

# Quantitative Expressionsanalyse von resistenzassoziierten Kandidatengenen 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 perithrophe Pilz *Rhynchosporium secalis*, Erreger der gleichnamigen Blattfleckenkrankheit (Abb.1).

Die Kontrolle dieses Pathogens mit Hilfe resistenter Sorten gestaltet sich 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*-Resistenzreaktionen der verwendeten Genotypen untersuchen zu können.

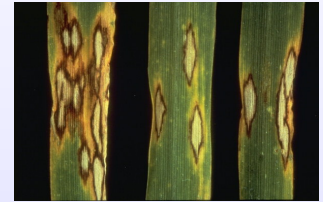


Abb.1: Charakteristische Symptome der *Rhynchosporium secalis*-Blattfleckenkrankheit

## Material & Methoden:

Die Expressionsanalyse wurde vergleichend anhand einer Infektionsvariante und einer Wasserkontrolle durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 5 Einzelpflanzen von 3 DH-Linien der Kreuzung „Igr1“ x „Triton“ sowie der beiden Eltern 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 RNA-Gehalt von 0,5 µg/µl hergestellt und cDNA synthetisiert. Mit dieser cDNA wurde über quantitative Real Time-PCR (Abb.2) die Expression von 6 Referenzgenen sowie 13 Kandidatengenen untersucht.

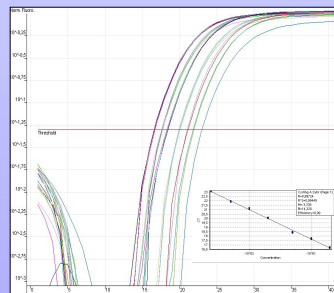


Abb.2: Applikationsplot und zugehörige Standardkurve einer Real Time-PCR

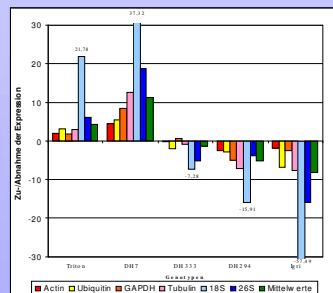


Abb.3: Expressionsveränderung der Referenzgene normalisiert auf den Gesamt-RNA-Gehalt

## Normalisierungsstrategie:

Zunächst wurde die Expression der Referenzgene (Abb.3) normalisiert auf den Gesamt-RNA-Gehalt untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass alle 6 Referenzgene hinsichtlich der *Rhynchosporium*-Reaktion der Genotypen differentiell exprimiert sind und daher für die Normalisierung der Kandidatengene nicht in Frage kommen. Die Expressionsdaten der Kandidatengene wurden daher ebenfalls auf den Gesamt-RNA-Gehalt normalisiert.

## Resistenzbeteiligung der Kandidatengene:

Die Thaumatin-ähnlichen Proteine (TLPs, Abb.4) wurden bereits in verschiedenen Pathosystemen als resistenzassoziiert und pathogeninduziert beschrieben, auch in der Interaktion Gerste - *R. secalis* (Zareie et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte das jedoch nicht bestätigt werden. Lediglich für TLP1 wurde eine signifikante Expressionsabnahme in den anfälligen Linien Igr1 und DH294 ermittelt.

## LITERATUR:

HÜCKELHOVEN R, Dechert C, Kogel KH (2003) PNAS 100(9):5555-5560. SCHULTHEISS H, Dechert C, Kogel KH, Hückelhoven R (2003) Plant J 36:589-601. STEINER-LANGE S, Fischer A, Boettcher A, Rouhara I, Liedgens H, Schmetzer E, Knogge W (2003) Mol Plant-Microbe Interact 16:893-902. ZAREIE R, Melanson DL, Murphy PJ (2002) Mol Plant-Microbe Interact 15:1031-1039

Eine Resistenzbeteiligung der TLPs kann hier allerdings nicht generell ausgeschlossen werden, da TLPs isolatspezifisch reagieren und in dieser Arbeit nur ein *R. secalis*-Isolat verwendet wurde.

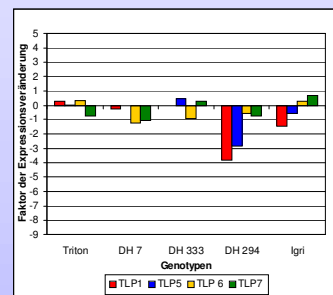


Abb.4: Expressionsveränderung der Thaumatin-ähnlichen Proteine normalisiert auf den Gesamt-RNA-Gehalt

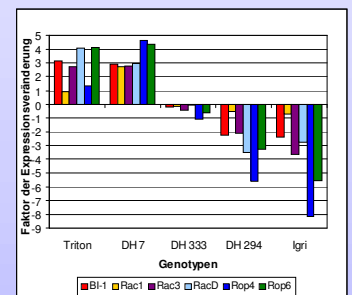


Abb.5: Expressionsveränderung der anfälligkeitsassoziierten Kandidatengene normalisiert auf den Gesamt-RNA-Gehalt

Zu den anfälligkeitsassoziierten Kandidatengenen (Abb.5) 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 alle 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 differentielle Expression festgestellt werden. Dies war zu erwarten, da es sich bei dem MehltauPilz *B. graminis* anders als bei *R. secalis* um ein biotrophes Pathogen handelt.

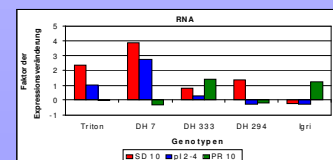


Abb.6: Expressionsveränderung der resistenzassoziierten Kandidatengene normalisiert auf den Gesamt-RNA-Gehalt

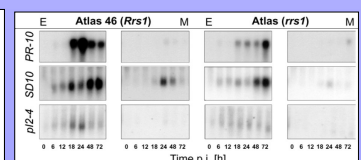


Abb.7: RNA-Akkumulation in der Epidermis (E) und im Mesophyll (M) von resistenten (Atlas 46) und anfälligen (Atlas) Gerstenpflanzen nach Infektion mit *R. secalis* (nach STEINER-LANGE et al. 2003).

Die resistenzassoziierten Gene (Abb.6) wurden von Steiner-Lange et al. (2003) in mit *R.secalis* infizierten Gerstenblättern identifiziert und zeigten in einer Zeitreihe ein resistenzassoziiertes Expressionsmuster (Abb.7). Diese Ergebnisse konnten in der dargestellten Arbeit trotz Verwendung unterschiedlicher Gerstensorten und Pilzisolates bestätigt werden, so dass von den drei Kandidatengenen eine isolatunspezifische Resistenzbeteiligung angenommen werden kann.