

Quantitative Expressionsanalyse von resistenzassoziierten Kandidatengen im Pathosystem *Hordeum vulgare* – *Rhynchosporium secalis*

von Kerstin Hofmann

Im Zuge der Intensivierung des Getreidebaus hat auch die wirtschaftliche Bedeutung der Pilzkrankheiten in den letzten Jahrzehnten zugenommen. Eines der wichtigsten Pathogene der Gerste ist der perthotrophe Pilz *Rhynchosporium secalis*, Erreger der gleichnamigen Blattfleckenkrankheit.

Die Kontrolle dieses Pathogens mit Hilfe resistenter Sorten gestaltet sich als schwierig, da der Pilz auf Grund seiner großen pathogenen Variabilität in der Lage ist, monogenische Resistenzen schnell zu überwinden. Eine mögliche Lösung hierfür bietet die Nutzung quantitativer Resistenzen, welche anhand einer QTL-Analyse oder mittels Kandidatengen-Ansatz identifiziert werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, 13 Kandidatengene hinsichtlich ihrer Rolle im Pathosystem *Hordeum vulgare* - *Rhynchosporium secalis* zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe der quantitativen Real Time-PCR eine Expressionsanalyse durchgeführt, um die Kandidatengene auf eine differentielle Expression hinsichtlich der *Rhynchosporium*-Reaktionen der verwendeten Genotypen untersuchen zu können.

Die Expressionsanalyse wurde vergleichend anhand einer Infektionsvariante und einer Wasserkontrolle durchgeführt. Hierzu wurden jeweils fünf Einzelpflanzen je Genotyp und Infektionsvariante von drei DH-Linien der Kreuzung „Igri“ x „Triton“ sowie der beiden Elternlinien im Gewächshaus mit einer Sporenlösung des *R.secalis*-Isolates 271 bzw. mit Wasser inokuliert. 96 Stunden nach der Infektion wurden von allen Pflanzen Proben genommen und daraus Gesamt-RNA extrahiert. Aus den Einzelproben wurden je Genotyp und Infektionsvariante Mischproben mit einem Gesamt-RNA-Gehalt von 0,5 µg/µl hergestellt und cDNA synthetisiert. Diese cDNA wurde zur Expressionsanalyse mit Hilfe der quantitativen Real Time-PCR verwendet.

Vor der eigentlichen Expressionsanalyse war es zunächst notwendig, eine zuverlässige Normalisierungsstrategie zu identifizieren. Hierzu wurde die Expression von sechs oft verwendeten Referenzgenen untersucht. Normalisiert wurde dabei auf den Gesamt-RNA-

Gehalt. Dabei stellte sich heraus, dass alle sechs Referenzgene hinsichtlich der Rhynchosporium-Reaktion der Genotypen stark differentiell exprimiert sind. Eine Normalisierung auf eines oder den Mittelwert mehrerer Referenzgene wurde deswegen ausgeschlossen. Die Expressionsdaten der Kandidatengene wurden daher ebenfalls auf den Gesamt-RNA-Gehalt normalisiert.

Die untersuchten Kandidatengene sind der Literatur entnommen und wurden auf Grund der bisher dazu vorliegenden Arbeiten grob in drei Gruppen eingeteilt: Thaumatin-ähnliche Proteine (TLPs), anfälligkeitsassoziierte Kandidatengene und resistenzassoziierte Kandidatengene. Die Thaumatin-ähnlichen Proteine (TLPs) wurden bereits in verschiedenen Pathosystemen als resistenzassoziiert und pathogeninduziert beschrieben, so auch in der Interaktion Gerste - *R. secalis* (Zareie et al. 2002). Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten vier TLPs konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Eine Resistenzbeteiligung der TLPs kann hier allerdings nicht generell ausgeschlossen werden, da TLPs Isolat-spezifisch reagieren und in dieser Arbeit nur ein *R. secalis*-Isolat verwendet wurde.

Zu den anfälligkeitsassoziierten Kandidatengenen gehört zum einen der Bax Inhibitor-1 (BI-1, Hückelhoven et al. 2003) und zum anderen Gene aus der Gruppe der Rac/Rop-Proteine (Schultheiss et al. 2003). Alle diese Gene wurden in der Interaktion Gerste - *Blumeria graminis* beschrieben und dort mit erhöhter Anfälligkeit in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Arbeit dagegen konnte bis auf Rac1 für alle Gene dieser Gruppe eine resistenzassoziierte differenzielle Expression festgestellt werden. Dies war zu erwarten, da es sich bei dem Mehltreupilz *B. graminis* anders als bei *R. secalis* um ein biotrophes Pathogen handelt.

Die resistenzassoziierten Gene wurden von Steiner-Lange et al. (2003) in mit *R. secalis* infizierten Gerstenblättern identifiziert und zeigten in einer Zeitreihe ein resistenzassoziiertes Expressionsmuster. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit trotz Verwendung unterschiedlicher Gerstensorten und Pilzisolate bestätigt werden, so dass von den drei Kandidatengenen eine isolatunspezifische Resistenzwirkung angenommen werden kann.