Handtuchpapier angezogene Flüssigkeit nicht seitlich an der Membran vorbeiläuft, wurde der Rand des Gels auf der linken und rechten Seite mit Röntgenfilm abgedichtet. Der Blot wurde mit ausreichend Gewichten beschwert und die gDNA über Nacht auf die Membran transferiert. Der Abbau des Blots erfolgte am nächsten Morgen.

Nach dem Blotten wurde die Membran mit 2x SSC Puffer gespült und auf Filterpapier gelegt. Dabei lag die unbeschichtete Seite der Membran direkt auf dem Papier auf. Um die DNA durch kovalente Bindung auf der Membran zu fixieren, wurde sie in einem Crosslinker mit 120mJ bestrahlt. Anschließend erfolgte die Prähybridisierung der Membran für 30 Minuten. Die Prä-, sowie die anschließende Hybridisierung wurden mittels Hybridisierungspuffer DIG Easy Hyb™ (Sigma-Aldrich) bei 51°C durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde die spezifische Sonde erst für fünf Minuten auf 100°C erhitzt und anschließend für fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Die Sonde wurde in 30 ml auf 51°C erhitzten Hybridisierungspuffer aufgenommen und auf die vorbehandelte Membran aufgebracht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 51°C in einem rotierenden Hybridisierungssofen (Bachofer).

Am folgenden Tag wurde die Sonde abgekippt, in ein Falcon™ Röhrchen mit Schraubdeckel aufgenommen und bei -20°C gelagert. Um überschüssige Sonde zu entfernen wurde die Membran zuerst mit einem Low Stringency Buffer für fünf Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken gewaschen. Der Schritt wurde wiederholt und die Membran anschließend zweimal mit High Stringency Buffer bei 68°C für 15 Minuten in dem Ofen inkubiert. Abschließend wurde die Membran noch für zwei Minuten mit 50 ml Waschpuffer bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken gewaschen. Zur Maskierung unhybridisierter DNA-Stellen wurde die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 25 ml Blocking Solution versetzt. Die Blocking Solution wurde abgekippt und die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Antikörper Lösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Bei der Antikörper Lösung handelte es sich um eine 1:10 000 Verdünnung des Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments isoliert aus Schaf (Roche Diagnostics) in 25 ml Blocking Solution. Anschließend wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer WP für je 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Der letzte Waschschrift umfasste ein drei minütiges Waschen mit Lösung B3, einer 100 mM Tris-Salzsäure pH=9,5 und 100 mM Natriumchlorid bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschließend auf eine klare

Folie gelegt. Für die Detektion hybridisierten Nukleinsäuren wurden 500 µl einer 1:100 Verdünnung des chemilumineszenten Substrats CSPD (Roche Diagnostics) in Lösung B3 hergestellt. Die beschichtete Seite der Membran wurde gleichmäßig mit dem Detektionsmittel benetzt und die Membran für fünf Minuten unter Abdunkelung in einer Filmkassette inkubiert. Die Membran wurde in eine neue Folie übertragen, luftdicht verschlossen und zur Steigerung des Lumineszenz-Signals für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte in einem LAS-3000 Instrument. In einem zeitlichen Intervall von 20 Minuten wurde die das chemilumineszente Signal photographisch protokolliert.

## INFEKTIONSVERSUCH DER WEIZENÄHREN MIT *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Für den Infektionsversuch der Ähren wurde das biotrophe Pathogen *Fusarium graminearum* (8.1) gewählt. Im Zuge des Versuchs wurde untersucht, ob die Überexpression der Callose-Synthase AtGSL05 eine direkte Auswirkung auf die Toleranz der Pflanzen gegenüber einer Infektion mit dem pilzlichen Schaderreger zeigt. Der Pilz wurde wie unter Kapitel „*Fusarium graminearum*“ beschrieben angezogen und die Konidien geerntet. Es wurde mit den transgenen Weizenlinien E01-A, E01-B, E04-B, E04-C und E07-A, sowie mit dem Wildtyp gearbeitet.

Die Ährenbildung erfolgte bei allen Weizenlinien nach ungefähr fünf bis sechs Wochen. Für eine erfolgreiche Infektion des Pilzes ist der Entwicklungsphase der Blüten von entscheidender Bedeutung, wobei die Blüten am anfälligsten zum Zeitpunkt der Anthese sind (McMullen et al., 2012). Um den Entwicklungszustand der Blüten zu bestimmen wurden Deckspelze (Lemma) und Vorspelze (Palea) vorsichtig auseinandergezogen, um eine Sicht auf die Staubblätter (Antheren) zu gewähren. Eine Blüte im optimalen Entwicklungszustand für eine Infektion mit *F. graminearum* ist in Abb. 5C dargestellt. Die Blüte verfügt über deutlich gelbe Antheren, die zwischen Vor- und Deckspelze eingebettet sind und noch nicht aus der Blüte heraus ragen. Für die Inokulation musste ebenfalls der Tageszeitpunkt berücksichtigt werden, sodass die Inokulationen stets gegen drei Uhr Nachmittags durchgeführt wurden. Abb. 1 b zeigt eine frisch inokulierte Weizenähre. Es wurden zwei sich gegenüberliegende Florets im entsprechenden Entwicklungsstadium ausgewählt, mit einem schwarzen Punkt markiert und die Konidien suspension eingebracht.

Es wurden Infektionsversuche mit Konidienkonzentrationen von 20 Konidien/µl und 10 Konidien/µl durchgeführt; die Inokulierung erfolgte stets mit 10 µl pro Floret, wobei das Volumen gleichmäßig auf beide Blüten des Florets aufgeteilt wurde. Da Konidien rasch sedimentieren wurde die Suspension vor jeder Entnahme mit der Pipette gut durchmischt, um Konzentrationsabweichungen vorzubeugen. Die Pipettenspitze wurde vorsichtig zwischen Vor- und Deckspelze geschoben und der Suspensionstropfen zwischen den Antheren am Blütenboden

platziert. Anschließend wurden die inokulierten Ähren mit befeuchteten Plastiktüten bedeckt, um ein geeignetes Mikroklima für die Konidienkeimung, sowie die Primärinfektion von *F. graminearum* zu schaffen. Die Pflanzen wurden in einem RUMED-Klimaschrank bei 22°C und 60% Luftfeuchte unter Langtagbedingungen bei 16 Stunden Licht kultiviert. Die Plastiktüten wurden am dritten Tag nach erfolgter Inokulation entfernt, um der Bildung von Myzel außerhalb der Blüte vorzubeugen.

Die Auswertung erfolgte makroskopisch durch die Bestimmung der Gesamtanzahl und der Anzahl infizierter Ährchen pro Ähre. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels „Daniel’s XL Toolbox, Version 6.60“, einer Erweiterung des Microsoft Excel-Arbeitsblatts. Es wurde ein einfaktorieller ANOVA Bericht und in weiterer Folge ein Vergleich der Unterschiede nach der Methode „Bonferroni-Holm“ vorgenommen.

#### INFEKTIONSVERSUCH DER GERSTEÄHREN MIT *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Der Infektionsversuch in Gerste mit *F. graminearum* wurde grundsätzlich unter denselben Bedingungen wie in Weizen durchgeführt. Es wurden die transgenen Linien 3E-1, 5A-1, 7B-1, 7C-1 und der Wildtyp als Kontrolle verwendet. Die Ähren wurden zum Zeitpunkt des Verlassens der Blattscheide inokuliert (McMullen et al., 2012). Es wurde eine Konidienkonzentration von 20 Konidien/ $\mu$ l gewählt. Es wurden je zwei sich gegenüberliegende Florets pro Ähre markiert und 10  $\mu$ l der Suspension mittels Pipette inokuliert. Die Ähren wurden mit befeuchteten Plastiktüten für drei Tage bedeckt. Der Infektionsversuch fand unter Langtagbedingungen bei 16 Stunden Licht, 60 % Luftfeuchte und einer Temperatur von 22°C in einem RUMED-Klimaschrank statt. Die Auswertung der Infektionsstärke der Ähren wurde 14 Tage nach erfolgter Inokulation vorgenommen.

#### FLUORESZENZMIKROSKOPIE UND KONFOKALE LASER SCANNING MIKROSKOPIE

Das 1,3- $\beta$ -Glukan Callose interagiert mit dem Farbstoff Anilin-Blau und lässt sich somit mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie im Gewebe nachweisen. Von Interesse waren besonders jene Zellen im Leitbündelgewebe rund um den Rachis-Knoten.

Für die mikroskopische Analyse wurden Weizenähren der Linien E01-A, E01-B, E04-B, E04-C und des Wildtyps sieben Tage nach erfolgter Inokulation mit *F. graminearum* geerntet. Die Ähren wurden in Plastikröhrchen transferiert und mit 97%-igem Ethanol entfärbt und gelagert. Zur Detektion der Calloseablagerungen wurde eine 1:10 Verdünnung aus Anilin-Blau [10x] in Dikaliumhydrogenphosphat (150 mM, pH=9) hergestellt. Die Ähren wurden mit einer scharfen Rasierklinge bearbeitet und etliche sehr feine Schnitte des Rachisknoten angefertigt. Die Schnitte

wurden auf einen Objektträger aufgebracht, mit der Färbelösung versetzt und mit einem Deckglas fixiert. Die Aufnahme der Photos erfolgte mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie.

## PRIMER, ENZYME, CHEMIKALIEN UND ARBEITSLÖSUNGEN

In Tab. 5 bis 12 sind die verwendeten Primer, Enzyme, Chemikalien, Arbeitslösungen, sowie Geräte aufgelistet dargestellt.

Die verwendeten Primer wurden mittels Clone Manager Professional 9 erstellt und von Eurofins Genomics bereit gestellt. Die Primer und deren Bindestellen sind in Tab. 5 aufgelistet; die zugehörigen exakten Basenabfolgen der Primer sind in 5'-3' Orientierung angegeben.

**Tab. 5: Primernamen, Primersequenz in 5' → 3' Orientierung und Bindestelle**

Primernamen	Sequenz (5' → 3')	Bindestelle
<i>AB03-AtGSL5-fwd-exp</i>	ATCCAATACGCCCCGTGAC	AtGSL05
<i>AB04_AtGSL5_rev</i>	CGTGAAGCTCGAGCAAAGC	AtGSL05
<i>AG_intra_GSL5_for</i>	ATGAAGACTTCTACCGGCAG	AtGSL05
<i>BS102_sGFP-exp-r</i>	CTGAACTTGTGGCCGTTTAC	AtGSL05-GFP
<i>BS103_GSL5-exp-f</i>	CTCAAAGGAAGTGGCTGAAG	AtGSL05
<i>BS116-Ta-Act-fw</i>	ATCATCCTGTGTTGCTGACTG	Aktin
<i>BS117-Ta-Act-rev</i>	GATTGCGACATACATTGCTGG	Aktin
<i>AG-Ta_Actin_for</i>	ATCATCCTGTGTTGCTGACTG	Aktin
<i>AG-Ta_Actin_rev</i>	TAGATTATCCGTGAGGTCCC	Aktin
<i>AG-Hv_Actin_for</i>	CAGCGAGATCCAAACGAAGA	Aktin
<i>AG-Hv_Actin_rev</i>	TCTACAATGAGCTCCGTGTG	Aktin

**Tab. 6: Restriktionsenzyme, Konzentration, Erkennungssequenz mit Schnittstelle (↓) und Hersteller**

Enzym	Konzentration	Erkennungssequenz	Hersteller
<b><i>Bam</i>HI</b>	[10U/μl]	5'-G↓GATCC-3'	Thermo Fisher Scientific
<b><i>Nhe</i>I <i>HF</i></b>	[20U/μl]	5'-G↓CTAGC-3'	New England Biolabs

Tab. 7: Fertige Pufferlösungen, Zusammensetzung und Hersteller

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
<i>1x Buffer G</i>	10 mM Tris-HCL 10 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM NaCl 0,1 mg/ml BSA	Fermentas
<i>1x CutSmart Buffer</i>	50 mM Kalium-Acetat 20 mM Tris-Acetat 10 mM Magnesium-Acetat 100 µg/ml BSA	New England Biolabs
<i>10x DNase I Buffer</i>	100 mM Tris-HCl (pH=7,5) 25mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM CaCl <sub>2</sub>	Thermo Scientific
<i>5x Green Go Taq<sup>R</sup> Reaction Buffer</i>	k.A.	Promega Corporation
<i>5x Reaction Mix</i>	k.A.	Thermo Scientific

Tab. 8: Verwendete Enzyme und Hersteller

Enzym	Hersteller
<i>RNase I</i>	Thermo Scientific
<i>DNase I</i>	Thermo Scientific
<i>RNase Inhibitor Ribolock</i>	Thermo Scientific
<i>Thermo Scientific Maxima Reverse Transkriptase</i>	Thermo Scientific
<i>Maxima Enzym Mix</i>	Thermo Scientific
<i>Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase</i>	Thermo Scientific
<i>Go Taq G2 DNA Polymerase</i>	Promega

Tab. 9: Liste der Chemikalien und deren Hersteller

Chemikalie	Hersteller
<i>Agarose</i>	Biozym
<i>Anilin-Blau</i>	Serva
<i>Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments</i>	Roche Diagnostics GmbH
<i>Amersham Hybond-NX Nylonmembran</i>	GE Healthcare
<i>CSPD</i>	Roche Diagnostics GmbH
<i>6-Benzylaminopurin (BAP)</i>	Sigma-Aldrich
<i>Blocking Reagenz</i>	Roche Diagnostics GmbH
<i>Chloroform</i>	Sigma-Aldrich
<i>DEPC</i>	Sigma-Aldrich
<i>DIG Easy Hyb™ Buffer</i>	Sigma-Aldrich
<i>Dig-Labeled Molecular Weight Marker VII</i>	Roche Diagnostics GmbH
<i>Dikaliumhydrogenphosphat</i>	Carl Roth GmbH

<i>dNTPs</i>	Thermo Scientific
<i>EDTA</i>	Sigma-Aldrich
<i>Ethanol</i>	Chem. Solute
<i>Ethidiumbromid</i>	Roth
<i>GeneRuler 1kb Ladder-Plus</i>	Thermo Scientific
<i>Glykogen</i>	Thermo Scientific
<i>HCl [37%]</i>	Fischer Chemical
<i>Hygromycin-B</i>	Carl Roth GmbH
<i>Isopropanol</i>	Carl Roth GmbH
<i>Kaliumchlorid</i>	Merck
<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>	Merck
<i>Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix [2x]</i>	Fermentas
<i>Murashige and Skoog Basal Salt Mixture</i>	Sigma-Aldrich
<i>Natriumchlorid</i>	Roth
<i>Natriumhydroxid</i>	Roth
<i>Natrium-Acetat</i>	Thermo Scientific
<i>Natriumdodecylsulfat</i>	Sigma-Aldrich
<i>Natriumhypochlorid</i>	Chem. Solute
<i>N-Lauroyl-Sarcosin</i>	Merck
<i>Oligo dT-Primer</i>	Thermo Scientific
<i>peqGOLD TriFast</i>	PeqLab
<i>Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol [25:24:1]</i>	Carl Roth GmbH
<i>Plant Agar</i>	Duchefa
<i>Random Hexamer Primer</i>	Thermo Scientific
<i>Saccharose</i>	Roth
<i>TRIS (Hydroxymethylaminomethan)</i>	Carl Roth GmbH
<i>Tween-20</i>	Roth



Tab. 10: Benötigte Geräte, Instrumente und Hersteller

Gerät	Typus	Hersteller
<i>Analysenwaage</i>	Analysenwaage	Sartorius AG
<i>Gelkammern</i>	Mupid One System	Takara Bio Inc.
<i>Heizblock</i>	ThermoCell Mixing Block	Bioer Technology
<i>Schwingmühle</i>	Schwindmühle MM2000	Retsch GmbH
<i>Thermocycler</i>	TProfessional Thermocycler	Biometra
<i>Vortex</i>	Vortex Mixer 7-2020	neoLab
<i>Konfokales Laser Scanning Mikroskop</i>	CLSM 780 an Axio Imager Z2	Carl Zeiss Microscopy GmbH
<i>Klimaschrank</i>	RUMED	Rubarth Apparate GmbH
<i>Spektrophotometer</i>	NanoVue Plus Spectrophotometer	GE Healthcare
<i>Zentrifuge</i>	Sigma 2K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH
<i>Light Cyclers qPCR</i>	Light Cyclers 480	Roche Diagnostics GmbH
<i>Zentrifuge</i>	Eppendorf 5430	Eppendorf AG
<i>Hybridisierungsöfen</i>	Bachofer 400 HY-E(110)	Bachofer Laborgeräte
<i>LAS</i>	LAS-3000	Fujifilm Holdings
<i>Geldokumentation</i>	GENE Genius	Syngene Europe
<i>Kühlzentrifuge</i>	Zentrifuge 5403	Eppendorf AG

Tab. 11: Zusammensetzung der Arbeitslösungen und Puffer

Arbeitslösung/Puffer	Zusammensetzung
<i>Waite Buffer (1000 ml)</i>	20 ml/L 0,5 M EDTA, pH=8,0 100 ml/L 1,0 M Tris-HCl, pH=8,0 100 ml/L 1,0M NaCl 100 ml/L 10% N-Lauroyl-Sarcosin-Natriumsalz → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q
<i>TE Buffer (1000 ml)</i>	2 ml/L 0,5 M EDTA 10 ml/L 1,0 M Tris-HCl, pH=8,0 → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q → Sterilisation durch Autoklavieren
<i>10x TBE Buffer (1000 ml)</i>	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA, pH=9,0 → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q
<i>Depurinations-Puffer (1000 ml)</i>	20,8 ml/L 37 % HCl → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q
<i>Denaturierungs-Puffer (1000 ml)</i>	100 ml 5 M NaOH 300 ml 5 M NaCl → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q

---

<i>Neutralisierungs-Puffer (1000 ml)</i>	60,57 g 0,5M Tris-HCl, pH=7,5 300 ml 5 M NaCl → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q
<i>20x SSC (1000 ml)</i>	175,2 g NaCl 88,2 g Natriumcitrat → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q
<i>5x B1 (1000 ml)</i>	58,05 g Maleinsäure 43,83 g NaCl 35,00 g NaOH → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q  → einstellen des pH-Werts auf 7,5 mit 10 M NaOH
<i>W1 = Low Stringency Buffer (1000 ml)</i>	100 ml 20x SSC 10 ml 10 % SDS → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q
<i>W2 (1000 ml)</i>	10 ml 20x SSC 10 ml 10 % SDS → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q
<i>B2 (50 ml)</i>	5 ml Blocking Reagenz (Roche) 45 ml 1x B1

---

---

<i>WP (1000 ml)</i>	3 ml Tween-20 (Roth) 200 ml 5x B1 → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q
<i>B3 (250 ml)</i>	100 mM Tris-HCl, pH=9,5 100 mM NaCl
<i>High Stringency Buffer (1000 ml)</i>	5 ml 20x SSC 10 ml 10 % SDS → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q
<i>Antikörper - Arbeitslösung (25 ml)</i> <i>(1:10 000 Verdünnung)</i>	2,5 µl Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments (Roche) 25 ml B2 (s.o.)
<i>CSPD – Arbeitslösung (0,5 ml)</i> <i>(1:100 Verdünnung)</i>	5 µl CSPD (Roche) 495 µl B3 (s.o.)
<i>Anilin-Blau Färbelösung (1 ml)</i>	100 µl 10x Anilin-Blau 900 µl 150 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH=9,0
<i>Ethidiumbromid-Lösung</i> <i>Geldokumentation (1000 ml)</i>	600 µl Ethidiumbromid → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q

---

Tab. 12: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Medium	Zusammensetzung
<i>Complete Medium CM (1000 ml)</i> <i>(nach Parker et. al. 2008)</i>	50 ml/L 20x Nitratsalze 1 ml/L Spurenelemente 10 g/L D-Glucose 2 g/L Pepton 1 g/L Hefeextrakt 1 g/L Casaminosäure 1 ml/L Vitaminlösung → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q  <u>20 x Nitratsalze enthalten auf 1L:</u>  120 g/L Natriumnitrat 10,4 g/L Kaliumchlorid 10,4 g/L Magnesiumsulfat-Heptahydrat 30,4 g/L Kaliumdihydrogensulfat → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q  <u>1000x Spurenelemente enthalten auf 1L:</u>  22 g/L Zinksulfat-Heptahydrat 11 g/L Borsäure 5 g/L Magnesiumdichlorid-Tetrahydrat 1,7 g/L Eisensulfat-Heptahydrat 1,6 g/L Kupersulfat-Pentahydrat 1,5 g/L Natriummolybdat-Dihydrat 50 g/L Na <sub>2</sub> -EDTA → ad 1000 ml H <sub>2</sub> O Mili-Q

Vitaminlösung enthält auf 1L:

0,1 g/L Biotin  
0,1 g/L Pyridoxin  
0,1 g/L Riboflavin  
0,1 g/L p-Aminobenzolsäure  
0,1 g/L Nicotinsäure  
0,1 g/L Thiamin

→ ad 1000 ml H<sub>2</sub>O Mili-Q

→ einstellen des pH-Werts auf 6,5 mit KOH

***MS – Medium mit Hygromycin (1000 ml)***

8,0 g/L Plant-Agar  
4,3 g/L Murashige and Skoog Basal Salt Mixture

→ ad 1000 ml H<sub>2</sub>O Mili-Q

→ Sterilisation durch Autoklavierung

+ 0,5 mg/L 6-Benzylaminopurin-Lösung  
+ 50 mg/L Hygromycin-B

***Synthetic Nutrient Poor Agar SNA (1000 ml)***

***(nach Nirenberg 1981)***

1,0 g/L Kaliumdihydrogenphosphat  
1,0 g/L Kaliumnitrat  
0,5 g/L Magnesiumsulfat-Heptahydrat  
0,5 g/L Kaliumchlorid

0,2 g/L Saccharose

0,5 g/LD-Glucose

16 g/L Agar

→ ad 1000 ml H<sub>2</sub>O Mili-Q

***MS - Medium (1000 ml)***

8,0 g/L Plant-Agar  
4,3 g/L Murashige and Skoog Basal Salt Mixture

→ ad 1000 ml H<sub>2</sub>O Mili-Q

# ERGEBNISSE

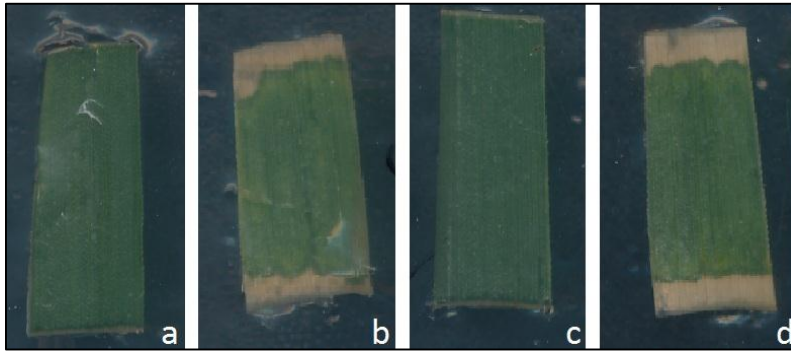
## NACHWEIS DER HYGROMYCIN-RESISTENZ IN ATGSL05-ÜBEREXPRESSIONSLINIEN

Der Hygromycin Blatt Assay diente zur Vorselektion erfolgreich transformierter Pflanzen. Das Gen für die Überexpression der Callosesynthase AtGSL05 ist im Plasmid an eine Hygromycin-Phosphotransferase (hpt-Gen) geknüpft, deren Expression für eine Detoxifizierung des Antibiotikums sorgt (<http://www.bios.net/daisy/Antibiotic/g4/1136.html>). Demnach schädigt das Antibiotikum nur die Blätter jener Pflanzen, die kein AtGSL05-Konstrukt enthalten.

Der Assay wurde mit Weizen- und Gerstepflanzen durchgeführt, wobei Blattstücke junger Pflanzen auf Antibiotikum-versetzten Agarplatten ausgelegt wurden. Die makroskopische Auswertung erfolgte nach 10 Tagen.

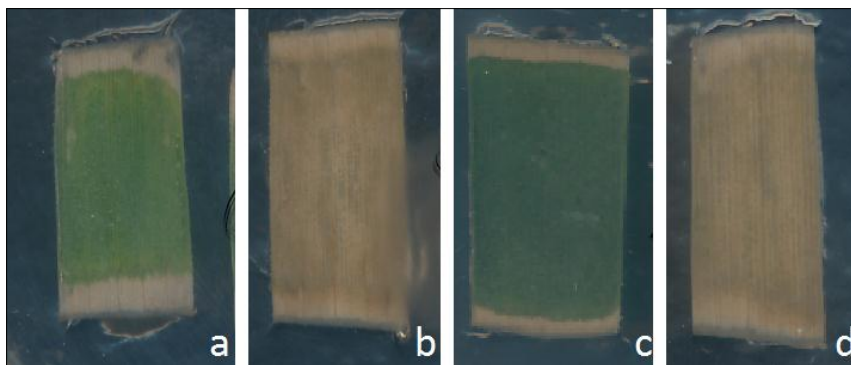
### *HYGROMYCIN-RESISTENZ IN TRANSGENEN WEIZENLINIEN*

Bei der Betrachtung der Blattstücke zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Hygromycin-resistenten und sensitiven Pflanzen. Das zellschädigende Antibiotikum dringt in das Gewebe ein, wodurch sich bei Pflanzen ohne Konstrukt ein Vergilben der Blätter, beginnend bei den Schnittstellen, abzeichnet. Im Gegensatz dazu bleiben die Blätter resistenter Pflanzen gleichmäßig grün. In Abb. 7 (a) und (b) sind Blattstücke der Linien E01-A; in (c) und (d) der Linie E01-B dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Pflanzen (a) und (c) eine Resistenz, die Pflanzen (b) und (d) eine Sensitivität gegenüber des Antibiotikums aufweisen. Sowohl bei Pflanze (a) als auch (b) handelt es sich um Pflanzen der Linie E01-A, die aus derselben Saatgut-Charge gezogen wurden. Der Assay lieferte somit erste Hinweise, dass es sich bei den Linien E01-A, E01-B, E04-B und E04-C um keine homozygoten Linien handelt. Beobachtungen sämtlicher Hygromycin-Assays zeigten, dass rund ein Drittel vermeintlich transgener Pflanzen kein AtGSL05-Konstrukt enthielten.



**Abb. 7: Blattassays zur Selektion transformierter Pflanzen via Hygromycin-Exposition bei Weizen.** (a) Gesundes, auf Hygromycin resistentes Blattstück der Linie E01-A; (b) Hygromycin-sensitives Blattstück der Linie E01-A mit Vergilbungserscheinungen am Blattrand; (c) Hygromycin-resistentes Blattstück der Linie E01-B; (d) Hygromycin-sensitives Blattstück der Linie E01-B mit deutlichen Vergilbungen am Blattrand.

Bei der Linie E07-A (siehe Abb.8) (a) und (b)) konnte während aller Versuchsreihen keine Pflanze als Hygromycin-resistent beschrieben werden, wodurch diese Linie als zusätzliche Negativkontrolle angesehen wurde. Als klassische Negativkontrolle diente der Wildtyp. Wie in Abb. 8 ersichtlich erweisen sich alle vier getesteten Pflanzen (a), (b), (c) und (d) als Hygromycin-sensitiv mit Unterschieden im Schädigungsgrad. Durch die Diffusion des Antibiotikums in das Blattgewebe kommt es an den Schnittstellen zu ersten Vergilbungserscheinungen, die sich im Laufe der Zeit auf das gesamte Blattstück ausweiten.

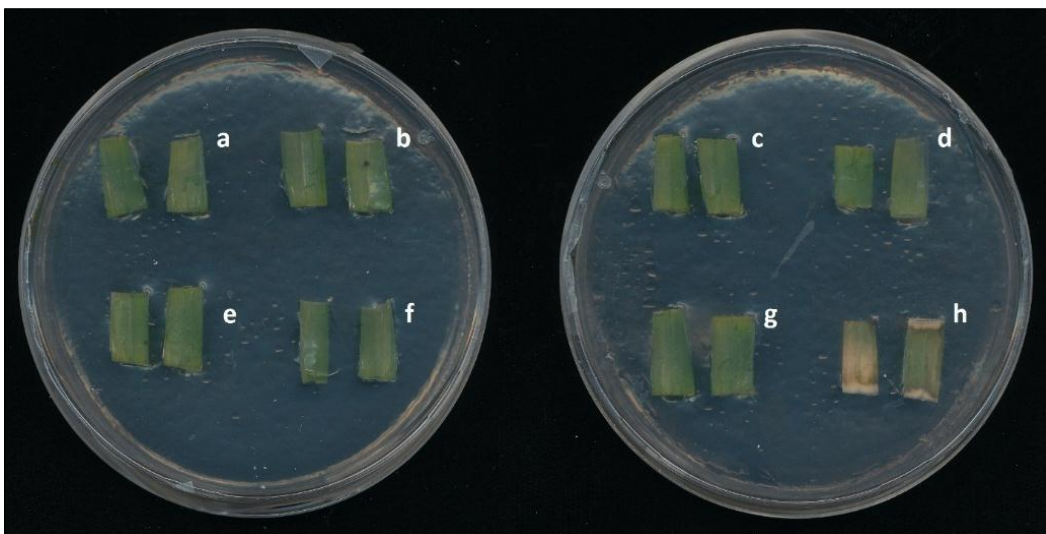


**Abb. 8: Hygromycin-sensitive Weizenpflanzen mit unterschiedlich starker Vergilbung.** (a) und (b) zeigen die vermeintlich transgene Linie E07-A. (c) und (d) zeigen Hygromycin-bedingtes Blattsterben des Wildtyps.



## HYGROMYCIN-RESISTENZ IN TRANSGENEN GERSTELINIEN

Bei Gerste wurde der Blatt-Assay mit den Linien 3E-1, 5A-1, 7B-1, 7C-1 und dem Wildtyp als Negativkontrolle durchgeführt. Sensitive Blattstücke zeichneten sich vor allem an den Blatträndern durch ein rasches Absterben des Gewebes aus. Bei der Linie 5A-1 konnten bei sämtlichen getesteten Pflanzen keine Vergilbungserscheinungen beobachtet werden, wodurch diese Linie als homozygot angesehen wurde. In Abb. 9 ist ein Blatt Assay der Linie 7B-1 dargestellt. Pro Pflanze (a) bis (h) wurden zwei Blattstücke getestet. Pflanze (h) zeigt eine Hygromycin Sensitivität, die Pflanzen (a) bis (g) erwiesen sich als resistent.



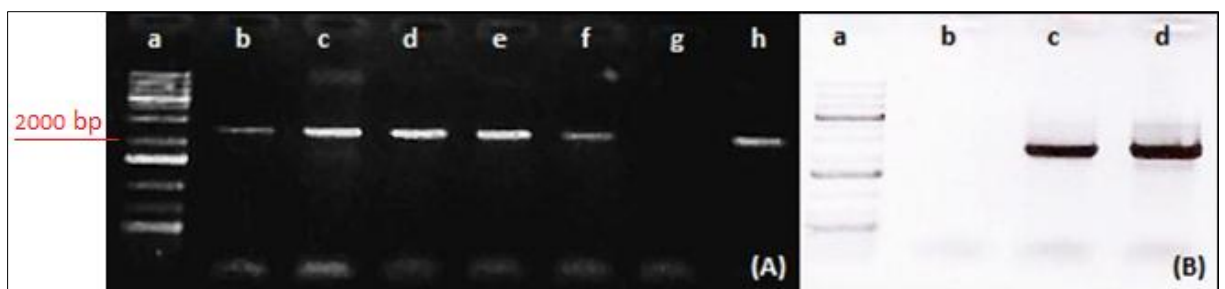
**Abb. 9: Hygromycin-Blattassay der Linie 7B-1 in Gerste.** (a) bis (g) zeigen erfolgreich transformierte Pflanzen mit Hygromycin-Resistenzgen. (h) Blattstücke ohne exprimierter Hygromycin-Phosphotransferase mit Vergilbungserscheinungen am Blattrand.

## NACHWEIS DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN DER GENOMISCHEN DNA TRANSGENER LINIEN

Anschließend zur Vorselektion wurde das Blattmaterial aller Weizen- und Gerstepflanzen auf die Präsenz der Callosesynthase AtGSL05 in der genomischen DNA untersucht. Da für die Transformation von Gerste und Weizen dasselbe Vektor-Konstrukt gewählt wurde, konnte bei den beiden *Triticeen* unter denselben Bedingungen eine Amplifikation des Gens via PCR durchgeführt werden. Die Primerpaarung *AG\_intra\_GSL5\_for* und *AB04\_AtGSL5\_rev* bindet innerhalb einer für AtGSL05-spezifischen Sequenz im Genom. In weiterer Folge kommt es bei erfolgreich genetisch modifizierten Pflanzen zur Amplifikation eines Fragments von 2500 bp Länge.

Es wurden sowohl Hygromycin-resistente, als auch sensitive Pflanzen, sowie der Wildtyp als Kontrolle getestet. Bei sensitiven Pflanzen, sowie beim Wildtyp wurden keine Banden erwartet. Abb. 10 (A) zeigt ein typisches PCR Ergebnis einer transgenen Weizenlinie. In diesem Fall werden einzelne Pflanzen (b bis h) der Linie E01-B angeführt. Anhand des Größenstandards (a) können den Proben (b) bis (f), sowie der Probe (h) deutliche Banden der erwarteten Fragmentgröße von 2500 bp zugeordnet werden. Obwohl Probe (g) aus einer Pflanze der Linie E01-B stammte, kam es zu keiner Amplifizierung des Fragments. Bei den Proben (c) und (e) zeigt sich im oberen Bereich der Spuren eine schwach ausgeprägte Bande, wobei es sich um nicht-amplifizierte gDNA handelt. Im unteren Bereich der Spuren sammeln sich ungebundene Primer.

Abb. 10 (B) zeigt den Integrationsnachweis des Plasmids in der genomischen DNA der transgenen Gerstelinie 7B-1. Bei den Proben (c) und (d) konnte das spezifische Fragment amplifiziert werden; es zeigen sich deutliche Banden bei 2500 bp. Bei Pflanze (b) konnte keine Integration der Callosesynthase AtGSL05 nachgewiesen werden.



**Abb. 10: Qualitativer PCR-Nachweis der Callosesynthase AtGSL05 in pflanzlicher gDNA.** (A) Nachweis in unterschiedlichen Pflanzen der Linie E01-B von Weizen: (a) Marker; (b) bis (f) und (h) erfolgreicher Integrationsnachweis des Gens durch Bande bei 2,5 kb; (g) Pflanze ohne Plasmidkonstrukt. (B) Nachweis in unterschiedlichen Pflanzen der Linie 7B-1 in Gerste: (a) Marker; (b) Pflanze ohne Konstrukt; (c) und (d) erfolgreicher Intergrationsnachweis des Gens durch Bande bei 2,5 kb.

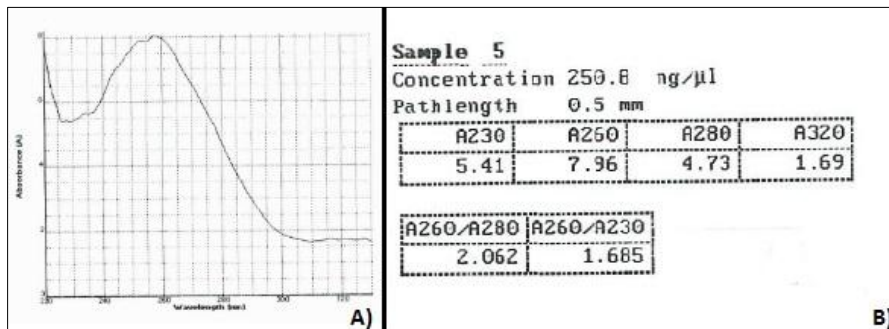
Während des Vergleichs der Ergebnisse der PCR-Analyse und des Hygromycin Blatt Assays konnten stets Übereinstimmungen beobachtet werden. Jene Pflanzen, die sich als sensitiv gegenüber des Antibiotikums Hygromycin-B erwiesen, zeigten ebenfalls ein negatives Ergebnis bei der Fragment-Amplifikation.

## EXPRESSIONSANALYSE DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN ÄHREN- UND BLATTGEWEBE IN WEIZEN- UND GERSTELINIEN

Da eine erfolgreiche Transformation nicht zwingend auch die Expression des gewünschten Gens zur Folge trägt, wurde Ähren- und Blattgewebe auf eine Expression der Callosesynthase AtGSL05 untersucht. Diese erfolgte sowohl qualitativ, als auch quantitativ. Die isolierte RNA wurde dazu mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und die Sequenz für AtGSL05 anschließend spezifisch amplifiziert.

### *ISOLIERUNG DER RNA UND QUALITÄTSBESTIMMUNG MITTELS SPEKTROPHOTOMETER*

Für die Expressionsanalyse zur Überprüfung der erfolgreichen Transkription der Callosesynthase AtGSL05 wurde RNA aus nachweislich erfolgreich transformierten Pflanzen isoliert. Die Isolierung erfolgte sowohl aus Ähren- als auch Blattgewebe, da sich je nach Gewebeart die Genexpression unterscheiden kann (Golkari et al., 2007). Die isolierte RNA wurde mittels Spektrophotometer vermessen und die Konzentration und Qualität der RNA bestimmt. Der Reinheitsgrad der RNA ist durch das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm und 280 nm definiert, wobei für RNA ein Wert von etwa 2,0 als „rein“ gilt. Verunreinigungen in der Probe bzw. eine Degradierung der Nucleinsäuren verändern das Absorptionsspektrum und werden anhand des Kurvenverlaufs visualisiert (<http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>). In Abb. 11 sind die Ergebnisse einer spektrophotometrischen RNA-Überprüfung dargestellt. Es handelt sich dabei um isolierte RNA einer Weizenpflanze der Linie E04-C. Die RNA Konzentration in der Probe liegt bei 250,8 ng/μl; das Verhältnis 260/280 nm bei 2,062. Die Abszisse beschreibt die Wellenlänge (nm); die Ordinate die Absorption (A). Es gibt ein deutliches Maximum bei einer Wellenlänge von 260 nm und der Verlauf der Kurve weist auf keine Verunreinigungen bzw. eine Degradierung der isolierten RNA hin.



**Abb. 11: Spektrophotometrische RNA-Analyse.** (A) optimale Absorptionskurve über einen Messbereich von 220 bis 320 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Abszisse=Wellenlänge (nm); Ordinate=Absorption (A). (B) RNA Konzentration der Probe [ng/μl] und Bestimmung des Reihungsgrades (A260/A280).

Diese Kriterien dienen der Auswahl geeigneter RNA-Isolate aus Gerste und Weizen für die weitere Expressionsanalyse der Callosesynthese. Um die Expressionsstärke in den unterschiedlichen Linien vergleichen zu können, wurden für sämtliche Proben eine Menge von 1000 ng RNA als Matrize für die folgende cDNA Synthese eingesetzt.

#### QUALITATIVE EXPRESSIONSANALYSE DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN WEIZENLINIEN

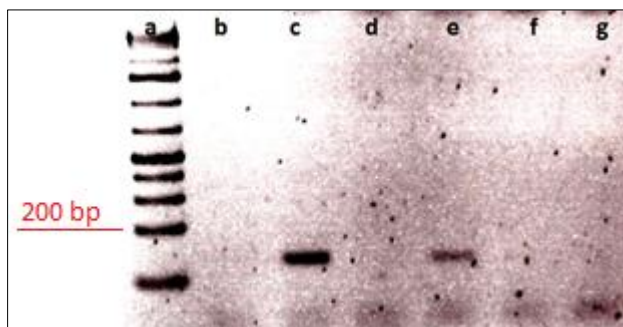
Zum qualitativen Expressionsnachweis der Callosesynthese AtGSL05 im Blatt- und Ährgewebe transgener Weizenlinien wurde eine reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA und anschließender PCR durchgeführt. Die Primer *AB03-AtGSL5-fwd-exp* und *AB04-AtGSL5\_rev* amplifizieren ein AtGSL05 spezifisches Fragment mit 114 bp Länge. Als Referenz wurde die Amplifizierung einer 180 bp langen Sequenz von Aktin mittels Primer *BS116-Ta-Act-fw* und *BS117-Ta-Act-rev* gewählt. Beide PCR-Ansätze enthielten dieselbe cDNA als Matrize. Wie in Abb. 12 ersichtlich, kommt es in sämtlichen transgenen Linien (a) bis (e) zu einer deutlichen und gleichmäßigen Amplifizierung des Referenzgens. Für AtGSL05 konnten bei der qualitativen RT-PCR keine Banden detektiert werden.



**Abb. 12: Qualitativer Nachweis der Expression Aktins via RT-PCR in Weizen.** Bei sämtlichen Pflanzen (a bis e) konnten Aktin-spezifische Fragmente von 180 bp Länge aus cDNA amplifiziert werden; (a) Linie E01-A; (b) E01-B; (c) E04-B; (d) E04-C; (e) Wildtyp; (f) Negativkontrolle; (g) Marker

## QUALITATIVE EXPRESSIONSANALYSE DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN GERSTELINIEN

Zur qualitativen Expressionsanalyse von AtGSL05 im Blattgewebe von Gerste wurde eine reverse Transkription der RNA in cDNA durchgeführt und anschließend das AtGSL05-spezifische Fragment mit der Primerpaarung *AB03-AtGSL5-fwd-exp* und *AB04-AtGSL5\_rev* nachgewiesen. Für das Referenzgen Aktin wurde die Primerpaarung *BS116-Ta-Act-fw* und *BS117-Ta-Act-rev* (180 bp) gewählt. Abb. 13 zeigt die PCR Ergebnisse für AtGSL05 auf 2%-igem Agarosegel. Bei den Linien 5A-1 und 7B-1 kam es zur Amplifizierung des erwarteten 114 bp langen Fragments für AtGSL05 und es konnte somit eine Expression nachgewiesen werden. Bei der Amplifizierung und Auftrennung der Aktinfragmente konnten mit der gewählten Primerpaarung keine deutlichen Banden detektiert werden, da diese von Primerwolken überschattet wurden. Für künftige Amplifikationen wurde die Primerpaarung *AG-Hv-Actin\_for* und *AG-Hv-Actin\_rev* gewählt, wodurch die Generierung eines Aktin-Fragments von 270 bp Länge möglich war.



**Abb. 13: Qualitativer RT-PCR Nachweis der Callosesynthase AtGSL05 in cDNA von Gerste.** (a) Marker; (b) Linie 3E-1; (c) 5A-1 AtGSL05 spezifische Bande bei 114 bp; (d) Linie 6A-1; (e) Linie 7B-1 mit AtGSL05 spezifischer Bande bei 114 bp; (f) Linie 7C-1; (g) Wildtyp.

## QUANTITATIVE EXPRESSIONSANALYSE DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN WEIZEN- UND GERSTELINIEN

### EXPRESSION DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN BLATT- UND ÄHRENGEWEBE TRANSGENER WEIZENLINIEN

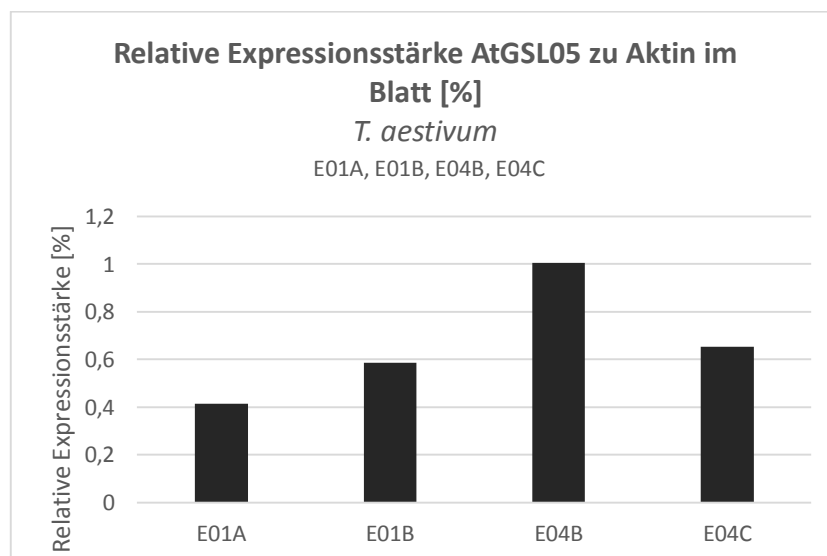
Für die quantitative Expressionsanalyse in Weizenlinien wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Es wurde die Expression der Callosesynthase und des Referenzgens Aktin im Blatt, sowie in der Ähre gemessen. Die Bestimmung der Expressionsstärke erfolgte anhand der CP-Werte. Bei der aus Blattgewebe extrahierten RNA wurden pro Probe drei Messungen für AtGSL05 und Aktin durchgeführt. Die CP-Werte für Aktin wurden für jede Probe gesondert bestimmt, da auch die

Expression des Referenzgens in den unterschiedlichen Pflanzen variiert. Anhand der protokollierten Messdaten wurde der Mittelwert für jede Probe berechnet. Für die Bestimmung der in Abb. 15 dargestellten Expressionsstärke wurden die CP-Werte der AtGSL05-Expression in Bezug zur Aktin-Expression in der jeweiligen Probe gesetzt und mittels der Formel in Abb. 14 berechnet. Bei einem Wert von 100% wären die Expression von Aktin und AtGSL05 gleichermaßen ausgeprägt.

$$\text{Relative Expressionstärke} = \left[ \frac{1}{(2^{CP_{AtGSL05} - CP_{Aktin}})} \right] * 100$$

**Abb. 14:** Formel zur Berechnung der Relativen Expressionsstärke in Prozent, ermittelt aus den CP-Werten für Aktin und AtGSL05.

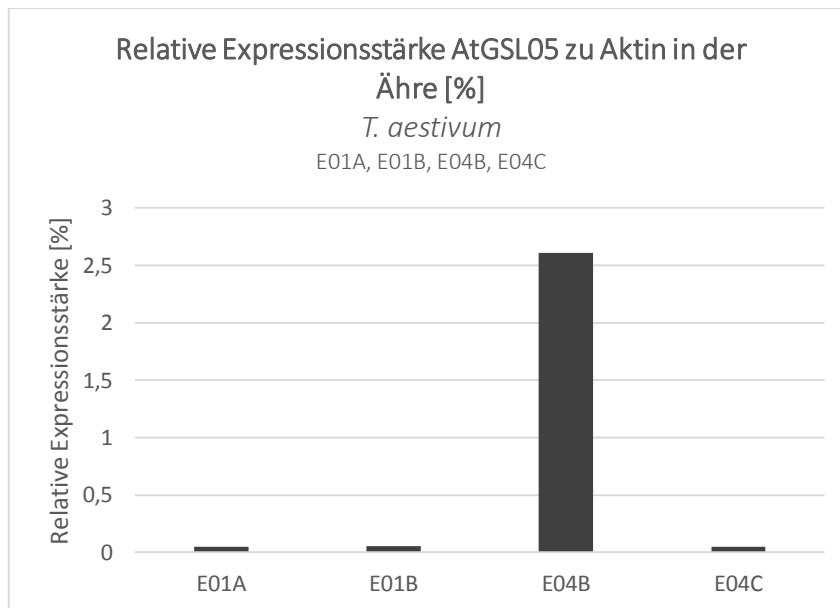
Die Analyse der isolierten RNA aus dem Blatt zeigte, dass bei den transgenen Linien E01-A, E01-B, E04-B, E04-C eine schwache Expression der Callosesynthase festgestellt werden konnte. Die stärkste Expression konnte bei Linie E04-B mit 1 % verzeichnet werden. Linie E01-B zeigte eine relative Expressionsstärke von 0,58 %, Linie E04-C von 0,65 % und Linie E01-A mit 0,41 %.



**Abb. 15:** Relative Expressionsstärke der Callosesynthase AtGSL05 im Blattgewebe von Weizen. Linie E01-A mit 0,41 %, Linie E01-B mit 0,58 %, Linie E04-B mit 1,0 % und Linie E04-C mit 0,65 %.

Bei der Expressionsanalyse der isolierten RNA aus Ährengewebe wurden ebenfalls die CP-Werte für AtGSL05 und Aktin bestimmt, wobei für AtGSL05 drei Messungen pro Probe und für Aktin zwei Messungen pro Probe durchgeführt wurden. Abb. 16 zeigt die relativen Expressionsstärken der Callosesynthase in der Ähre. In der Linie E04-B konnte mit Abstand die höchste Expression mit 2,6 % beobachtet werden. In den weiteren Linien liegt die Expression etwa bei 0,05 %. Aufgrund

der Schmelzkurvenverläufe konnte eine Expression der Callosesynthese bei den Linien E07-A und dem Wildtyp ausgeschlossen werden.



**Abb. 16:** Relative Expressionsstärke der Callosesynthese AtGSL05 im Ährengewebe von Weizen. Linie E01-A mit 0,05% , Linie E01-B mit 0,054 % , Linie E04-B mit 2,6 % und Linie E04-C mit 0,047 %.

#### VERIFIZIERUNG DER PCR PRODUKTE ANHAND DER SCHMELZKURVEN

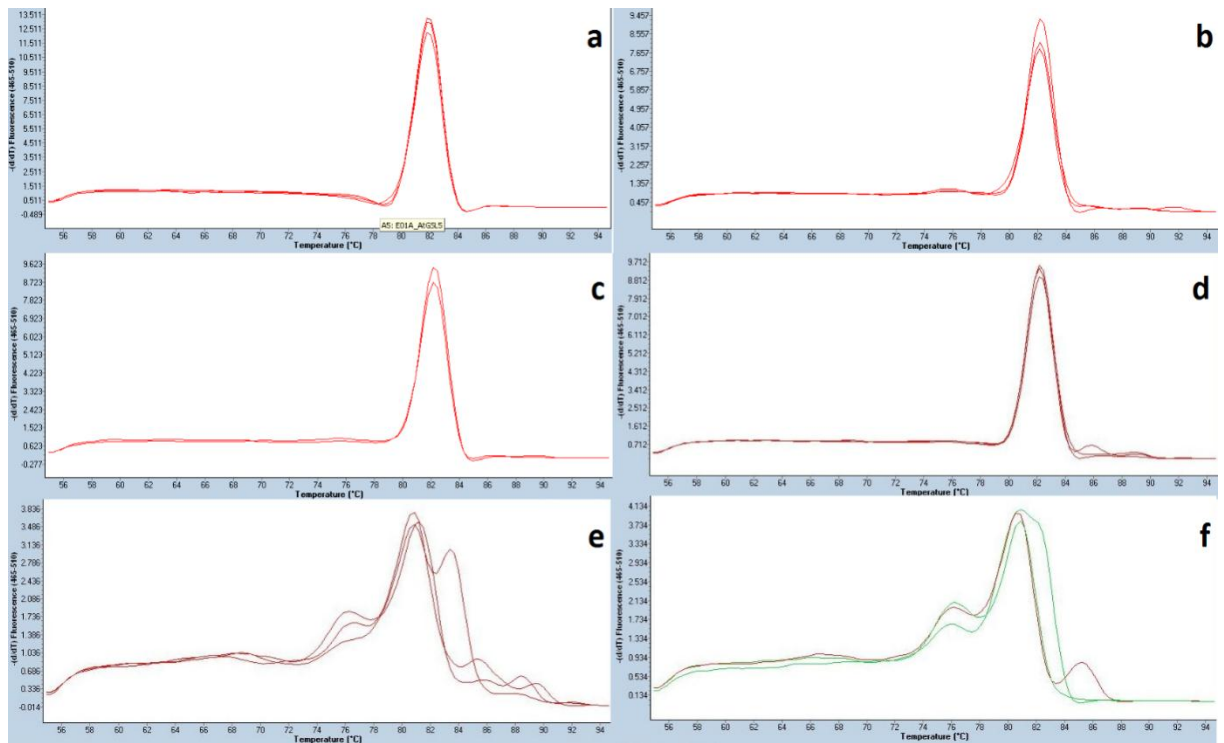
Die Spezifität einer Real-Time PCR Analyse wird durch die Reaktionsbedingungen sowie die gewählten Primer bestimmt.

Grundsätzlich besteht während des Amplifizierungsprozesses die Möglichkeit einer Primer-Dimer-Ausbildung, wodurch es zur Bildung unspezifischer Produkte kommt. Weiters können unverdaute gDNA Reste im PCR-Ansatz ebenfalls amplifiziert werden und die Expressionsanalyse verfälschen

([http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR\\_Handbook\\_Update\\_FLR.pdf](http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf)

f). Aus diesem Grund werden zur Absicherung einer spezifischen Amplifikation die Schmelzkurven betrachtet. In Abb. 17 sind die Kurvenverläufe AtGSL05-Amplifikationen der Weizenlinien E01-A, E01-B, E04-B, E04-C, E07-A und dem Wildtyp dargestellt. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Kurven der transgenen Linien (a bis d) und der Linie E07-A (e), sowie des Wildtyps (f). Während sich in den Linien E01-A, E01-B, E04-B und E04-C die Kurven der drei Messungen pro Probe eindeutig überlagern und es zur Ausbildung eines deutlichen Peaks bei 82°C kommt, zeigen

die Kurven des Wildtyps und der Linie E07-A diffuse Verläufe. Aus diesem Grund konnte eine Amplifizierung der Callosesynthese AtGSL05 in diesen beiden Linien ausgeschlossen werden.

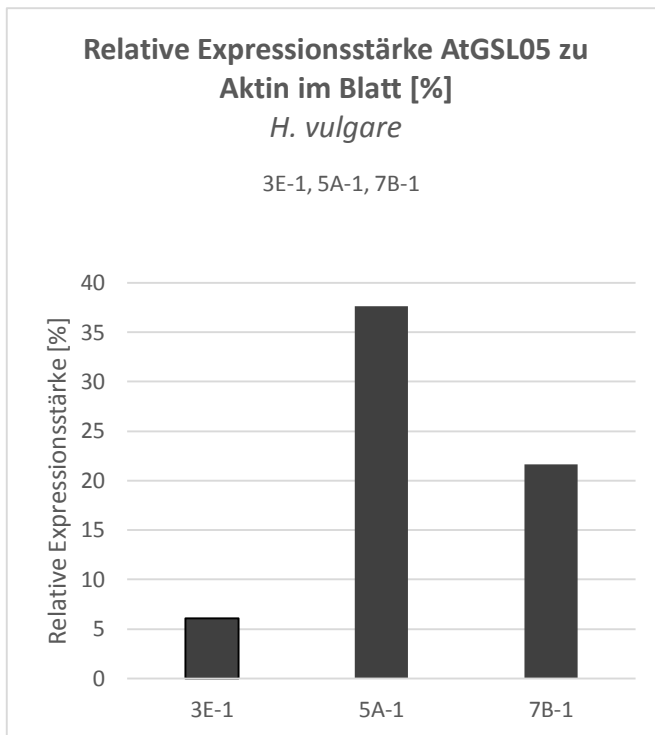


**Abb. 17: Schmelzkurvenverläufe bei der Amplifikation der Callosesynthese AtGSL05 in Weizen.** (a) Linie E01-A; (b) Linie E01-B; (c) Linie E04-B; (d) Linie E04-C; (e) Linie E07-A; (f) Wildtyp. Optimale Schmelzkurven und spezifische Fragmentamplifikation bei (a) bis (d). Kurven in (e) und (f) zeigen unspezifische Amplifikation an.

#### EXPRESSION DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN BLATTGEWEBE TRANSGENER GERSTELINIEN

Für die quantitative Expressionsanalyse der Callosesynthese AtGSL05 mittels RT-qPCR wurde die Primerpaarung *AB03-AtGSL5-fwd-exp* und *AB04\_AtGSL5\_rev* gewählt. Die Amplifikation des Referenzgens Aktin wurde mit den Primern *AG\_Hv\_Actin\_for* und *AG\_Hv\_Actin\_rev* durchgeführt. Pro Probe wurden drei Messungen für AtGSL05 und drei Messungen für Aktin vorgenommen. Zur Verifizierung einer spezifischen Synthese wurden die Schmelzkurven betrachtet. Anhand der protokollierten CP-Werte für AtGSL05, sowie Aktin und der Formel in Abb. 14 wurde die relative Expressionsstärke der Callosesynthese [%] ermittelt und in Abb. 18 dargestellt. Es konnte in allen drei transgenen Linien eine Expression nachgewiesen werden. Die stärkste Expression mit fast 38 % zeigte die Linie 5A-1, gefolgt von den Linien 7B-1 mit knapp 22 % und 3E-1 mit etwa 6%. Mithilfe der Analyse der Schmelzkurven konnte eine AtGSL05 spezifische Amplifikation bei der Linie 7C-1, sowie des Wildtyps ausgeschlossen werden.



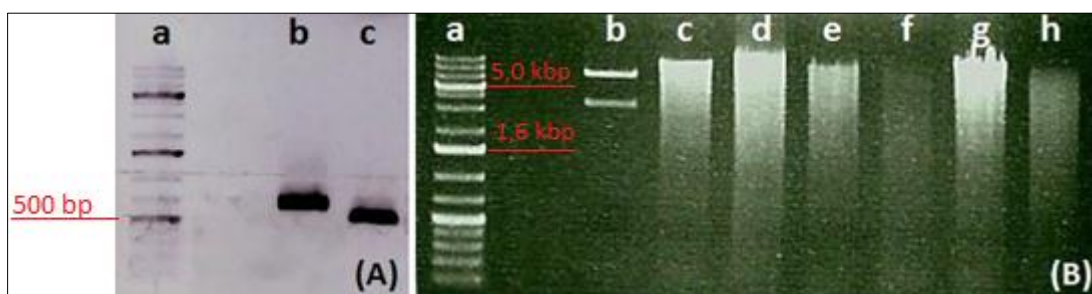


**Abb. 18:** Relative Expressionsstärke der Callosesynthase AtGSL05 im Blattgewebe von Gerste. Linie 3E-1 mit 6,06 %, Linie 5A-1 mit 37,63 %, Linie 7B-1 mit 21,61 %.

## SOUTHERN BLOT TRANSGENER WEIZENLINIEN

Der Southern Blot sollte Erkenntnis darüber liefern, wie oft die Sequenz für die Callosesynthase AtGSL05 im Pflanzengenom integriert wurde und ob es sich bei den Linien E01-A, E01-B, E04-B, E04-C und E07-A um tatsächlich unterschiedliche Linien handelt. Das Ausgangsmaterial stellte isolierte gDNA aus nachweislich transgenen Pflanzen, sowie des Wildtyps und der Linie E07-A dar. Um die Integrationsstellen der Callosesynthase im Genom detektieren zu können, wurde eine AtGSL05-spezifische Sonde hergestellt. Dabei handelte es sich um ein 519 bp langes Fragment, bestehend aus einem Sequenzteil von der Callosesynthase AtGSL05 und des GFP-Tags. Die Sonde wurde mit Digoxigenin-markierten UTPs hergestellt, die im Zuge des Southern Blots wiederum von einem Digoxigenin-Antikörper gebunden werden. Als Ausgangsmaterial für die Amplifizierung der Sonde und der Kontrolle wurde der Vektor pYES\_AtGSL05\_GFP\_SSS1 gewählt. Bei der anschließenden Gelelektrophorese zur Überprüfung der Sonde zeigte sich sowohl für die Digoxigenin-markierte Sonde (b), als auch für die Kontrolle (c) (siehe Abb. 19 (A)) je eine deutliche Bande. Der Größenunterschied der beiden Banden beruht auf dem Einbau der markierten Nucleotide in die Nucleinsäuren der Sonde.

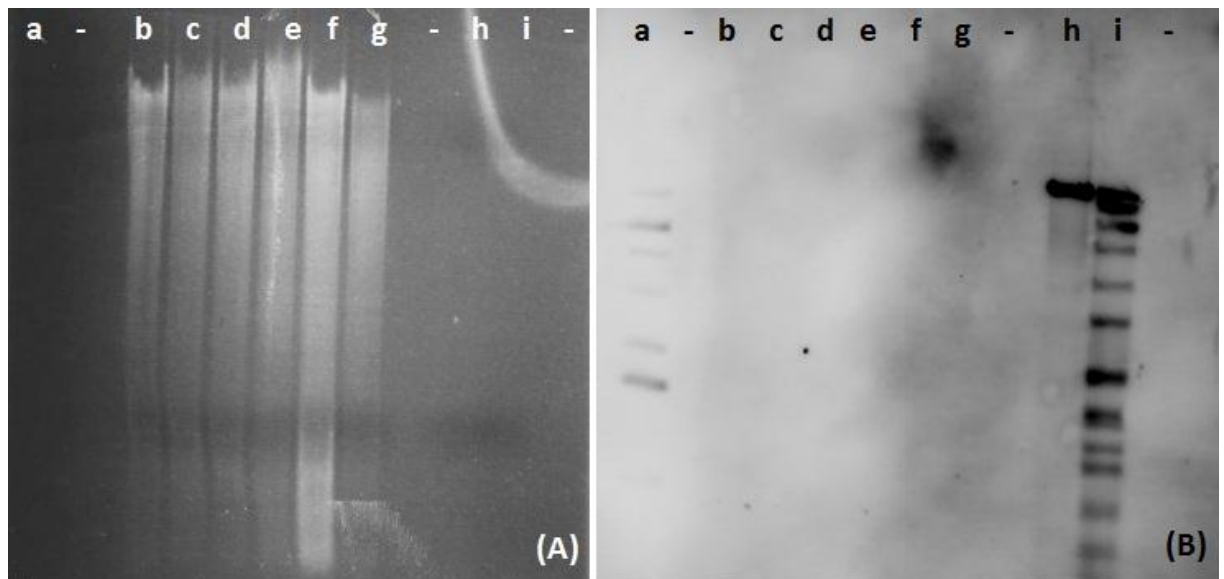
Zur Auswahl geeigneter Proben für die Durchführung des Southern Blots wurden Konzentration und Qualität der gDNA am Spektrophotometer überprüft. Als Positivkontrolle diente der Vektor pYES\_AtGSL05\_GFP\_SSS1. Der Restriktionsverdau der gDNA der Proben wurde mit der Endonuklease BamHI durchgeführt. Die Positivkontrolle wurde mit dem Restriktionsenzym NheI HF geschnitten. Die Überprüfung der Restriktionsverdau-Ansätze ist in Abb. 19 (B) dargestellt. Die gleichmäßige Schmier der Proben (c) bis (h) zeigen die Fragmentierung der DNA. Durch den zweifachen Schnitt der Positivkontrolle (b) wird das Plasmid linearisiert und es ergeben sich zwei Banden bei 8523 bp und 3482 bp, wobei das größere Fragment das für AtGSL05 spezifische Fragment trägt.



**Abb. 19: Vorbereitungen zum Southern Blot der genomischen Weizen DNA.** (A) AtGSL05-spezifische Sonde. (a) Marker; (b) Amplifikat mit eingebauten, Dig-markierten Nukleotiden; (c) Kontrollamplifikat ohne Dig-markierte Nukleotide (519 bp). (B) Restriktionsverdau des Kontrollplasmids und der genomischen DNA. (a) Marker; (b) Verdau des Plasmids pYES\_AtGSL05\_GFP\_SSS1 mit NheI HF; es entstehen zwei Banden bei 8523 bp und 3482 bp; (c) bis (h) Vollständiger Restriktionsverdau mit BamHI. (c) Linie E01-A; (d) Linie E01-B; (e) Linie E04-B, (f) Linie E04-C; (g) Linie E07-A; (h) Wildtyp.

Für den Southern-Blot wurden ein 1kb-Marker als Größenstandard, ein Dig-Marker, die Positivkontrolle, sowie die Proben auf ein 0,8 %-iges Agarose-Gel aufgetragen und zwei Stunden im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Auftrennung der Fragmente wurde vor dem Transfer auf die Membran erneut überprüft und ist in Abb. 20 (A) dargestellt. Bei jeder Linie ist eine deutliche, gleichmäßig ausgeprägte Schmier über den gesamten Auftrennungsbereich zu erkennen. Im Zuge des Blottens sollte die Sonde an die AtGSL05-GFP Bereiche im Genom binden. Anhand der Größen der gebundenen Fragmente kann nachgewiesen werden, ob es sich um unterschiedliche transgene Linien handelt. Die Detektion erfolgte mittels eines Anti-Digoxygenin Antikörpers mit konjugierter Alkali Phosphatase und des chemilumineszenten Substrats CSPD. Die fertige Membran wurde im LAS-3000 Gerät bestrahlt und gebundenen Nukleinsäuren anhand des chemilumineszenten Signals detektiert. Im Zuge dessen erfolgte eine photographische Dokumentation der Membran in zeitlichen Abständen von 20 Minuten. In Abb. 20 (B) ist eine Aufnahme nach 120 Minuten dargestellt. Die beiden Spuren am Rand der Membran zeigen den 1 kb Plus Größenstandard in (a) und den Dig-Marker in Spur (i). Obwohl die Sequenz für AtGSL05 mittels qualitativer PCR nachgewiesen werden konnte, erscheinen bei sämtlichen Linien in den

Spuren (b) bis (g) keine Banden. Wie in Abb. 20 (B) ersichtlich gab es lediglich eine Hybridisierung mit der Positivkontrolle in Spur (h).



**Abb. 20: Southern Blot in Weizen.** (A) Agarosegel mit aufgetrennten Fragmenten vor dem Nukleinsäuretransfer auf die Membran; (a) 1 kb Plus Marker; (b) Linie E01-A; (c) Linie E01-B; (d) Linie E04-B; (e) Linie E04-C; (f) Linie E07-A; (g) Wildtyp; (h) pYES\_AtGSL5\_SSS1 (Positivkontrolle); (i) Dig-Marker VII. (B) Southern Blot Membran mit klar erkennbarem 1kb Plus Marker (a) und Dig-Marker VII (i) und der hybridisierten Positivkontrolle bei 8523 bp (h). In den gDNA Spuren (b) bis (g) kann keine Sondenhybridisierung detektiert werden.

## INFEKTION DER ÄHREN VON TRITICUM AESTIVUM MIT *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Der phytopathogene Pilz *Fusarium graminearum* ist für erhebliche Ernteverluste bei Weizen verantwortlich. Da das Kohlenhydrat Callose in der natürlichen Immunabwehr eine Rolle spielt, wurde untersucht, ob die Überexpression der Callosesynthase AtGSL05 die Infektionsstärke des Pathogens in Weizenpflanzen beeinflusst. Die Resistenz gegen eine initiale Infektion wird als Typ I Resistenz beschrieben. In diesem Fall gelingt es dem Pathogen nicht, die primäre Abwehrbarriere der Pflanze durch beispielsweise Zellwandverdickungen zu überwinden. Dadurch kommt es zu keiner Symptomausbildung in der Pflanze (Mysore & Ryu, 2004). Bei einer Typ II Resistenz findet eine lokal begrenzte Infektion der inokulierten Blüte statt und wird in diesem Bereich durch Absterben des Gewebes begleitet. Eine systemische Ausbreitung des Pilzes in der gesamten Ähre wird jedoch verhindert. Grundsätzlich dient die Methode der punktuellen Inokulation der Überprüfung einer Typ II Resistenz (Yan et al., 2011).

Die punktuelle Inokulation der Weizenähren erfolgte fünf bis sechs Wochen nach Aussaat zum Zeitpunkt der Anthese und wurde gegen drei Uhr Nachmittags durchgeführt. Pro Floret wurden

10 µl einer Konidiensuspension von *F. graminearum* 8-1 in einer Konzentration von 10 Konidien/µl in die Blüte eingebracht. Bei den transgenen Linien E01-A, E01-B, E04-B und E04-C wurden jene Pflanzen verwendet, die eine Resistenz gegenüber Hygromycin aufzeigten und deren gDNA positive Ergebnisse bei der AtGSL05 spezifischen PCR lieferten. Als Kontrollpflanzen diente einerseits der Wildtyp, sowie Pflanzen der Linie E07-A, da bei dieser Linie kein Nachweis der Callosesynthase AtGSL05 erbracht werden konnte.

Die Infektion wurde ebenfalls mit Konzentrationen von 20 Konidien/µl und 5 Konidien/µl getestet, wobei die makroskopische Auswertung der Infektionsstärke am besten bei einer Konzentration von 10 Konidien/µl möglich war. Die Auswertung wurde sieben Tage nach erfolgter Inokulation vorgenommen, da zu diesem Zeitpunkt ein deutlicher Unterschied zwischen infiziertem und nicht infiziertem Material getroffen werden konnte. Aufgrund der Verstopfung der Leitbündel durch das Pilzmyzel kam es in weiterer Folge oftmals zur Austrocknung der restlichen, wenn auch nicht direkt infizierten Blüten und zur typischen Ährenbleiche (siehe Abb. 21 d und e). Auch blieb in diesem Fall die Karyopsenbildung aus.

Bei den meisten Ähren konnte eine leichte Infektion an den Inokulationsstellen bereits nach drei bis vier Tagen beobachtet werden. Die infizierten Blüten waren deutlich zu erkennen und zeichneten sich durch Verbräunungen der Spelzen aus (siehe Abb. 21 a und b). Beim Öffnen der Blüten zeigte sich dunkles, nekrotisches Gewebe, sowie ein dichtes Myzel der ausgekeimten Konidien. Die Infektion begrenzte sich jedoch nicht entsprechend einer Typ II Resistenz auf die inokulierten Blüten, sondern breitete sich ausgehend vom Inokulationspunkt in beide Richtungen aus, wobei hier die Tendenz eher in Richtung Ährenspitze lag.

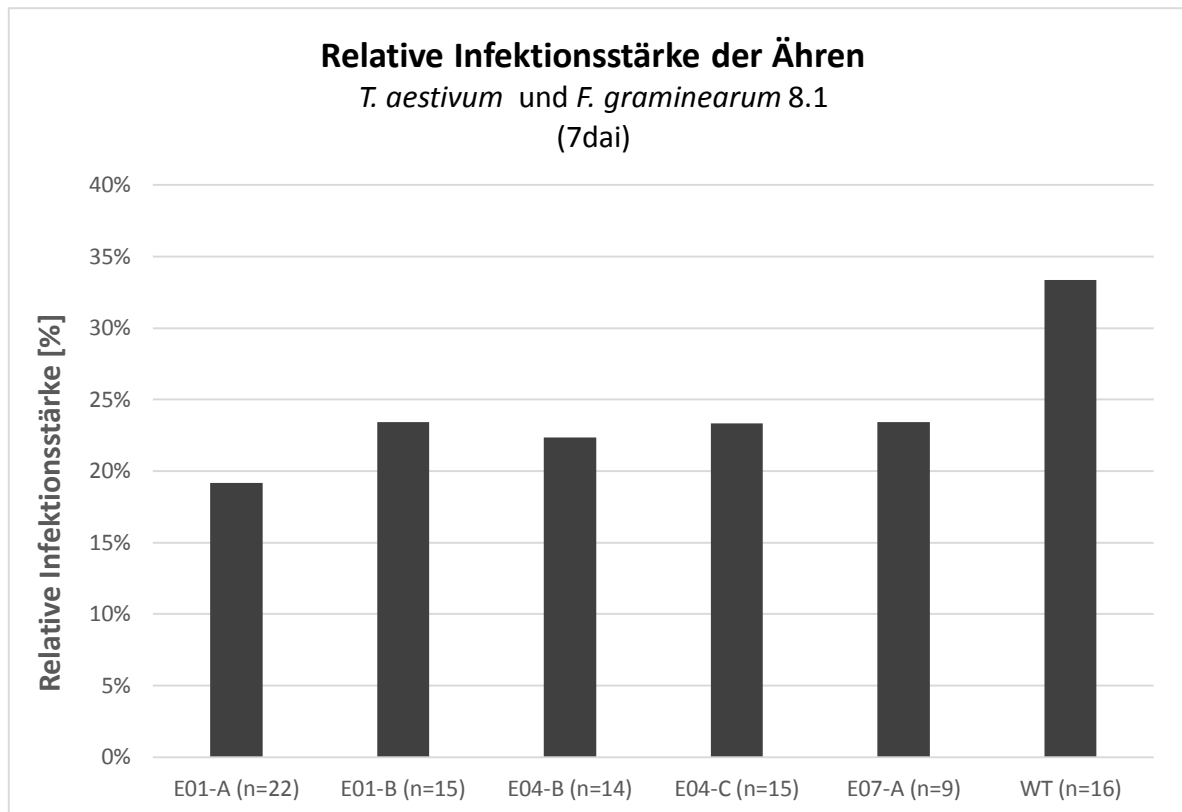
Abb. 21 (d) und (e) zeigen Weizenähren 14 Tage nach erfolgter Inokulation mit *F. graminearum* (d und e) bzw. mit Wasser (c). Während sich die Infektion in (d) über die gesamte Ähre ausbreitet, beschränkt sich diese bei (e) nur auf die unteren Bereiche der Ähre. Die oberen, matt grünen Bereiche sind aufgrund des infektionsbedingten Wasser- und Nährstoffmangels ausgebleicht. Die Weizenähre (c) wurde mit Wasser inokuliert und bildete im Gegensatz zu den infizierten Ähren keimfähige Karyopsen (siehe Abb. 21).



**Abb. 21: *Fusarium graminearum* auf Weizen.** (a) Linie: E04-C. Infektion 7 Tage nach Inokulation; Ähre mit zwei deutlich infizierten Ährchen (frontale Darstellung); die Spelzen der inokulierten Blüten sind schwarz gekennzeichnet; (b) Linie: E04-C. Infektion 7 Tage nach der Inokulation; Ähre mit deutlich infizierten Blüten im zentralen Bereich der Ähre (laterale Darstellung); (c) Linie: Wasserkontrolle 14 Tage nach Inokulation; (d) Linie E04-C 14 Tage nach Inokulation; Ähre mit vollständiger Ährenfusariose; (e) Linie E01-B 14 Tage nach Inokulation; der obere Teil der Ähre ist grün ausgebleicht, jedoch nicht infiziert.

Für die Bestimmung der relativen Infektionsstärke wurden die Gesamtblütenanzahl jeder Ähre, sowie die Anzahl der infizierten Blüten bestimmt und in Relation zueinander gesetzt. Die Bearbeitung der Daten erfolgte mittels Excel. Mithilfe des Statistikprogramms „Daniel's XL Toolbox (Version 6.60)“ wurde ein einfaktorielles ANOVA Bericht generiert. Die daraus resultierenden Daten zeigen die relative Infektionsstärke von *F. graminearum* 8-1 auf Weizen sieben Tage nach erfolgter Inokulation (siehe Abb. 22). Die Ordinate des Diagramms beschreibt die Infektionsstärke in Prozent. Entlang der Abszisse sind die einzelnen Linien mit jeweiligem Stichprobenumfang dargestellt. Eine vollständige Typ II Resistenz konnte bei keiner Linie beobachtet werden. Verglichen mit dem Wildtyp zeigt sich jedoch bei allen transgenen Linien eine Reduktion der Infektionsstärke um etwa 10%. Sieben Tage nach der Inokulation liegt die mittlere Infektionsstärke bei Linie E01-A bei 19,2 %, bei Linie E01-B bei 23,4%, bei Linie E04-B bei 22,3%, bei Linie E04-C bei 23,3%, bei Linie E07-A bei 23,4% und beim Wildtyp bei 33,3%.

Nach der statistischen Datenanalyse nach Bonferroni-Holm liegt ein signifikanter Unterschied in der Infektionsstärke beim Wildtyp und der transgenen Linie E01-A vor. Trotz der leichten Reduktion der Infektionsausprägung konnte bei den weiteren Linien kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

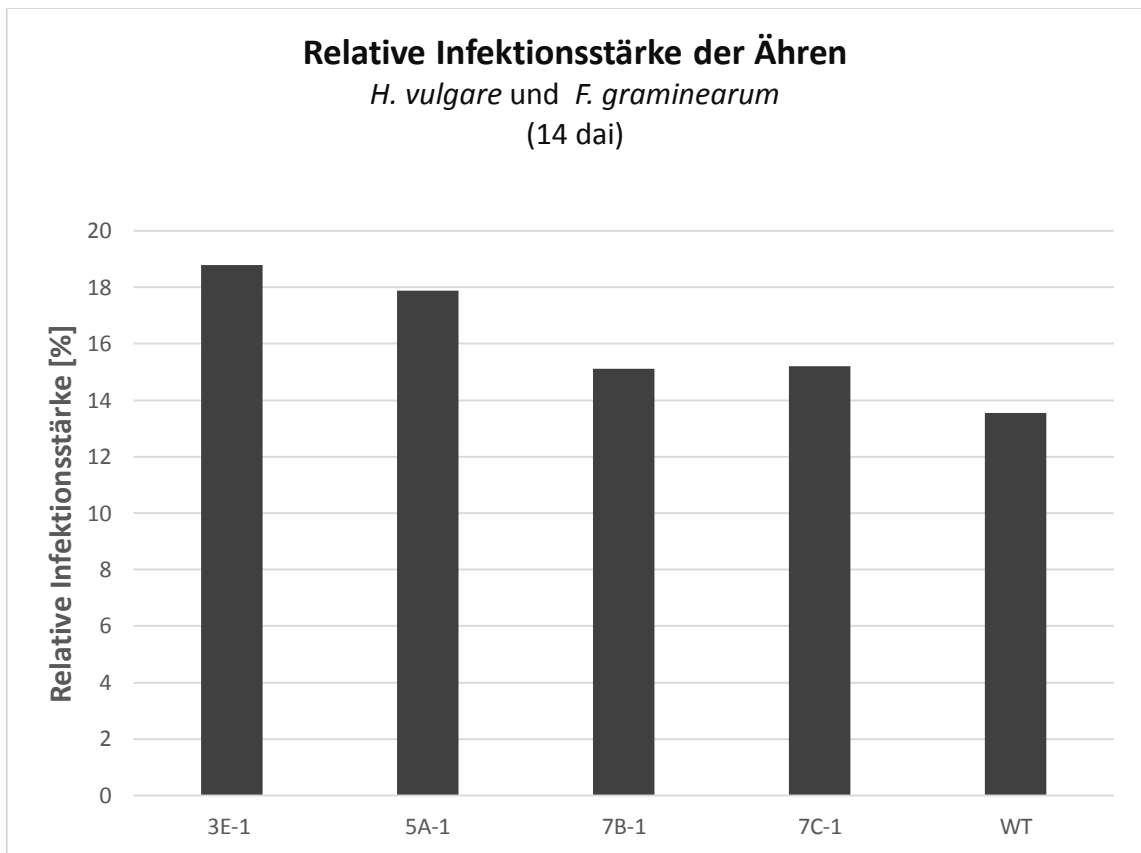


**Abb. 22: Relative Infektionsstärke [%] der Ähren bei einer Infektion von Weizen mit *Fusarium graminearum* 7 Tage nach Inokulation.** Linie E01-A mit 19,19 %, Linie E01-B mit 23,44 %, Linie E04-B mit 22,34 %, Linie E04-C mit 23,34 %, Linie E07-A mit 23,43 % und der Wildtyp mit 33,35 %.

#### INFEKTION DER ÄHREN VON *HORDEUM VULGARE* MIT *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Im Vergleich zu Weizen gelten Gerstepflanzen als weniger anfällig auf eine Infektion mit *Fusarium graminearum*. Meist beschränkt sich die Infektion auf die initial infizierten Blüten und es kommt zur Ausbildung einer Typ II Resistenz (Boddu et al., 2006). In diesem Infektionsversuch wurde untersucht, ob die Überexpression der Callosesynthase AtGSL05 einen Einfluss auf einen Befall der Ähren mit *F. graminearum* zeigt. Als Versuchslinien wurden die transgenen Linien 3E-1, 5A-1, 7B-1, 7C-1 und als Kontrolle der Wildtyp gewählt. Es wurden zwei gegenüberliegende Florets zum Zeitpunkt der Anthese mit 10 µl einer Konidien suspension in einer Konzentration von 20 Konidien/µl inokuliert. Die Auswertung erfolgte nach 14 Tagen. Zur Bestimmung der relativen Infektionsstärke wurde die Anzahl infizierter Blüten ausgezählt und in Relation zur Gesamtanzahl an Blüten gesetzt. In Abb. 23 ist die relative Infektionsstärke aller transgenen Linien und des Wildtyps (WT) dargestellt. Bei Gerste konnte keine positive Auswirkung der Überexpression der Callosesynthase AtGSL05 auf eine Infektionsanfälligkeit beobachtet werden. Im Vergleich zum Wildtyp und der Linie 7C-1, bei der keine Expression von AtGSL05 verzeichnet werden konnte, zeigten die transgenen Linien einen stärkeren Befall mit dem pilzlichen Pathogen. Die

Befallsstärke liegt grundsätzlich zwischen etwa 13 % und 19 %; die stärkste Infektion wurde dabei bei Linie 3E-1 mit 18,8 %, die geringste Befallsstärke beim Wildtyp mit 13,6 % beobachtet.



**Abb. 23: Relative Infektionsstärke [%] der Ähren bei einer Infektion von Gerste mit *Fusarium graminearum* 14 Tage nach Inokulation.** Linie 3E-1 mit 18,79 %, Linie 5A-1 mit 17,87 %, Linie 7B-1 mit 15,12 %, Linie 7C-1 mit 15,20 % und der Wildtyp mit 13,56 %.

Da die relative Infektionsstärke das Verhältnis der Anzahl der Gesamtährchen zu infizierten Ährchen widerspiegelt, steht dieser Wert jedoch auch in Abhängigkeit der grundsätzlichen Anzahl der Ährchen pro Ähre. Die Gesamtanzahl variiert dabei zwischen 25 und 30 ausgebildeten Ährchen. Abb. 24 zeigt infizierte Ähren aller transgenen Linien (c bis f) und des Wildtyps (b), sowie einer Negativkontrolle (a) 14 Tage nach Inokulationszeitpunkt. Die Pfeile markieren die behandelten Ährchen. Die erfolgreiche initiale Infektion durch Konidien von *F. graminearum* ist durch die deutliche Verbräunung des Gewebes an diesen Stellen zu erkennen. In den meisten Fällen beschränkte sich die Infektion auf die beiden direkt inokulierten Ährchen und es konnte keine Ausbreitung in der Ähre beobachtet werden. Im Falle einer weiteren Ausbreitung des Pilzes im Ährengewebe verlief die Infektion Richtung Ährenbasis. Trotz der Beschränkung nekrotischer Symptome auf die direkt inokulierten Blüten variierte die Anzahl vollständig ausgebildeter, gesunder Karyopsen zwischen inokulierten Ähren (b bis f) und der Negativkontrolle (a). Die Ähre der Negativkontrolle bildete gleichmäßig in der gesamten Ähre Karyopsen aus. Besonders bei den

transgenen Linien (c bis f) kam es nur oberhalb der Inokulationsstellen zur Ausbildung von Korn, wodurch sich ein asymmetrischer Phänotyp der Ähren ausprägte.



**Abb. 24: *Fusarium graminearum* auf Gerste 14 Tage nach punktueller Inokulation.** Die Ähren (b) bis (f) zeigen eine lokal begrenzte Infektion an den Inokulationsstellen durch Verbräunung und Absterben der Ährchen und eine ungleichmäßige Karyopsenbildung in der Ähre. (a) Wasserkontrolle mit gesunder Karyopsenbildung in der gesamten Ähre; (b) Wildtyp (c) Linie 3E-1; (d) Linie 5A-1; (e) Linie 7B-1; (f) Linie 7C-1.



## CALLOSE-DETEKTION IN DER ÄHRE DURCH KONFOKALE LASER-SCANNING MIKROSKOPIE

Das 1,3- $\beta$ - Glukan Callose wird unter anderem im Zuge der Immunantwort von der Pflanze synthetisiert und konnte im untersuchten Ährengewebe nachgewiesen werden. Grundsätzlich tritt das Kohlenhydrat vor allem im Phloem auf, wobei Siebplatten stets eine stark ausgeprägte Fluoreszenz zeigen. Bei einer Überexpression der Callosesynthase in *Brachypodium* kommt es zu einer deutlich erhöhten Ablagerung des Kohlenhydrats im Bereich des Rachisknotens und verursacht eine Verstopfung der Leitelemente im Gewebe. Dadurch kann das Pathogen in seiner weiteren Ausbreitung gehindert werden und eine Resistenzausbildung gegen *F. graminearum* in der Pflanze gefördert.

Für die mikroskopische Analyse wurden Ähren der Linie E01-A und E04-B, sowie des Wildtyps mit *F. graminearum* inokuliert und sieben Tage nach erfolgter Infektion geerntet. Zur Entfernung des Chlorophylls wurden die Ähren über einen Zeitraum von 14 Tagen in Ethanol [100%] gelagert. Es wurden sehr feine Schnitte des Bereichs des Rachisknotens angefertigt und mit einer Dikaliumhydrogenphosphat-Anilin-Blau Färbelösung behandelt. Die fertigen Schnitte wurden im Fluoreszenzmikroskop mit UV-Beleuchtung und DAPI-Filter auf jene Bereiche untersucht, die eine deutliche Ablagerung der Callose aufzeigten. Bei der Fluoreszenz-Mikroskopie sind vor allem im Phloem Calloseablagerungen als blaue, hell leuchtende Punkte zu erkennen, wobei die Callosehaltigen Siebplatten eine besonders starke Fluoreszenz zeigten. Anschließend wurden mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie 3D-Projektionen von Z-Stapel Aufnahmen erstellt und die Ablagerungen fotodokumentiert.

Sowohl in den transgenen Linien, als auch im Wildtyp konnte das Kohlenhydrat nachgewiesen werden. In Abb. 25 und 26 sind Callose-haltige Stellen mit einer roten Umrahmung hervorgehoben und einzelne Calloseablagerungen mit roten Pfeilen markiert. Die Ablagerungen heben sich als leuchtend-weiße Punkte deutlich vom dunklen Hintergrund ab. In Abb. 25 sind drei Übersichtsaufnahmen des Leitbündelgewebes der Linien E01-A, E01-B und des Wildtyps (a bis c), sowie eine vergrößerte Aufnahme der Calloseelemente aus Linie E01-B (d) dargestellt. In (d) sind neben den hell-leuchtenden Siebplatten (S) zahlreiche, kleinere Ablagerungen zu erkennen. Dabei könnte es sich um das gesuchte Syntheseprodukt der Callosesynthase AtGSL05 handeln, die sich im weiteren Verlauf zu Verstopfungen der Zellen erweitern können.

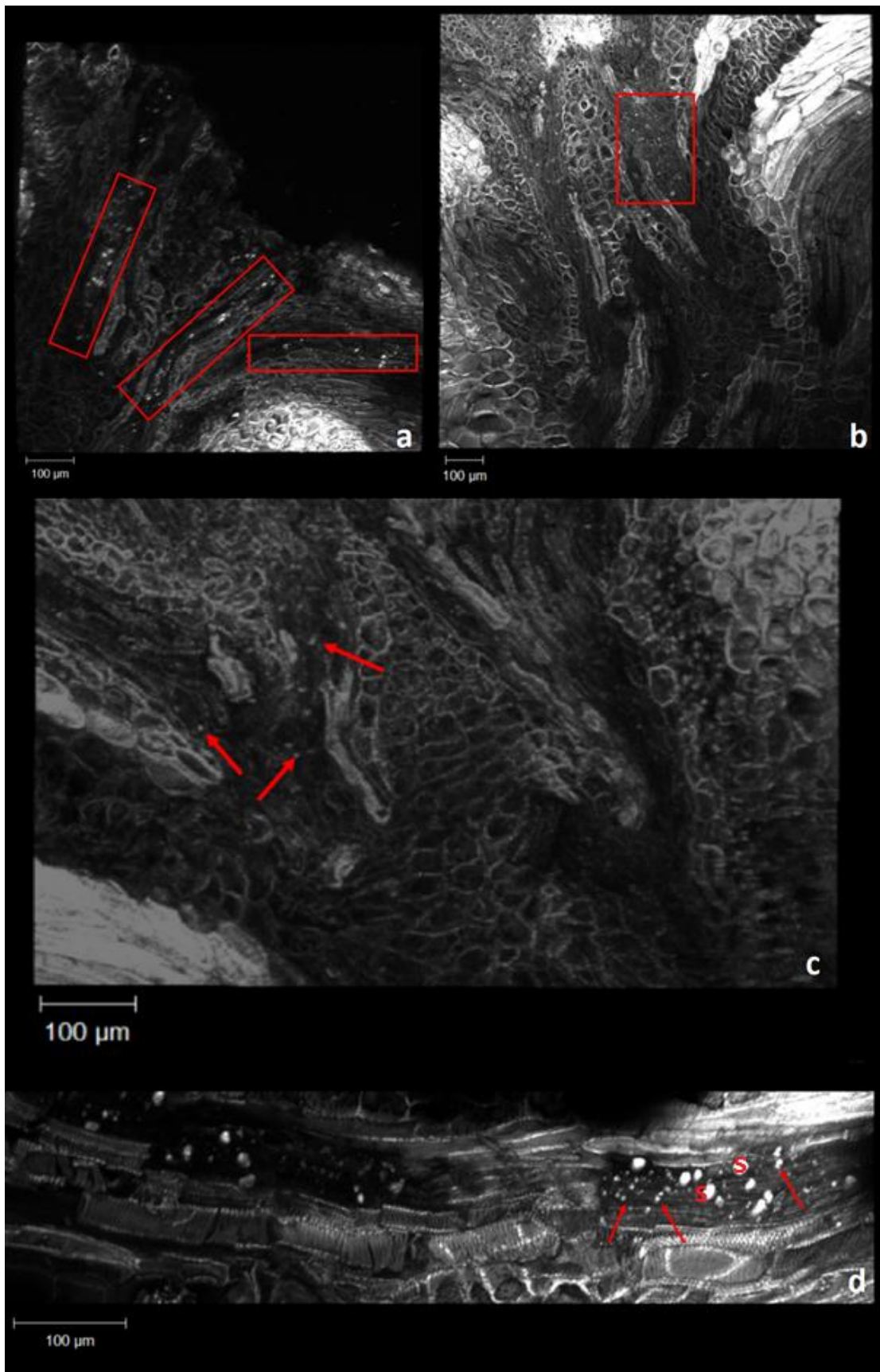
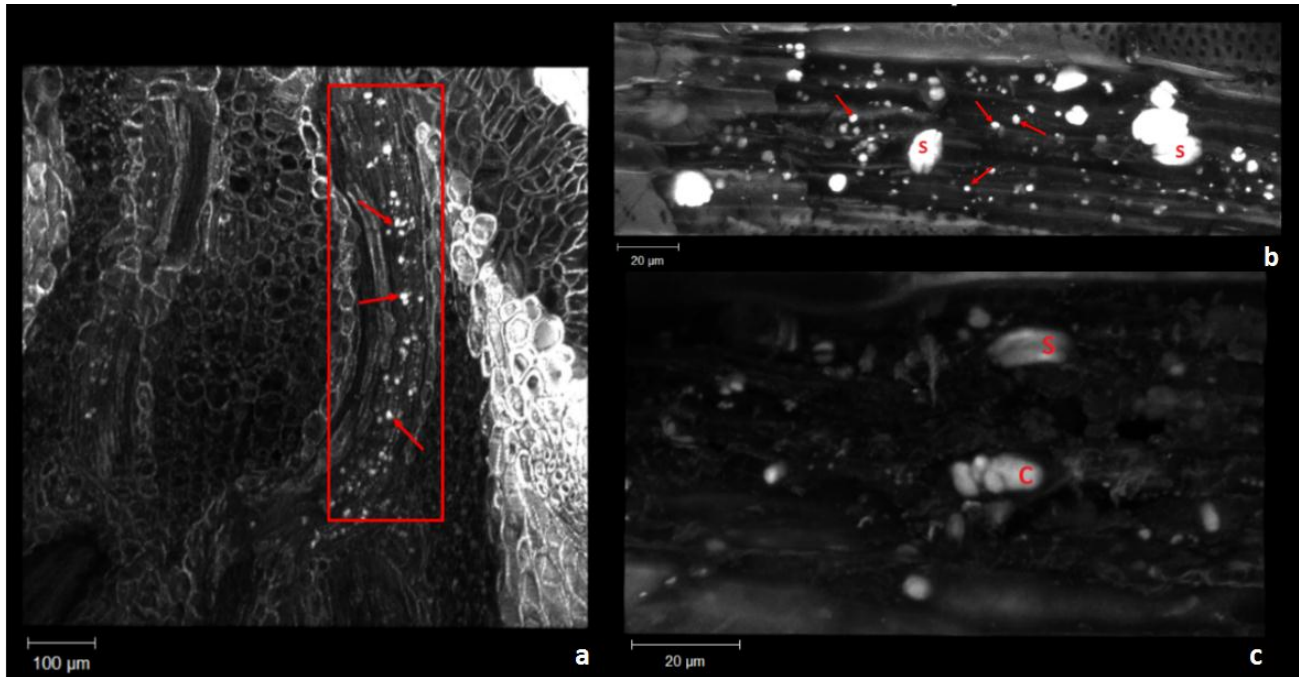


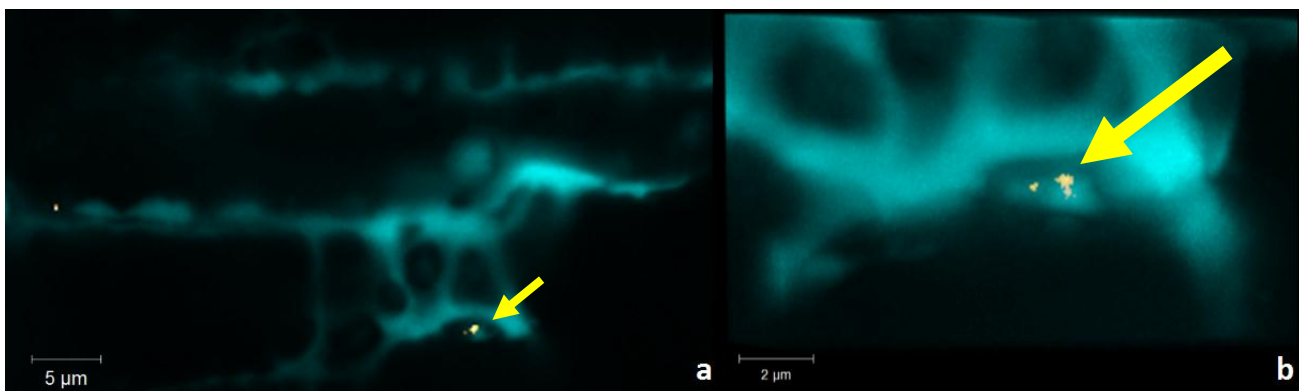
Abb. 25: CLSM-Aufnahmen im Bereich des Rachisknotens bei einer Infektion von Weizen mit *F. graminearum*. (a) Übersichtsaufnahme der Linie E01-A; (b) Übersichtsaufnahme der Linie E01-B; (c) Übersichtsaufnahme des Wildtyps; (d) Detailaufnahme der Linie E01-B. Bei weiß-leuchtenden Punkten handelt es sich um Calloseablagerungen. Callose-haltige Bereiche sind rot umrandet bzw. mit roten Pfeilen gekennzeichnet. (S) Siebplatten.

In Abb. 26 (a bis c) sind Aufnahmen der Linie E04-B vier Tage nach Inokulation dargestellt. In der Übersichtsaufnahme (a) des Gewebes des Rachisknoten sind innerhalb des rot-markierten Bereichs deutliche Calloseablagerungen im Phloem zu sehen. Die roten Pfeile weisen auf einzelne Callosepunkte, die in den Aufnahmen (c) und (d) vergrößert in einer 3D-Projektion abgebildet sind. Darstellung (d) zeigt eine Siebplatte (S), sowie einen für die Resistenzbildung typischen Callose-Plaques (C) in einer Siebzelle.



**Abb. 26: CLSM-Aufnahme der Weizenlinie E04-B nach einer Infektion mit *Fusarium graminearum*.** (a) Übersichtsaufnahme des Rachisknotens mit Callosebildung im Phloem (rote Umrandung des Bereichs mit Indikation einzelner Calloseablagerungen durch rote Pfeile); (b) Detailaufnahme des Bereichs mit Siebplatten (S) und zahlreichen, leuchtenden Callosemolekülen. (c) Typische Callose-bedingte Verstopfung (C) der Zelle zur Pathogenabwehr; (S) Siebplatte.

Von besonderem Interesse ist Abb. 27 (a) und (b), die möglicherweise die Beobachtung des Enzyms Callosesynthase (gelb) innerhalb der Phloem-Zellen (blau) dokumentieren.



**Abb. 27: Callosesynthasekomplex in Phloemzelle von Weizen.**

## DISKUSSION

Ziel dieser Masterarbeit war die molekularbiologische Charakterisierung genetisch modifizierter Gerste- und Weizenlinien mit Hinblick auf eine Überexpression der Callosesynthase AtGSL05. Die erfolgreiche Integration und Überexpression des gewünschten Gens gelang bereits in der Modellpflanze *Brachypodium distachyon* (Hanak, 2014). Da es sich bei Gerste und Weizen ebenfalls um Vertreter der Süßgräser mit zusätzlich wichtiger Bedeutung in der Landwirtschaft handelt, wurden die Untersuchungen auf diese Pflanzenfamilien erweitert. Als Selektionsverfahren erfolgreich modifizierter Pflanzen diente die Untersuchung auf eine Hygromycinresistenz im Blattgewebe. Weiters wurde die Integration des Plasmids in die gDNA überprüft und die Expressionsstärke der Callosesynthase AtGSL05 bestimmt. Da bereits positive Korrelationen zwischen Callosedepositionen und Pathogenabwehr beobachtet werden konnten, lag ein besonderer Fokus auf den Auswirkungen der Überexpression der Callosesynthase hinsichtlich der Ausbildung von Ährenfusariosen verursacht durch *Fusarium graminearum*. Zelluläre Ablagerungen des Kohlenhydrats wurden im Infektionsbereich des Rachisknotens im Zuge der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie fotodokumentiert. Im folgenden Abschnitt werden die Beobachtungen und Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert und interpretiert.

### ÜBEREXPRESSION DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN TRANSFORMIERTEN GERSTE- UND WEIZENLINIEN

Die Callosesynthase AtGSL05 ist im Plasmid an eine Hygromycin-Phosphotransferase geknüpft und ermöglicht dadurch die Selektion auf erfolgreich transformierte Pflanzen. Diese Selektionsmethode gibt bereits erste Hinweise auf die Expression des Plasmids, da nur im Falle einer Synthese der Hygromycin-Phosphotransferase das Antibiotikum durch Phosphorylierung seine Wirkung verliert (Padilla und Burgos, 2010). Gesunde Blattstücke verweisen auf eine positive Integration, Expression und Translation der tDNA. Bei Weizen- und Gerstepflanzen äußert sich der Unterschied zwischen resistenten und sensitiven Pflanzen durch Antibiotikum-induziertes Absterben des Gewebes sensitiver Pflanzen etwa fünf bis zehn Tage nach erfolgter Exposition auf das Selektivmedium. Während dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass bei jeder Weizenlinie rund ein Drittel der Individuen keine Hygromycinresistenz aufzeigt. Dies beruht vermutlich darauf, dass es sich bei den Pflanzen um keine homozygoten Individuen hinsichtlich der integrierten Callosesynthase AtGSL05 handelt und es in jeder neuen Generation zur Auskreuzung des Plasmids kommt. Zwar zählen sowohl Weizen, als auch Gerste zu den Selbstbefruchtern, jedoch kommt es nach Mendelschen Regeln bei heterozygoten Elterpflanzen bei 25% der Nachkommen nicht zur Ausprägung des jeweiligen Merkmals (Bresinsky et al., 2008). Bei Gerste

wurde die Linie 5A-1 als homozygot angenommen, da hier bei sämtlichen Individuen eine erfolgreiche Integration des Konstrukts nachgewiesen werden konnte. Linie 3E-1 und 7B-1 gelten aufgrund einzelner Individuen ohne Hygromycinresistenz als heterozygot hinsichtlich der Callosesynthase AtGSL05 und der anknüpfenden Hygromycin-Phosphotransferase. Einen besonderen Fall stellten in Gerste die Linie 7C-1 und in Weizen die Linie E07-A dar. Diese vermeintlich transgenen Linien erwiesen sich in sämtlichen Fällen weder als Hygromycin-resistent, noch konnte das Konstrukt via PCR in der gDNA nachgewiesen werden. Im Falle eines Translationsproblems durch ungünstige Integration des Konstrukts in der gDNA, wäre es zu keiner Hygromycin-Resistenz gekommen, jedoch wäre das Konstrukt durch AtGSL05 spezifische PCR-Amplifikation nachweisbar gewesen. So unterliefen die Elterpflanzen einen Transformationsprozess ohne erfolgreiche Integration des Plasmids. Demnach sollten sich die Linien 7C-1 und E07-A gleich verhalten wie der Wildtyp. Abweichungen könnten daraus resultieren, dass Bruchstücke des Vektors im Genom verblieben sind und diese das Verhalten der Pflanze beeinflussen. Für die Versuchsreihen dienten die beiden Linien als zusätzliche Negativkontrolle zum Wildtyp.

Zur zusätzlichen Absicherung der Integration Callosesynthase AtGSL05 in der pflanzlichen gDNA diente eine AtGSL05-Fragmentspezifische PCR. Durch die spezifische Bindung der Primerpaarung innerhalb der Nukleotidsequenz von AtGSL05 erfolgte ausschließlich bei positiv transformierten Pflanzen eine Fragmentsynthese und die Bandendetektion durch elektrophoretische Auftrennung im Größenbereich von 2,5 kb. Da weder bei Hygromycin-sensitiven noch bei den Wildtypen eine Amplifikation mit den gewählten Primern beobachtet wurde, konnte eine unspezifische Primerbindung und irrtümliche Fragmentamplifikation ausgeschlossen werden.

Zur Bestimmung der Kopienzahl des Konstrukts in der genomischen DNA dient die Methode des Southern Blots, die sich besonders für *Agrobacterium*-medierte Transformationen eignet (Kohli et al., 2003). Der gezielte Restriktionsverdau der genomischen DNA und die anschließende Hybridisierung der Membran-fixierten DNA Fragmente mit einer spezifischen Sonde ermöglicht den Integrationsnachweis des Transgens, sowie die Differenzierung der einzelnen Linien untereinander (Brown, 2001). Der Integrationsnachweis ist von großer Bedeutung, da die Integrationslage einen hochgradigen Einfluss auf die Expression des Transgens ausüben (Kumar und Fladung, 2001) und bei unabhängigen Transformanten stark variieren kann (Kohli et al., 2003). Aufgrund einer oftmaligen Integration des künstlich eingebrachten Gens können bedeutende Genomabschnitte unterbrochen sein und eine erheblichen Destabilisierung des Genoms mit sich führen. Dies kann einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Pflanze resultieren, weshalb grundsätzlich jene Linien ausgewählt werden, deren Kopienzahl weniger als 5 beträgt.

Der Restriktionsverdau zur vollständigen Fragmentierung der genomischen DNA erfolgte mittels der Typ II Endonuklease BamHI bzw. mittels des Restriktionsenzym NheI HF bei der Positivkontrolle, da bei

diesen Endonukleasen die Schnittstellen außerhalb der Nukleotidsequenz und somit dem Hybridisierungsbereich der Sonde liegen. Die Umsetzung des chemilumineszenten Substrats CSPD durch die Alkalische Phosphatase ermöglicht die Detektion der gebundenen DNA-Fragmente. Die enzymatische Phosphorylierung führt zu einer starken Elektronenfreisetzung und resultiert in einem detektierbaren Lichtsignal und eignet sich zum Nachweis genomischer DNA bei Southern Blots (Martin und Bronstein, 1994). Die Kontrollbilder der Sondenherstellung, des Restriktionsverdau und der elektrophoretischen Auftrennung der DNA Fragmente dokumentieren drei Zwischenschritte der Southern Blot Durchführung. Die erfolgreiche Durchführung des Restriktionsverdau der pflanzlichen gDNA äußert sich durch eine gleichmäßig stark ausgeprägte Schmier über den gesamten Auftrennungsbereich. Die Positivkontrolle wurde zweifach durch NheI HF geschnitten und linearisiert, weshalb zwei deutliche Banden auf dem Kontrollgel erscheinen. Bei der Betrachtung des Blot-Agarosegels vor dem eigentlichen Blotten zeigte sich für jede Linie eine erfolgreiche Auftrennung der Fragmente. Die abschließende Detektion und photographische Dokumentation des chemilumineszenten Signals Sonden-hybridisierter DNA-Fragmente zeigt stark ausgeprägte Banden des Dig-Markers, sowie der Positivkontrolle. Dies verweist auf eine fehlerfreie praktische Durchführung des gesamten praktischen Arbeitsprozesses und auf eine erfolgreiche Anlagerung der einzelnen Komponenten untereinander. In den Spuren mit transferierter pflanzlicher gDNA müsste grundsätzlich eine Bande pro AtGSL05-Kopie im Genom erscheinen, da die Sequenz bereits via PCR erfolgreich amplifiziert werden konnte. Bei sämtlichen Versuchen konnte jedoch bei keiner der transgenen Linien die Integration via Southern Blot nachgewiesen werden. Durch das starke Signal der Positivkontrolle kann ein grundsätzliches Bindungsproblem der Sonde an die AtGSL05-GFP Sequenz ausgeschlossen werden. Die Größe der Sonde stellt einen weiteren Faktor dar. Sonden mit zu geringer Länge neigen zur Komplementarität zu weiteren Genabschnitten der DNA und binden daher unspezifisch, zu groß gewählte Sonden verlängern die Hybridisierungszeit. Mit einer Länge von 519 bp liegt die Größe der Sonde in einem geeigneten Bereich.

Die Schnittstellen der Restriktionsendonuklease BamHI zum Verdau der gDNA finden sich außerhalb der Sequenz für AtGSL05, weshalb eine Fragmentierung des gewünschten Gens auszuschließen ist. Da die gDNA vor dem Blotten auf ihre Qualität und Reinheit überprüft wurde, ist das Fehlen der Banden aufgrund von degenerierter DNA und Verunreinigungen der Probe eine unwahrscheinliche Ursache. Einen besonders wichtigen Faktor stellt die Menge der eingesetzten DNA dar, da diese Menge mit der Häufigkeit des gesuchten Gens korreliert. Der Nachweis eines Single-Copy-Gens in der gDNA kann jedoch trotz des Einsatzes hoher DNA Mengen Probleme bereiten (Brown, 2001). Da keine Kenntnisse darüber vorliegen, wie oft die tDNA in die genomische DNA integriert wurde, könnte eine zu geringe Menge an Probenmaterial durchaus eine mögliche Ursache der fehlenden Banden darstellen.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Genomanalyse, erfolgte die Untersuchung der Callosesynthase AtGSL05 auf Transkriptionsebene. Die Arbeiten zur Überprüfung einer erfolgreichen Transkription der tDNA basieren auf cDNAs hergestellt aus RNA-Isolaten. Trotz des negativen Ergebnisses des Southern Blots der genomischen Weizen-DNA konnte bei der Expressionsanalyse ein positiver Nachweis der Expression der Callosesynthase AtGSL05 in transformierten Weizen- und Gerstelinien erbracht werden. Bei der qualitativen Expressionsanalyse via RT-PCR konnten bei Weizen keine AtGSL05 spezifischen Banden nachgewiesen werden. Mithilfe einer weiteren Analyse derselben cDNA aus Weizen via RT-qPCR konnte jedoch eine sehr schwach ausgeprägte Expression der Callosesynthase in allen vier transformierten Weizenlinien dokumentiert werden. Das negative Ergebnis der qualitativen PCR ergibt sich vermutlich durch die Kombination aus geringer Expressionsstärke der Callosesynthase AtGSL05 und geringer Sensitivität der qualitativen RT-PCR mit anschließender Visualisierung durch Gelelektrophorese und UV-Licht-Exposition. Aufgrund der Betrachtung der Schmelzkurven der Primerpaarungen kann die spezifische Amplifikation der Callosesynthase AtGSL05 für transformierte Linien mit nachweislicher Hygromycin B-Resistenz und integrierter AtGSL05 Sequenz in der genomischen DNA angenommen werden (Pryor und Wittwer, 2006). Die beim Wildtyp, sowie der vermeintlich transgenen Linien ohne nachweisbarem Konstrukt beobachteten, diffusen Schmelzkurven verweisen auf eine unspezifische Amplifikation und verdeutlichen zusätzlich den Unterschied zwischen erfolgreich transformierten Pflanzen, sowie der Negativkontrollen. Zur Messung der Expressionsstärke wurden die Messwerte der Expression der Callosesynthase in Relation zur Expression des ubiquitär vorkommenden Gens  $\beta$ -Aktin gesetzt. Eine relative Expressionsstärke der Callosesynthase von 100 % beschrieb eine äquivalente Expression von AtGSL05 und Aktin. Die tatsächlich vermessene und berechnete Expressionsstärke liegt jedoch sowohl im Blatt- als auch im Ährengewebe bei maximal 1 %, wobei die Expression im Ährengewebe etwa um den Faktor 10 geringer ausfällt. Eine Ausnahme bildet die Linie E04-B, deren relative Expressionsstärke in der Ähre mit 2,5 % eine deutliche Abweichung vom Mittel darstellt. Aufgrund des Unwissens über die Kopienzahl des Gens AtGSL05 im pflanzlichen Genom der Weizenlinien und der unterschiedlichen Phänotypen des Hygromycin-Blattassays einzelner Pflanzen derselben Linie und Saatgutcharge, könnte diese Pflanze der Linie E04-B über eine höhere Kopienzahl verfügen und folgedessen eine Anhebung des Expressionslevels mit sich führen. In diesem Fall wäre jedoch auch eine signifikante Erhöhung im Blattgewebe zu erwarten. Grundsätzlich kann ein operativer Grund ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da die hoch sensitive RT- qPCR von Hand pipettiert wurde.

Einen weiteren Faktor stellt der Promotor der künstlich eingebrachten Callosesynthase dar. AtGSL05 steht sowohl bei Gerste, als auch bei Weizen unter der Kontrolle des Weizen-Glutathion-S-Transferase-1-Promotors TaGstA1 mit Epidermal-Gewebsspezifität (Himmelbach et al., 2007), wodurch sich die Expression der AtGSL05-GFP-Sequenz auf Epidermiszellen beschränkt. Da die analysierte RNA ein

Extraktionsprodukt des gesamten Ähren- bzw. Blattgewebes darstellt, könnte dies den beobachteten Unterschied in der Expressionsstärke zwischen Blatt- und Ährenmaterial erklären. Die Expression der Callosesynthase in Gerstebältern zeigte sich deutlich stärker als in den Weizenlinien und konnte bei den Linien 5A-1 und 7B-1 bereits mittels qualitativer RT-PCR nachgewiesen werden. Via RT-qPCR konnte ebenfalls die Expression in Linie 3A-1 nachgewiesen und durch die Betrachtung der Schmelzkurven die spezifische Amplifikation der Callosynthase AtGSL05 verifiziert werden. Die bereits während der Genomanalyse als homozygot angesehene Linie 5A-1 zeigte auch bei der Transkriptomanalyse mit Abstand das stärkste Signal. In Relation zu Aktin konnte eine relative Expressionsstärke von 38 % verzeichnet werden, gefolgt von Linie 7B-1 mit 22% und 3E-1 mit 6%. Zwar wurde der Vektor pIPKb005 mit dem Promotor TaGstA1 speziell für die Transformation von Gerste und Weizenpflanzen ausgelegt (Himmelbach et al., 2007), in dem verwandten Süßgras *B. distachyon* konnte aber unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors eine deutlich höhere Resistenzwirkung gegenüber *F. graminearum* 8-1 erzielt werden, wobei sich der Pilz entsprechend einer Typ II Resistenz nur im inokulierten Ährchen ausbreiten konnte (Blümke, 2013).

Nach den Analysen der transformierten Linien auf Genom- und Transkriptomebene und dem erfolgreichen Expressionsnachweis des künstlich eingebrachten Enzyms Callosesynthase AtGSL5, wurde das Syntheseprodukt Callose mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie detektiert. Als Material dienten Ethanol-entfärbte, mit *F. graminearum* 8-1 infizierte Weizenähren vier und sieben Tage nach erfolgter Inokulation.

Bei dem als vertikal beschriebenen Infektionsmechanismus erfolgt die Ausbreitung des Pilzes nach der initialen Infektion via Rachis und Rachilla, wobei die Pilzhyphe die Leitelemente im Zentrum der Rachis kolonisieren (Brown et al., 2011), (Ribichich et al., 2000). Eggert et al. (2014) beschreiben die Bildung eines dreidimensionalen Netzwerks aus Cellulose und Callose, das der Zellwand Schutz gegen beispielsweise Hydrolyse bietet. Nach Chowdhury et al. (2014) sorgt die Ausbildung effektiver Papillen mit erhöhten Callose-, Cellulose- und Arabinoxylan-Anteilen für eine Ummantelung des fungalen Penetrationsschlauchs und eine Infektionsbegrenzung. Da besonders die Callosesynthase AtGSL05 in Zusammenhang mit der Bildung von Callose bei biotischem Stress steht (Chen und Kim, 2009), wurde der infizierte Bereich des Rachisknotens untersucht. Die Orientierung im Gewebe erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie, da die spezifische Detektion von Callose im Gewebe durch die Zugabe von Anilin-Blau ermöglicht wird, wodurch Callosemoleküle blau fluoreszieren (Brundrett et al., 1988). Für die fotografische Dokumentation wurden dreidimensionale Projektionen mit Z-Stapel-Aufnahmen generiert.

In *A. thaliana* konnten zwölf GLS-Gene identifiziert werden, die unterschiedliche Rollen in der Pflanze einnehmen können (Richmond und Somerville, 2000). Dadurch kann bei den beobachteten



Calloseablagerungen nicht spezifisch zwischen natürlich vorkommender Callose und den Syntheseprodukten der Callosesynthase AtGSL05 unterschieden werden. Das Vorkommen natürlicher Callose wurde im intakten Pflanzengewebe bei beispielsweise bei Siebporen und im Phloem in Assoziation mit Siebplatten beschrieben werden (Eschrich, 1995) (Currier, 1957). Dies konnte auch im Zuge dieser Untersuchung bei allen Linien bestätigt werden. . Generell war bei den untersuchten Proben kein deutlicher Unterschied zwischen den Callosemengen in Wildtyp bzw. transformierten Linien zu erkennen. Zur Messung, ob ein Anstieg der Gesamtcallosemenge im Gewebe bei Pflanzen mit einer Überexpression der Callosesynthase AtGSL05 vorliegt, müsste beispielsweise eine Gesamt-Quantifizierung der Callose im Gewebe durchgeführt werden. Eine dafür geeignete Methode ist beispielsweise die durch Zhou et. al. (2012) beschriebene Software „CalloseMeasurer, die unter anderem zur gezielten Detektion pathogen-induzierter Callosebildungen entwickelt wurde. Die gesuchten Calloseablagerungen konnten bereits bei einer Infektion von *B. distachyon* mit *F. graminearum* beobachtet werden (Blümke, 2013) und zeigen sich in Form pfpfenartiger Strukturen innerhalb der Zellen (Ellinger und Voigt, 2014). Bei Linie E04-B konnte diese Art der Calloseablagerung gefunden werden. In den Zellen der transgenen Linien wurden besonders häufig zahlreiche punktförmige Calloseablagerungen innerhalb der Zellen beobachtet werden, die noch keine Verstopfung des Gewebes bewirken, jedoch als dafür geeignete Ansatzpunkte fungieren könnten. Zusätzlich zu den Callosemolekülen besteht die Möglichkeit, dass im Zuge der Gewebeuntersuchung via CLSM der Enzymkomplex einer Callosesynthase erfolgreich detektiert wurde. Bei der Callosesynthase-Familie aus *Arabidopsis* wurden zumindest zehn Transmembrandomänen jeder Callosesynthase angenommen und für acht Callosesynthasen wurde eine Membran-nahe Lokalisation angenommen (Ellinger und Voigt, 2014). Das Enzym an sich konnte bislang jedoch nicht erfolgreich isoliert werden. Das detektierte Makromolekül zeigte eine deutliche Callose-spezifische Fluoreszenz und wurde im Bereich der Zellwand beobachtet.

#### AUSWIRKUNGEN DER ÜBEREXPRESSION DER CALLOSESYNTHASE ATGSL05 IN GERSTE- UND WEIZENPFLANZEN AUF EINE INFESTION MIT *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Die Ausbildung der Ährenfusariose, verursacht durch *F. graminearum*, ist ein globales Schadbild in Gerste- und Weizenpflanzen mit massiven ökonomischen Folgen (Goswami und Kistler, 2004). Die Infektion mit dem phytopathogenen Pilz verringert den Ertrag durch mangelnde Ausreifung gesunder Karyopsen (Aufhammer, 2003), (Jackowiak et al., 2005) bzw. verursacht eine Kontamination der Ernte mit diversen, gesundheitsschädlichen Pilzgiften, wie Desoxynivalenol (DON), Trichothecen, und Zearalenon (Goswami und Kistler, 2004) (Placinta et al., 1999). Obwohl Unterschiede bei der Infektion von Gerste und Weizen beobachtet wurden, konnten ähnliche Entwicklungs- als auch die Infektionsstrategien in Gerste und Weizen beobachtet werden (Boddu et al., 2006). Weiters zeigt sich

die initiale Infektion bei Gerste im Vergleich zu Weizen zeitlich verzögert und wird mit der oftmals beobachteten Typ II Resistenz in Gerste in Verbindung gebracht (Boddu et al., 2006). Dieser Resistenztypus kann durch punktuelle Inokulation der überprüft werden (Yan et al., 2011). Dazu wurden Ähren der beiden *Triticaceen* zum Zeitpunkt der Anthese mit asexuell gebildeten Verbreitungseinheiten, den Konidien, direkt zwischen Deck- und Vorspelze manuell inokuliert. Sowohl bei Gerste und Weizen äußerte sich eine Infektion des inokulierten Ährchens in Form von nekrotischen Verbräunungen der Spelzen und entsprachen dem Infektionsbild beschrieben bei Goswami und Kistler (2004).

Aufbauend auf den Beschreibungen einer Erhöhung des Resistenzlevels in Verbindung mit Callose (Bellincampi et al., 2014), (Chowdhury et al., 2014), (Ellinger et al., 2013), (Enrique et al., 2011), (Jacobs, 2003), (Malinovsky et al., 2014) wurde das Infektionsausmaß transgener Linien in Bezug auf den Wildtyp bei Gerste und Weizen bestimmt. Als besonderer Anhaltspunkt fungierten die Beobachtungen von Blümke (2013), bei der eine Toleranzerhöhung in *B. distachyon* bedingt durch die Überexpression der Callosesynthase AtGSL05 beschrieben werden konnte und eine Anwendung der Callose-induzierten Resistenz auch auf Süßgräser erweitert (Blümke, 2013). Im Zuge der vorliegenden Masterarbeit konnte trotz der deutlichen Überexpression der Callosesynthase AtGSL05 in Gerste bei den Linien 5A-1 und 7B-1 keine Erhöhung des Toleranzlevels gegenüber des Pathogens beobachtet werden. Meist verblieb die Infektion in den punktuell inokulierten Ährchen und breitete sich in der Ähre nicht aus. Dieses Erscheinungsbild spricht für eine Typ II Resistenz in Gerste, die auch bei Boddu et. al (2006) beschrieben wurde. Bei den untersuchten Gerstepflanzen werden die Unterschiede der relativen Infektionsstärken in den einzelnen Linien durch die unterschiedliche Anzahl an Ährchen pro Ähre verursacht. Bei der Betrachtung der inokulierten Ähren im Vergleich zur Wasserkontrolle manifestiert sich, dass eine Infektion der Ähre, wenn auch lediglich auf zwei Blüten beschränkt, einen Einfluss auf den Gesamtzustand der Ähre und in weiterer Folge auf die Ausbildung der Karyopsen zeigt. Die Wasserkontrolle beginnt zwei Wochen nach Anthesezeitpunkt mit der Ausbildung gleichmäßig geformter Körner in der gesamten Ähre. Bei infizierten Ähren unterbleibt im Bereich zwischen Inokulationspunkt und Ährenbasis in den meisten Fällen die Bildung von Kornansatz. Meist beschränkte sich die Kornbildung auf den oberen Bereich der Ähre und die Ährespitze, wodurch das Erscheinungsbild der infizierten Ähre von jenem einer gesunden Ähre deutlich divergiert. Eine Möglichkeit für die Ausbildung dieses Phänotyps könnte im Zusammenhang mit den gebildeten Pilzgiften stehen. Selbst im Falle einer Ausbreitungsverhinderung des Pilzes könnten produzierte Giftstoffe wie Desoxynivalenol, Trichothecen und Zearalenon sich im Gewebe verteilen. Diese wirken sich negativ auf die Proteinsynthese der Pflanze aus und könnten den Reifeprozess in der Ähre inhibieren (Boddu et al., 2006). So zeigten Blüten von Weizen ein Ausbleichen des Gewebes nach DON Applikation, ohne Kontakt zum eigentlichen Pilz gehabt zu haben (Berthiller et al., 2015).

Im Unterschied zu Gerste zeigten sich Weizenpflanzen während der durchgeführten Infektionsversuche erheblich anfälliger auf *F. graminearum*. Der optimale Zeitpunkt zur Auswertung der Infektionsstärke wurde auf sieben Tage nach Inokulation festgelegt, da nach dieser Zeitspanne deutlich zwischen gesundem und infiziertem Gewebe differenziert werden konnte. Die Ausbreitung des Pilzes verlief in Weizen ausgehend vom Inokulationspunkt sowohl in Richtung Ährenbasis, als auch Ährenspitze. Während infizierte Ährchen zur Gänze Verbräunungserscheinungen aufzeigten, blieben gesunde Teile der Ähre grün. Mit fortschreitender Zeit blihen jedoch vermutlich aufgrund der Verstopfung der Leitelemente und der Unterbrechung der Wasser- und Nährstoffzufuhr durch Myzel (Atanasoff, 1920), (Ribichich et al., 2000) auch die gesunden Teile infizierter Ähren aus. Im Unterschied zu infiziertem Gewebe verblieb dieses jedoch leicht grün. Da das Toxin Desoxynivalenol, ein Virulenzfaktor von *F. graminearum*, mitunter eine Ursache für die spezifischen Verbräunungserscheinungen des Gewebes darstellt (Berthiller et al., 2015), könnte dies ein Hinweis sein, dass der Pilz und dessen produzierten Mykotoxine in diese Bereiche der Ähre nicht weiter vorgedrungen waren.

Trotz der schwachen Expression der Callosesynthase AtGSL05 in Weizen konnte eine Verringerung der relativen Infektionsstärke in den transgenen Linien beobachtet werden. Der einfaktorielle ANOVA-Bericht mit einem Signifikanzniveau von  $p \geq 0,5$  und der anschließenden Vergleichsanalyse nach Bonferroni-Holm zeigte einen signifikanten Unterschied der Infektionsstärken zwischen der Linie E01-A und dem Wildtyp auf. Bei den übrigen Linien konnte im Zuge dieser Analyse kein signifikanter Unterschied beschrieben werden. Die graphische Darstellung der relativen Infektionsstärken lässt jedoch vermuten, dass die Überexpression der Callosesynthase AtGSL05 schwach positive Auswirkungen auf die pflanzliche Resistenz ausübt. Durch die Erzeugung hinsichtlich AtGSL05 homozygoter Linien und gegebenenfalls durch den Austausch des epidermal-Promotors TaGstA1 gegen den Promotor CaMV 35S wie in der Studie von Blümke (2013) könnte die Überexpression der Callosesynthase AtGSL05 möglicherweise zugunsten einer verbesserten Resistenzwirkung erhöht werden.

## AUSBLICK

Da im Zuge dieser Arbeit bereits eine Reduzierung der relative Infektionsstärke durch die Überexpression der Callosesynthase AtGSL05 unter Kontrolle des Epidermalpromotors TaGstA1 in Weizen beobachtet werden konnte, können diese Ergebnisse als Ausgangslage für weitere Resistenzforschungen gegenüber Phytopathogenen, insbesondere *Fusarium graminearum* angesehen werden. Ein wichtiger Punkt wäre diesbezüglich die Schaffung hinsichtlich AtGSL05 homozygoter Linien mit Hilfe der gezielten Selektion erfolgreich modifizierter Pflanzen. Weiters könnte die Abänderung der genetischen Modifikation durch einen Promotoraustausch die künstliche Expression der Callosesynthase AtGSL05 erhöhen und eine verstärkte Calloseablagerung im Zuge der pflanzlichen Pathogenabwehr induzieren.

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen wird der Infektionsverlauf mit einem weiteren Stamm von *F. graminearum*, PH-1, getestet, der eine geringere Pathogenität in Weizen aufzeigt. Dadurch könnten mögliche Unterschiede in der Infektionsstärke und dem resultierenden Phänotyp stärker hervorgehoben werden.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson, J. A. (2007). Marker-assisted selection for Fusarium Head Blight resistance in wheat. *International Journal of Food Microbiology*.
- Atanasoff, D. (1920). Fusarium-blight (scab) of wheat and other cereals. *Journal of Agricultural Research*.
- Aufhammer, W. (2003). *Rohstoff Getreide*. Stuttgart (Hohenheim): Eugen Ulmer GmbH Co.
- Australian Government (2008). The Biology of *Hordeum vulgare* L. (barley)
- Badr, A., Müller, K., Schäfer-Pregl, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H. H., ... Salamini, F. (2000). On the origin and domestication history of Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*.
- Bashline, L., Lei, L., Li, S., und Gu, Y. (2014). Cell wall, cytoskeleton, and cell expansion in higher plants. *Molecular Plant*.
- Bellincampi, D., Cervone, F., und Lionetti, V. (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*.
- Berthiller, F., Lemmens, M., Werner, U., Krska, R., Hauser, M., und Adam, G. (2015). Europe PMC Funders Group Short review : Metabolism of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone in plants. *Mycotoxin Research*.
- Blümke, A. (2013). Induktion der Resistenz gegenüber dem Weizenpathogen *Fusarium graminearum* durch gezielte Zellwandveränderungen in *Brachypodium distachyon*. *Dissertation*.
- Boddu, J., Cho, S., Kruger, W. M., und Muehlbauer, G. J. (2006). Transcriptome analysis of the barley-Fusarium *graminearum* interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Bohm, D. (1992). The Significance of the Mycotoxins Desoxynivalenol, Zerealenone and Ochratoxine A for agricultural domestic animals . *Archives of Animal Nutrition*.
- Börner, H. (2009). *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. Berlin Heidelberg: Springer
- Bottalico, A., und Perrone, G. (2002). Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*.
- Bresinsky, A., Körner, C., Kadereit, J.W., Neuhaus G., Sonnewald U. (2008). *Strasburger Lehrbuch der Botanik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Brown, N. A., Bass, C., Baldwin, T. K., Chen, H., Massot, F., Carion, P. W. C., ... Hammond-Kosack, K. E. (2011). Characterisation of the Fusarium *graminearum*-Wheat Floral Interaction. *Journal of Pathogens*.
- Brown, T. (2001). Southern Blotting and Related DNA Detection Techniques. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Brundrett, M. C., Enstone, D. E., und Peterson, C. A. (1988). A berberine-aniline blue fluorescent

- staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma*
- Buchanan, B.B. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Biologists.
- Carlá, F. (2012). Wheat. In *The Encyclopedia of Ancient History*. Wiley Online Library
- Chen, X.Y., und Kim, J.Y. (2009). Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling & Behavior*.
- Chowdhury, J., Henderson, M., Schweizer, P., Burton, R. A., Fincher, G. B., und Little, A. (2014). Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *New Phytologist*.
- Currier, H.B. (1957). Callose substance in Plant Cells. *American Journal of Botany*
- Dickson, A. D. (2016). Barley-Botany , Production , Harvesting , Processing , Utilization and Economics.
- Eggert, D., Naumann, M., Reimer, R., und Voigt, C. A. (2014). Nanoscale glucan polymer network causes pathogen resistance. *Scientific Reports*.
- Eschrich, W. (1995). Funktionelle Pflanzenanatomie. Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., ... Voigt, C. A. (2013). Elevated Early Callose Deposition Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew in Arabidopsis. *Plant Physiology*
- Ellinger, D., und Voigt, C. A. (2014). Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: What we have learned within the last decade. *Annals of Botany*.
- Enns, L. C., Kanaoka, M. M., Torii, K. U., Comai, L., Okada, K., und Cleland, R. E. (2005). Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. *Plant Molecular Biology*.
- Enrique, R., Siciliano, F., Favaro, M. A., Gerhardt, N., Roeschlin, R., Rigano, L., ... Marano, M. R. (2011). Novel demonstration of RNAi in citrus reveals importance of citrus callose synthase in defence against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Biotechnology Journal*.
- Franke, W., Lieberei, R., Reisdorff C. (1997). *Nutzpflanzenkunde*. Thieme.
- George, J., und Chirikjian, J. G. (1982). Sequence-specific endonuclease BamHI: relaxation of sequence recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Gianinetti, A. (2016). Barley: An Overview of a versatile cereal grain with many food and feed uses. In H. C. C. Wrigley, *Encyclopedia of food grains* (S. 147-152). Waltham: Elsevier.
- Gibeaut, D.M., und Carpita N.C. (1994). Biosynthesis of Cell Wall Polysaccharides. *The FASEB Journal*.
- Gibson, L. J. (2012). The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of The Royal Society Interface*.
- Golkari, S., Gilbert, J., Prashar, S., und Procnier, J. D. (2007). Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: Identification of organ-specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnology Journal*.
- Gonzalez, A., Jimenez, A., Vazquez, D., Davies, J. E., und Schindler, D. (1978). Studies on the mode of

- action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*
- Goswami, R. S., und Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*.
- Hanak, T. (2014). Charakterisierung von *Brachypodium distachyon* Linien mit einer Überexpression von Callose-Synthase-Genen. *Masterarbeit*.
- Himmelbach, Zierold, Hensel, Riechen, Douchkov, Schweizer, K. (2007). A Set of Modular Binary Vectors for Transformation. *Breakthrough Technologies*
- Hockett, E. A. (2000). Barley. In J. G. Karel Kulp, *Handbook of cereal science and technology*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Hong, Z., Delauney, A. J., & Verma, D. P. (2001). A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *The Plant Cell*.
- Jackowiak, H., Packa, D., Wiwart, M., & Perkowski, J. (2005). Scanning electron microscopy of *Fusarium* damaged kernels of spring wheat. *International Journal of Food Microbiology*.
- Jacobs, A. K. (2003). An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *The Plant Cell Online*.
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A., & Maier, F. J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Kumar, S., und Fladung, M. (2001). Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. *Planta*.
- Kohli, A., Twyman, R.M., Abranches, R., Wegel, E., Stoger, E., Christou, P. (2003). Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology*.
- Law, C., und Exley, C. (2011). New insight into silica deposition in horsetail (*Equisetum arvense*). *BMC Plant Biology*.
- Lionetti, V., und Métraux, J.-P. (2014). Plant cell wall in pathogenesis, parasitism and symbiosis. *Frontiers in Plant Science*.
- Malinovsky, F. G., Fangel, J. U., und Willats, W. G. T. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*.
- Martin, C.S., Bronstein, I. (1994). Imaging of chemiluminescent signals with cooled ccd camera systems. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*.
- McMullen, M. P., Bergstrom, G. C., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D. E., Shaner, G., und Van Sanford, D. A. (2012). A Unified Effort to Fight an Enemy of Wheat and Barley: *Fusarium* Head Blight. *Plant Disease*.
- Mellersh, D. G., und Heath, M. C. (2001). Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. *The Plant Cell*.
- Miedaner, T. (2010). *Grundlagen der Pflanzenzüchtung*. Frankfurt am Main: DLG-Verlags-GmbH.
- Miedaner, T. (2014). *Kulturpflanzen*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

- Moretti, A., Panzarini, G., Somma, S., Campagna, C., Ravaglia, S., Logrieco, A. F., und Solfrizzo, M. (2014). Systemic growth of *F. graminearum* in wheat plants and related accumulation of deoxynivalenol. *Toxins*.
- Mysore, K. S., und Ryu, C. M. (2004). Nonhost resistance: How much do we know? *Trends in Plant Science*.
- Nishimura, M. T., Stein, M., Hou, B.-H., Vogel, J. P., Edwards, H., und Somerville, S. C. (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science*.
- Osborne, L. E., und Stein, J. M. (2007). Epidemiology of Fusarium head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology*.
- Padilla, I. M. G., & Burgos, L. (2010). Aminoglycoside antibiotics: Structure, functions and effects on in vitro plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports*.
- Parre, E., und Geitmann, A. (2005). More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiology*.
- Peng, J. H., Sun, D., und Nevo, E. (2011). Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Molecular Breeding*.
- Placinta, C. M., D'Mello, J. P. F., und MacDonald, A. M. C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*
- Pourkheirandish, M., und Komatsuda, T. (2007). The importance of barley genetics and domestication in a global perspective. *Annals of Botany*.
- Prasad, R., Prasad, L.C., und Bornare, S.S. (2014). Barley (*Hordeum vulgare* L.) Crops (model species), its use as Food, Feed Medicines and Performed better when Climatic Conditions are Unfavourable. *Indian Journal of Crop Ecology*.
- Pryor R.J., und Wittwer C.T. (2006). Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods in Molecular Biology*
- Ribichich, K. F., Lopez, S. E., und Vegetti, A. C. (2000). Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. *Plant Disease*.
- Richmond, T.A. und Somerville C.R. (2000). The Cellulose Synthase Superfamily. *Plant Physiology*
- Shands, H.L. und Dickson, A.D. (1953). Barley-Botany, Production, Harvesting, Processing, Utilization and Economics. *Economic Botany*.
- Shewry, P. R. (2009). Darwin review: Wheat. *Journal of experimental Botany*.
- Taiz, L. und Zeiger, E. (2007). *Plant Physiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Underwood, W. (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*.
- Verma, D.P.S, und Hong Z. (2001) Plant Callose Synthase Complexes. *Plant Molecular Biology*.
- Voigt, C. A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science*.



- Voigt, C. A., und Somerville, S. C. (2009). Callose in Biotic Stress (Pathogenesis). *Chemistry, Biochemistry, and Biology of (1→3)-β-Glucans and Related Polysaccharides*.
- Xie, B., Deng, Y., Kanaoka, M. M., Okada, K., und Hong, Z. (2012). Expression of Arabidopsis callose synthase 5 results in callose accumulation and cell wall permeability alteration. *Plant Science*.
- Yan, W., Li, H. B., Cai, S. B., Ma, H. X., Rebetzke, G. J., und Liu, C. J. (2011). Effects of plant height on type I and type II resistance to fusarium head blight in wheat. *Plant Pathology*.
- Yang, F., Jacobsen, S., Jorgensen, H. J., Collinge, D. B., Svensson, B., und Finnie, C. (2013). Fusarium graminearum and its Interactions with Cereal Heads: Studies in the Proteomics Era. *Front Plant Sci*.
- Zhang, X., Fu, J., Hiromasa, Y., Pan, H., & Bai, G. (2013). Differentially expressed proteins associated with fusarium head blight resistance in wheat. *PLoS ONE*.
- Zhou J., Spallek T., Faulkner C., Robatzek S. (2012). Callose Measurer: A Novel Software Solution to measure Callose Deposition and Recognise Spreading Callose Patterns. *Plant Methods*.

#### Webseiten

- |   |                               |
|---|-------------------------------|
| <a href="http://www.apsnet.org">www.apsnet.org</a> .  | Abgerufen am 3. März 2016     |
| <a href="http://faostat3.fao.org">http://faostat3.fao.org</a>   | Abgerufen am 20. Februar 2016 |
| <a href="http://rebase.neb.com/rebase/enz/NheI.html">http://rebase.neb.com/rebase/enz/NheI.html</a>   | Abgerufen am 15. Oktober 2015 |
| <a href="http://www.bios.net/daisy/Antibiotic/g4/1136.html">http://www.bios.net/daisy/Antibiotic/g4/1136.html</a>   | Abgerufen am 27. Februar 2016 |
| <a href="http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&amp;-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf">http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&amp;-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf</a> | Abgerufen am 27. Februar 2016 |
| <a href="http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf">http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf</a>                                   | Abgerufen am 23 März 2016     |