

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung

Identifizierung und Kartierung differentiell exprimierter Gene
nach *F. graminearum* Inokulation in Winterweizen

Manuela Diethelm

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof Dr. G. Wenzel
2. Univ.-Prof Dr. R. Hüchelhoven

Die Dissertation wurde am 22.09.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.10.2010 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Bedeutung und Evolution des Weizens.....	1
1.2.	Aufbau der Weizenblüte	1
1.3.	Die partielle Taubährigkeit bei Weizen	2
1.4.	Expressionsanalysen	12
1.5.	Zielsetzung dieser Arbeit	18
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Pflanzenmaterial.....	19
2.2.	Inokulation	21
2.3.	Charakterisierung der Resistenz.....	23
2.4.	Molekularbiologische Arbeiten.....	24
2.4.1.	DNA-Extraktion	24
2.4.2.	RNA-Extraktion	24
2.4.3.	cDNA-AFLP	24
2.4.4.	Quantitative Real-time PCR.....	27
2.4.5.	Markerentwicklung	29
2.5.	Statistische Analysen	37
2.6.	Kartierung der Genfragmente und QTL-Analyse	37
3.	Ergebnisse	39
3.1.	Inokulation und Resistenztest	39
3.2.	Expressionsanalyse	42
3.2.1.	cDNA-AFLP-Analyse.....	42
3.2.2.	Ergebnisse der BLAST-Analysen	44
3.3.	Rückkartierung der differentiell exprimierten TDFs in bestehende QTL-Karten	50
3.4.	Ergebnisse der Real-time PCR.....	63
4.	Diskussion	73
4.1.	Versuche zur Typ 2-Resistenz	73
4.2.	Die Expressionsanalyse mit der cDNA-AFLP-Technik	74
4.3.	Differentiell exprimierte Gene des Weizens nach <i>F. graminearum</i> -Inokulation.....	77
4.3.1.	Basale Pathogenabwehr an der Zellwand oder im Apoplasten.....	78
4.3.2.	Signaltransduktion.....	85
4.3.3.	Chemische Abwehr	88

4.3.4. TDFs mit unbekannter Funktion	91
4.4. Ausblick	92
5. Zusammenfassung.....	97
6. Summary	99
7. Literaturverzeichnis.....	100
8. Anhang	114
8.1. Chemikalienverzeichnis	114
8.2. Basislösungen.....	115
8.3. Abkürzungen	118
8.4. Liste der TDF-Sequenzen	120
8.5. Alignment der WIR1 Sequenzen	130

1. Einleitung

1.1. Bedeutung und Evolution des Weizens

Der Weizen ist eine der frühesten ackerbaulich genutzten Kulturen. Die Domestikation von diploiden Wildweizen begann vor ca. 11.000 Jahren im fruchtbaren Halbmond, auf dem Gebiet des heutigen Irak und der südöstlichen Türkei (Salamini et al. 2002). Weizen zählt heute neben Reis (*Oryza sativa*) und Mais (*Zea mays*) zu den weltweit bedeutendsten Fruchtarten. In Deutschland betrug die Anbaufläche von Winterweizen im Jahr 2009 3,2 Mio. ha. Der Winterweizen ist in Deutschland damit die meistangebaute Frucht (www.destatis.de).

Weizen besitzt mit 16.000 Mb (Megabasen) ein sehr großes, komplexes Genom (Reis: 450 Mb, Gerste: 5000 Mb). Das Genom des hexaploiden Kulturweizens (*Triticum aestivum*) (AABBDD, $2n = 6x = 42$ Chromosomen) setzt sich aus den homöologen Genomen von drei unterschiedlichen Wildweizenformen zusammen. Er entstand vor ca. 7.000 Jahren aus der spontanen Hybridisierung des tetraploiden wilden Emmers (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, AABB) mit *Aegilops tauschii*, dem Donor des D-Genoms. Der wilde Emmer wiederum entstand aus einer Kreuzung von *Triticum uratu* (A-Genom) und *Aegilops speltoides* (B-Genom) (Petersen et al. 2006).

1.2. Aufbau der Weizenblüte

Die Ähre des Weizens ist aus Ährchen aufgebaut, die mit der Rachis durch die Rachilla verbunden sind. Innerhalb der Rachis verlaufen die vaskulären Bündel, durch welche die Blüten mit Wasser und Nährstoffen versorgt werden. Die Ährchen liegen versetzt zueinander auf zwei Seiten der Rachis (Abb. 1a). Jedes Ährchen (Abb. 1b) besteht aus vier fertilen Blüten und einer infertilen Blüte, die von zwei Glumae umgeben sind. Das Ovar mit seinen zwei fedrigen Stigmen ist vom Lemma, der Palea und 2 Lolliculae umgeben. Die Lolliculae schwellen während der Anthese an und öffnen so die Blüte, wodurch die Antheren aus der Blüte ausgeworfen werden können.

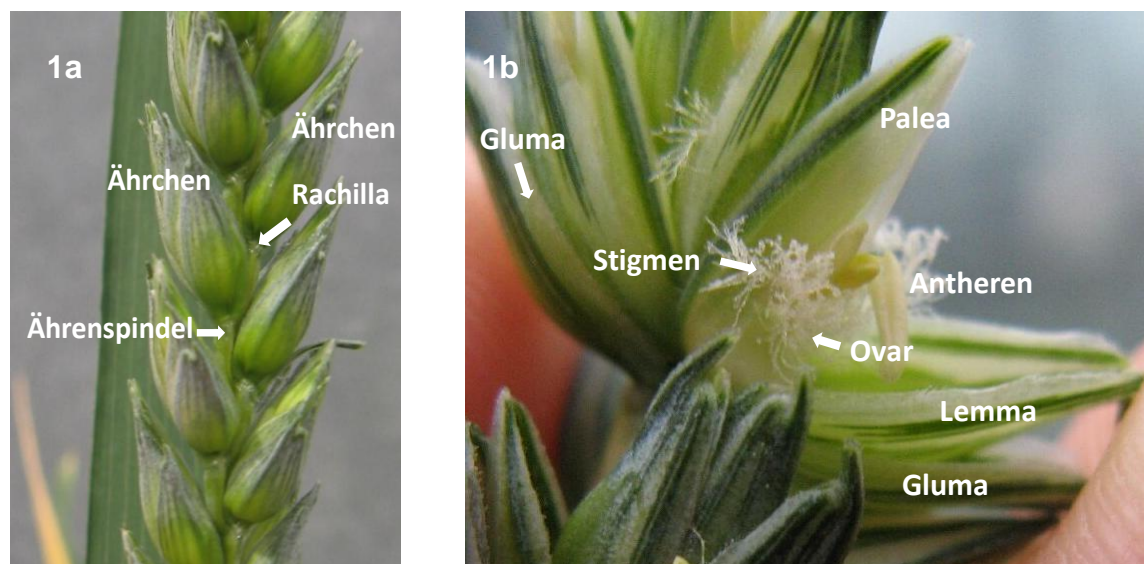


Abb. 1a: Seitenansicht einer Weizenähre

Abb. 1b: Blick in eine geöffnete Weizenähre kurz vor der Anthese

1.3. Die partielle Taubährigkeit bei Weizen

Die Symptome der partiellen Taubährigkeit bei Getreide sind das Ausbleichen von zuerst einzelnen Ährchen und schließlich der ganzen Ähre. Bei fortschreitender Krankheit und feuchter Witterung wächst auf den Spelzen befallener Ähren ein rosa-orangefarbener Mycelbelag. Infizierte Körner sind schlechter gefüllt (Kümmerkörner) und daher kleiner und kantiger und zudem häufig von weiß-rosafarbenem Myzel umgeben.

Die partielle Taubährigkeit bei Getreide, insbesondere bei Weizen und Gerste, wird von verschiedenen *Fusarium*-Spezies, die zur Gruppe der Ascomyceten gehören, ausgelöst. *Fusarium culmorum* und *Fusarium graminearum* (Hauptfruchtform: *Gibberella zaeae*) sind dabei die häufigsten und virulentesten Pathogene bei Weizen (Parry et al. 1995).

Die Erreger der Ährenfusariosen haben einen weiten Wirtskreis und können im Boden auf befallenen Ernterückständen als Myzel überwintern. Dabei spielen Maisstoppeln eine besonders große Rolle, da der Mais ebenfalls ein Wirt verschiedener *Fusarium*-Spezies ist und zudem häufig vor Weizen in der Fruchtfolge steht (Parry et al. 1995, Pommer 1998). Auf den Ernterückständen bilden sich Perithezien, aus denen Ascosporen austreten. Diese werden durch Regenspritzer auf die Ähren transportiert und können dort auskeimen. Am anfälligsten sind die Weizenähren zur Anthese, da zu diesem Zeitpunkt Ascosporen in die geöffnete Blüte gelangen oder entlang der Antherenschläuche in die Blüte wachsen können. Da die Pilze zur Infektion

einen Feuchtigkeitsfilm auf den Ähren und warme Temperaturen von über 15°C (optimal: 25°C) benötigen, kommt es in den Jahren, in denen feuchte, warme Witterung zur Getreideblüte auftritt, häufig zu Epidemien (Parry et al. 1995).

Neben den Ernteausfällen durch die Taubährigkeit bringt vor allem die Produktion von Mycotoxinen durch die Erreger der Ährenfusariosen große Probleme mit sich, da die Mycotoxine durch das Korn in die Nahrung von Tier und Mensch gelangen. *F. graminearum* und *F. culmorum* bilden die Trichotecene Deoxynivalenol (DON) und dessen acetylierte Derivate sowie Nivalenol (NIV), T2-Toxin und das nicht steroidale Mycooestrogen Zearalenon (ZON). Dabei treten verschiedene Chemotypen der Pilze auf, die entweder mehr DON oder NIV produzieren. Trichotecene sind Epoxide von Sesquiterpenen, die von verschiedenen Fusarium-Spezies gebildet werden können. Sie inhibieren in unterschiedlichem Maße die Proteinbiosynthese und führen in Pflanzen sowie in Tieren zur Apoptose (Rocha et al. 2005). Für den Weizen besitzt dabei DON die höchste Toxizität, für tierische Zellen ist T2-Toxin das potenteste Gift (Rocha et al. 2005).

Vor allem Monogaster, wie z.B. Schweine, reagieren sensibel auf die Belastung des Futters mit Fusarium-Toxinen. Hier führen hohe DON-Belastungen zu verminderter Futteraufnahme und gelegentlichem Erbrechen, weswegen DON auch als Vomitoxin bezeichnet wird. Zudem führt eine hohe DON-Aufnahme zu Beeinträchtigungen des Immunsystems, da das Mycotoxin mit den Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen des Immunsystems interagiert (Tiemann und Dänicke, 2007). In Weizenähren ist DON für Fusariumpilze ein wichtiger Virulenzfaktor für die Fähigkeit, sich durch die Rachis innerhalb der Ähre auszubreiten. Es wird angenommen, dass DON die Pflanze durch Hemmung der Proteinbiosynthese an einer adäquaten Abwehrreaktion hindert. Pilze mit gestörter DON-Synthese sind zwar fähig in das Wirtsgewebe einzudringen, jedoch bildet sich am Rachisnodium eine dicke Barriere aus Zellwandmaterial, die den Pilz an der Besiedelung der Rachis hindert (Jansen et al. 2005). Bei DON-produzierenden Pilzen läuft eine ähnliche Abwehrreaktion nur in hochresistenten Genotypen ab, während anfällige Sorten kaum Verdickungen aufweisen (Kang und Buchenauer 2003).

Die Induktion der Apoptose durch DON sollte die Bereitstellung von Nahrung für den nekrotrophen (oder hemibiotrophen) Pilz vereinfachen und die Besiedelung des Wirtsgewebes erleichtern. Die Produktion von Mycotoxinen zur Abtötung von Wirtszellen ist typisch für Pathogene mit nekrotrophem Lebensstil (Glazebrook 2005). Bisher klonierte Resistenzgene, die eine Resistenz gegenüber nekrotrophen Pilzen vermitteln, codieren für Proteine, die an der

Entgiftung dieser Mycotoxine beteiligt sind (Johal. et al. 2002, Brandwagt et al. 2002, Sindhou et al. 2008). In Weizen konnte DON-3-Glycosid als so genanntes maskiertes DON nachgewiesen werden (Berthiller et al. 2005). Aus *A. thaliana* wurde eine UDP-Glycosyltransferase isoliert, die in der Lage ist, DON zu glycosylieren (Poppenberger et al. 2003). Das bei dieser Reaktion entstehende DON-3-Glycosid ist nicht mehr toxisch und wird vermutlich in der Vakuole gelagert. Die Gefahr besteht jedoch, dass der Glucose-Rest durch Enzyme während der Verdauung oder der Fermentation der Weizenkörner freigesetzt und somit die Toxizität von DON wieder hergestellt werden könnte (Berthiller et al. 2009). Für das Merkmal der DON-Toleranz wurden mehrere QTL-Kartierungen durchgeführt (Bürstmayr et al. 2009). Ein QTL für die Entgiftung von DON colokalisiert mit einem Haupt-QTL für Resistenz gegen FHB, was eine bedeutende Rolle der DON-Entgiftung innerhalb der Pathogenabwehr der untersuchten resistenten Genotypen nahe legt (Lemmens et a. 2005).

Für Zearalenon (ZON) ist bis jetzt noch keine virulenzfördernde Wirkung im Weizen nachgewiesen worden. Dieses Mycotoxin führt jedoch bei der Kontamination von Schweinefutter zu großen Problemen, da es 17 β -Oestradiol stark genug ähnelt, um an die entsprechenden Östrogenrezeptoren zu binden. Bei der Verfütterung von stark mit ZON belastetem Futter (50-100 ng ZON/kg) an Sauen kann es zu Ödemen der Vulva sowie zu Störungen beim Eisprung, der Befruchtung und der Einnistung und Entwicklung der Föten kommen. Auch geringere Mengen wirken sich bereits negativ auf die Fruchtbarkeit der Sauen und die Lebensfähigkeit der Ferkel aus (Tiemann und Dänicke 2007). Wegen der starken Beeinträchtigungen auf die Tiere - und letztendlich auch auf den Menschen - wurden von der Europäischen Union Höchstmengen für Futter und Nahrungsmittel festgesetzt.

Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte der Infektionsverlauf bei resistenten und anfälligen Weizensorten, die mit *F. graminearum* (Pritsch et al. 2000), *F. culmorum* (Kang und Buchenauer 1999, 2000a, 2000b, 2000c, 2002, 2003) und *F. avenaceum* (Kang et al. 2005) infiziert wurden, gezeigt werden. Diese drei Verursacher der partiellen Taubährigkeit infizieren das Wirtsgewebe in sehr ähnlicher Weise (Kang et al. 2005). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Abwehrmechanismen der Weizensorten gegen diese Fusarien ebenfalls vergleichbar sind. Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen zusammengefasst und durch Ergebnisse aus Expressionsanalysen ergänzt, woraus auf den Ablauf der Infektion geschlossen werden kann.

6 bis 12 Stunden nach der Inokulation keimen die Makrokonidien von *F. graminearum* und *F. culmorum* auf den Oberflächen aller untersuchten Blütengewebe. Dabei konnten keine

Unterschiede zwischen den anfälligen und den resistenten Weizensorten festgestellt werden (Kang und Buchenauer 1999, Pritsch et al. 2000). Zu diesen Zeitpunkten steigt die Transkription von ROS (Reactive Oxygen Species) produzierenden Genen, wie Peroxidasen (Pritsch et al. 2000), sowie von ROS entgiftenden Enzymen, wie Ascorbat Peroxidasen, Superoxid-Dismutasen, Glutathion S-Transferasen (Zhou et al. 2005, 2006) in anfälligen und resistenten Weizensorten stark an. Die Hochregulierung dieser Gene deutet auf den Ablauf eines „oxidativen Burst“ und daraus resultierenden oxidativen Stress, kurz nach der Keimung der Makrokonidien, hin (Pritsch et al. 2000, Zhou et al. 2006). Auch wird die Produktion von PR-Proteinen in anfälligen und resistenten Sorten ab 6 Stunden nach der Inokulation gesteigert (Pritsch et al. 2000, Hill-Ambroz et al. 2006, Bernardo et al. 2006).

Die Hyphen von *F. graminearum* und *F. culmorum* wachsen zunächst unverzweigt auf der Oberfläche des Blütengewebes und später zunehmend auch unterhalb der Cutikula (Pritsch et al. 2000, Kang und Buchenauer 1999). Ca. 36 Stunden nach der Inokulation bilden sich verdickte Infektionshyphen und der Pilz dringt mit Hilfe von Apressorien durch die Epidermiszellen in die Gewebe der Caryopse und des Lemmas ein. Da gezeigt werden konnte, dass Wirtszellen in der Nähe der Infektionshyphen häufig eine verringerte Dichte von Zellulose, Xylan und Pektin aufweisen, wird davon ausgegangen, dass der Pilz entsprechende zellwandabbauende Enzyme ausscheidet (Kang und Buchenauer 1999, 2000b). Auch wurde zu diesem Zeitpunkt erstmals das Toxin Deoxynivalenol in den Hyphen des Pilzes sowie in Epidermis und Parenchymzellen des Blütengewebes nachgewiesen (Kang und Buchenauer 1999). Bei einer Inokulation der Außenseiten der Glumae findet die Penetration der Zellen erst zwei bis drei Tage nach der Infektion statt. Die Zellen der Glumae besitzen sehr dicke Zellwände mit Siliziumeinlagerungen, was eine mechanische Penetration stark erschwert. Im Gegensatz zu den Geweben der Blüteninnenseite dringt dort der Pilz hauptsächlich über Stomata ein (Pritsch et al. 2000). Anfällige und resistente Sorten unterschiedlicher Herkünfte unterscheiden sich nicht hinsichtlich des Zeitpunktes, zu dem eine erste Penetration auftritt (Kang und Buchenauer 1999, Pritsch et al. 2000).

Zwei bis drei Tage nach der Inokulation zeigen Zellen einer anfälligen Weizensorte, z.B. Agent, bereits starke Veränderungen. Das Plasmalemma erscheint zusammengezogen, so dass eine Lücke zwischen Plasmalemma und Zellwand entsteht, in der sich Zellwandmaterial und kleine Vesikel ansammeln. Die Chloroplasten sind geschwollen und weniger dicht gepackt, der Tonoplast ist häufig dunkel gefärbt und in der Vakuole zeigen sich membranähnliche Strukturen. Zwischen den Zellen wachsen zahlreiche Pilzhhyphen (Kang und Buchenauer

2000c). Im Gegensatz dazu bilden sich im gleichen Zeitraum in Sorten mit partieller Resistenz gegenüber *F. graminearum* und *F. culmorum*, z.B. Arina und Frontana, zahlreiche Zellwandverdickungen und Papillen. Die Lignifizierung sowie die Konzentration von Callose sind in den Zellwänden der resistenten Sorten erhöht. Besonders in Zellen nahe den Hyphen wird vermehrt neues Zellwandmaterial gebildet. Einige Zellen des Lemmas kollabieren zwei bis drei Tage nach der Inokulation vollständig und ihre Nachbarzellen zeigen besonders starke Zellwandverdickungen (Kang und Buchenauer 2000c). Zudem nimmt in Zellwänden von resistenten Sorten die Menge hydroxyprolinreicher Glycoproteine und Thionine zu. Hydroxyprolinreiche Zellwandproteine verstärken die Zellwände und den Thioninen konnte eine direkte antifungale Wirkung nachgewiesen werden (Bohlmann 1988). In den Zellwänden einer resistenten Sorte (Arina) wurde drei Tage nach der Inokulation eine Zunahme der Konzentration von β -1,3 Glucanasen und Chitinasen beobachtet. Diese Enzyme schädigen die glucan- und chitinhaltigen Zellwände von Pilzen und konnten auch in den Zellwänden von Fusariumhyphen, die Gewebe von Arina befallen hatten, nachgewiesen werden. In Zellwänden der anfälligen Sorte wurde nur eine leichte Zunahme an Glucanasen und Chitinasen beobachtet (Kang und Buchenauer 2003). Das Toxin Deoxynivalenol befindet sich vor allem im Endoplasmatischen Retikulum und an den Ribosomen von Zellen infizierter Spelzen. Geringere Konzentrationen konnten jedoch auch in Zellwänden, Plasmalemma, Chloroplasten sowie der Vakuole nachgewiesen werden (Kang und Buchenauer 1999, 2000c). Die DON-Konzentrationen ist drei Tage nach der Inokulation in den resistenten Sorten signifikant geringer als in einer anfälligen Sorte (Kang und Buchenauer 2000c). In letzter erreichen die Pilzhyphen die Rachilla drei Tage nach Inokulation und die Rachis nach vier bis fünf Tagen. Infizierte Zellen im Lemma und in der Caryopse kollabieren vier Tage nach der Inokulation. DON lässt sich zu diesen Zeitpunkten bereits in den inneren Geweben des Ovars nachweisen, wohingegen in den resistenten Genotypen mehr Zellen intakt bleiben. Die Besiedelung der Rachis ist in der anfälligen Sorte wesentlich stärker als in den beiden resistenten Weizensorten (Arina und Frontana), in denen die Rachilla erst nach fünf bis sechs und die Rachis nach acht bis zehn Tagen besiedelt wird. In der Rachis breiten sich die Pilzhyphen inter- und intrazellulär aus (Kang u Buchenauer 2000c). DON wird in den Leitbündeln der Ähre sowohl nach oben als auch nach unten transportiert und wurde in den Zellwänden der Leitbündel sowie über den Poren der Siebröhren nachgewiesen (Kang und Buchenauer 1999, 2000c). Die resistenten Sorten zeigen mit der Bildung von Zellwandappositionen und dem Absterben einzelner Zellen in der Rachis ähnliche Abwehrmechanismen wie im Lemma (Kang und Buchenauer 2000c). Auch dort wurde in resistenten Weizen eine erhöhte Konzentration von hydroxyprolinreichen

Glycoproteinen und Thioninen sowie β -1,3 Glucanase und Chitinase nachgewiesen (Kang und Buchenauer 2003).

Insgesamt zeigen die untersuchten anfälligen und resistenten Sorten ähnliche Abwehrmechanismen, wobei die untersuchten resistenten Sorten weitaus besser in der Lage sind diese auszubilden. Diese Veränderungen beruhen größtenteils auf der Errichtung mechanischer Barrieren durch Zellwandverstärkungen und der Ausscheidung antifungaler Substanzen, was zu einer Verlangsamung und Abschwächung des ganzen Infektionsverlaufs führt.

Zeit nach der Inokulation (in Stunden)

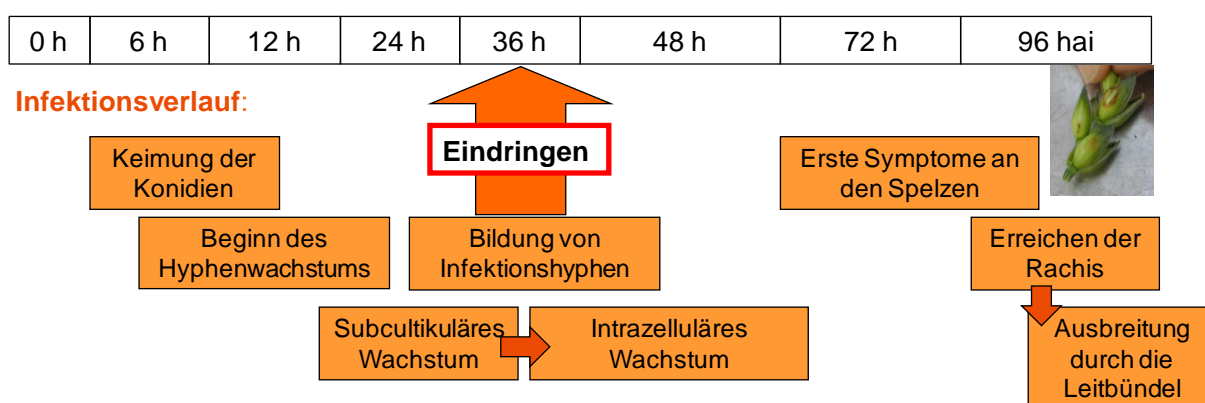


Abb. 2: Zeitlicher Ablauf der Infektion von *F. culmorum* in Blütengewebe der anfälligen Weizensorte Agent nach einer Einzelblüteninokulation, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Kang und Buchenauer 1999, 2000a, b, c).

Da *F. graminearum* und *F. culmorum* saprophytisch auf abgestorbenem Pflanzenmaterial überwintern, stellt das Unterpflügen von Ernterückständen einen wirksamen Schutz vor starkem Befall mit diesen Pilzen dar. In manchen Gegenden muss jedoch wegen des Bodenschutzes oder aus Kostengründen auf das Pflügen verzichtet werden. Die Behandlung des Bodens mit antagonistisch wirkenden Mikroorganismen, wie den Pilzen *Microsphaeropsis sp.* und *Trichoderma sp.*, zeigt vielversprechende Anfangserfolge, jedoch ist die Anwendung noch nicht praxisreif (Bujold und Paulitz 2001, Gilbert und Fernando 2004, Yuen und Schoneweiss 2007). Leider schützt die Verminderung von Inokulum im Boden nicht vor der Infektion mit windbürtigen Ascosporen, weswegen weitere Maßnahmen zum Schutz vor Ährenfusariosen notwendig sind.

Für die Behandlung der Pflanzen mit Fungiziden (z.B. Tebuconazol) besteht nur ein kurzes Zeitfenster während der Blüte. Kommt die Fungizidapplikation zu spät, führt sie nicht mehr zur Verminderung des Mycotoxingehaltes beim Korn (Yuen und Schoneweiss 2007, Paul et al. 2007). Bei resistenten Weizensorten kann auf den chemischen Pflanzenschutz gegen Fusarien verzichtet werden. Die Kontrolle dieser Pilze ist somit beim Anbau resistenter Sorten einfacher, umweltschonender und auch kostengünstiger als bei anfälligen Sorten, die mit Pflanzenschutzmitteln gegen Ährenfusariosen behandelt werden müssen. Für die Teilnahme einer Sorte bei den Landessortenversuchen, deren Ergebnisse für die Sortenberatung der Landwirte herangezogen werden, ist eine Boniturnote von mindestens 5 hinsichtlich der Ährenfusarioseresistenz erwünscht. Die Entwicklung von Basiszuchtmaterial mit guter Resistenz gegenüber den Erregern dieser Krankheit ist daher sowohl ökologisch als auch ökonomisch sehr wichtig

Die Resistenz von Weizen gegenüber den Erregern der Ährenfusariose ist quantitativ, da keine vollständige Resistenz bekannt ist und sich verschiedene Weizengenotypen graduell hinsichtlich ihrer Anfälligkeit gegenüber *F. graminearum* und *F. culmorum* sowie in der Geschwindigkeit, in der sich der Pilz in der Ähre entwickeln kann, unterscheiden. Die Resistenz gegenüber Ährenfusariosen wird polygen oder zumindest oligogen durch meist additiv wirkende Resistenzgene vererbt (Snijders 1990). Bis heute konnten in Weizen keine rassespezifischen Resistenzen festgestellt werden. Auch sind Weizengenotypen, die resistent gegenüber *F. graminearum* sind, auch resistent gegenüber *F. culmorum*.

Schröder und Christensen (1963) unterscheiden zwei Haupttypen von Resistenz:

Typ 1: die Resistenz gegenüber der Erstinfektion

Typ 2: die Resistenz gegenüber der Ausbreitung des Pilzes innerhalb der Ähre

Später wurden weitere Resistenztypen unterschieden, wie die Resistenz gegenüber der Akkumulation von DON (Miller et al. 1985), die durch die Entgiftung des Toxins durch die Pflanze erklärt werden kann, sowie die Resistenz gegenüber der Infektion der Körner und die Toleranz, bei der trotz des Fusariumbefalls noch hohe Erträge erzielt werden können (Mesterhazy 1995). Wie bereits im Kapitel über die Mycotoxine beschrieben, hängt die Typ 2-Resistenz in manchen Genotypen vermutlich stark von der Fähigkeit zur DON-Entgiftung ab.

Bei der Evaluierung der Resistenz auf dem Feld, werden die Pflanzen meist zu Blühbeginn mit einer Makrokonidien suspension besprüht, oder es werden infizierte Maisstoppeln im Feld als Inokulumquelle ausgelegt. Dadurch kann die kombinierte Typ 1- und Typ 2-Resistenz durch

visuelles Abschätzen des prozentualen Befalls ermittelt werden. Zur Bestimmung der Typ 2-Resistenz eignet sich am besten die Methode der Einzelblüten-Inokulation, bei der die Makrokonidien suspension in einzelne Blüten getropft oder injiziert und anschließend die Ausbreitung der Symptome innerhalb der Ähre beobachtet wird (Dill-Mackey, 2003). Die Messung der Fusariumtoxine im Korn ist aufwendig und sehr kostspielig, so dass sie seltener bei der Bewertung der Resistenz von einer größeren Anzahl zu evaluierender Genotypen angewandt wird. Da zwischen dem sichtbaren Befall und der Menge an Mycotoxinen im Korn ein enger Zusammenhang besteht, kann daher in vielen Fällen auf DON-Analysen verzichtet werden (Miedaner et al. 2004, Paul 2006).

Die meisten hochresistenten Weizensorten stammen aus den feuchtwarmen Gebieten Asiens und Südamerikas, wo seit langem ein hoher Befallsdruck mit *F. graminearum* besteht und daher schon lange auf Ährenfusarioseresistenz selektiert wird. Der chinesische Zuchtstamm Sumai3 besitzt eine ausgezeichnete Typ 2-Resistenz und wird häufig in Zuchtprogrammen verwendet. In zahlreichen QTL-Kartierungsprogrammen wurden Haupt-QTL auf den Chromosomen 3BS, 5A und 6BS identifiziert. Die QTL auf Chromosom 3BS und 6BS wurden feinkartiert und die Resistenzgene mit *FHB1* und *FHB2* bezeichnet (Liu et al. 2006, Cluthbert et al. 2007). Für *FHB1*, der vor allem die Typ2-Resistenz verbessert, stehen diagnostische STS-Marker zur Anwendung in der „Marker Assisted Selektion“ (MAS) zur Verfügung (Liu et al. 2006). Weitere resistente asiatische Sommerweizensorten sind Wuhan, Chockwang und Wangshuibai. Durch eine besonders gute Typ 1-Resistenz fällt die brasilianische Sorte Frontana auf. Steiner et al. (2004) konnten QTL für die Resistenz von Fusarium auf den Chromosomen 3A und 5A identifizieren. Das Einkreuzen von exotischen Sorten ist zeitintensiv und damit teuer, da viele Rückkreuzungsschritte notwendig sind, um die Übertragung agronomisch ungünstiger Gene durch genetische Kopplung zu minimieren. Daher ist die Verwendung von adaptierten europäischen Winterweizensorten mit einer moderaten kombinierten Typ 1- und Typ 2-Resistenz als Resistenzdonoren sinnvoll in der Züchtung. In europäischen Sorten wurden zahlreiche QTL identifiziert, die eine Resistenz gegen Ährenfusariosen vermitteln (Gervais et al. 2003, Paillard et al. 2004, Schmolke et al. 2005, Semagn et al. 2007, Draeger et al. 2007, Haeberle et al. 2007, Klahr et al. 2007, Schmolke et al. 2008, Holzapfel et al. 2008, Haeberle et al. 2009, Bürstmayr et al. 2009).

Die Abwehr gegenüber Pathogenen wird in Pflanzen durch phytohormongesteuerte Signaltransduktionswege vermittelt, die untereinander in Kontakt stehen und sich gegenseitig an mehreren Punkten verstärken oder auch hemmen können. Eine besonders große Rolle in der

Pathogenabwehr konnte für die Salicylsäure (SA), die Jasmonate (JA) und Ethylen (ET) gezeigt werden. Eine Beteiligung von Auxin und Gibberellin wurde ebenfalls bestätigt (Navarro et al. 2008). Im Allgemeinen scheinen die Hypersensitive Reaktion (HR), die zu schnellem und gesteuertem Zelltod befallener Zellen führt, und die SA-vermittelte Systemic Acquired Resistance (SAR) einen wirksamen Schutz gegen biotrophe Pathogene zu bieten. Im Gegensatz dazu führen JA- und ET-Signaltransduktionswege zur wirksamen Abwehr von nekrotrophen Pathogenen und Insektenfraß (Glazebrook 2005). Von dieser Regel gibt es jedoch zahlreiche Ausnahmen.

Welcher Signaltransduktionsweg zur wirksamen Resistenz von Weizen gegenüber *F. graminearum* führt, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Eine Induktion von Genen, die am Ende der SA-, JA- und ET-abhängigen Wege liegen oder an der Signaltransduktion beteiligt sind, wurde für verschiedene resistente und auch anfällige Weizensorten nach der Infektion mit *F. graminearum* gezeigt (Pritsch et al. 2000, Zhou et al. 2006, Bernardo et al. 2006, Li und Yen, 2008). Bei *F. graminearum* handelt es sich um ein Pathogen mit nekrotrophem oder hemibiotrophen Lebensstil. Daher liegt die Vermutung nahe, dass JA- und auch ET-Signaltransduktion zu erhöhter Resistenz führen. Die Ergebnisse veröffentlichter Studien hierzu sind jedoch zum Teil widersprüchlich.

Li und Yen (2008) beobachteten im anfälligen Weizenzuchtstamm Y1193 eine deutliche Reduzierung der Symptome, wenn die Pflanzen vor der Inokulation mit *Fusarium* mit Methyljasmonat oder Ethaphon behandelt wurden. In hochresistenten asiatischen Sommerweizen konnte Induktion von Jasmonat- und Ethylen Signaltransduktions- und Biosynthese-Genen nach der Inokulation wiederholt gezeigt werden (Li und Yen 2008, Jia et al. 2009). Chen et al. (2009) gelang es jedoch durch RNA-interference (RNAi) in der anfälligen Sorte Bobwhite die Translation des Ethylen-Signaltransduktionsgen *EIN2* zu inhibieren. Transgene Linien ohne *EIN2*-Expression waren deutlich resistenter als nicht transformierte Kontrollpflanzen. Die Autoren schlossen daraus, dass *F. graminearum* in der Lage ist, die Ethylensignaltransduktion für eine schnellere Besiedelung des Wirtsgewebes zu nutzen, wahrscheinlich dadurch, dass es die Seneszenz durch Ethylen fördert. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Interaktion von *A. thaliana* mit *F. graminearum* und *F. oxysporum* gezeigt (Berrocal-Lobo und Molina 2008).

Eine Hochregulierung von SA-induzierten Proteinen wie PR1-5 (Pritsch et al. 2000, Bernardo et al. 2006), und speziell SA-induzierbare Glycosyltransferasen (Hill-Ambroz et al. 2006), konnte in *Fusarium*-inokulierten Geweben mehrfach nachgewiesen werden. Inwieweit die SA-

abhängige Signaltransduktion für die Resistenz gegenüber *F. graminearum* eine tragende Rolle spielt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Markander et al. (2006) konnten durch die Überexpression von *NPR1* aus *A. thaliana*, einem Schlüsselregulator der SA-vermittelten Systemic Acquired Resistance, die Resistenz der anfälligen Weizensorte Bobwhite fast auf das Niveau der hochresistenten Sorte Sumai3 heben. Transgene Pflanzen zeigten eine schnellere und höhere Expression von SA-abhängigen PR-Proteinen, als die nicht transformierten Kontrollpflanzen. Im resistenten asiatischem Sommerweizen Ning7840 ist *NPR1* im Vergleich zur anfälligen Sorte Clark jedoch zu späteren Zeitpunkten nach der Inokulation mit *F. graminearum* herunterreguliert. In einem weiteren Versuch konnte die Vorbehandlung mit SA die Resistenz der anfälligen Sorte Y 1193-6 gegenüber *F. graminearum* nicht erhöhen (Li und Yen 2008).

Es wird vermutet, dass die Gibberellin-vermittelte Signaltransduktion eine sehr große Rolle in der Resistenz von Weizen gegenüber den Erregern der Ährenfusariosen spielt. DELLA-Proteine hemmen die Expression von GA-Response Genen. Bei steigenden GA-Konzentrationen werden die DELLA-Proteine abgebaut, wodurch die Hemmung aufgehoben wird und GA-Response Gene exprimiert werden können.

Weizenpflanzen mit einem defekten DELLA-Protein auf Chromosom 4D (*RHTD1b*), das nicht mehr abgebaut werden kann, sind insensitiv gegenüber GA (Peng et al. 1999). Sie besitzen neben einer verminderten Wuchshöhe auch eine starke Anfälligkeit gegenüber *F. culmorum* (Draeger et al. 2007, Holzapfel et al. 2008, Voss et al. 2008, Srinivasachary et al. 2008).

Navarro et al (2008) zeigten, dass DELLA-Proteine von *A. thaliana* einen deutlichen Einfluss auf die Resistenz gegenüber Pathogenen ausüben. Mutanten, die keine funktionsfähigen DELLA-Proteine besaßen, waren resistenter gegenüber den biotrophen Pathogenen *Hyaloperonospora arabidopsis* und *Pseudomonas syringae pv tomato*, jedoch anfälliger gegenüber den nekrotrophen Pilzen *Alternaria brassiciola* und *Botrytis cinerea*. Ihre Expression von PR-1 und PR-2, Markergenen der SA-Signaltransduktion war nach der Inokulation mit den genannten Erregern schneller, als die des Wildtyps. Die Expression von Markergenen der JA/Et-Signaltransduktion war hingegen verzögert. Eine Behandlung von *A. thaliana* mit GA führte ebenfalls zu erhöhter Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae pv tomato* und verstärkter Anfälligkeit gegenüber dem nekrotrophen Pilz *Alternaria brassiciola*. Navarro et al. (2008) schlossen aus ihren Beobachtungen, dass der Abbau von DELLA-Proteinen durch GA zu einer Förderung der SA-Signaltransduktion und einer Hemmung der JA/ET-Signaltransduktion führt. Es wird vermutet, dass DELLA-Proteine demnach die SA-

Signaltransduktion hemmen und somit durch den SA/JA-Antagonismus die JA-Signaltransduktion fördern. Inwieweit die Ergebnisse dieser Studie mit *A. thaliana* jedoch auf die Interaktion von Weizen mit *F. graminearum* übertragbar sind, ist noch nicht geklärt.

1.4. Expressionsanalysen

Der Phänotyp einer Pflanze wird maßgeblich durch die Höhe und den Zeitpunkt der Expression bestimmter Gene beeinflusst. Durch eine veränderte Genexpression reagieren Pflanzen auf Pathogenangriff und veränderte Umweltbedingungen. Der erste Schritt der Genexpression ist die Transkription, bei der Gene von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen abgelesen und in Messenger (m)RNA umgeschrieben werden. Die Gesamtheit aller mRNAs einer bestimmten Einheit, einer Zelle, eines Gewebes oder des ganzen Organismus ist sein Transkriptom. Im Gegensatz zum Genom ist das Transkriptom instabil. Es kann sich innerhalb kurzer Zeit stark verändern und ist von Zelle zu Zelle unterschiedlich. Während der differentiellen Expressionsanalyse werden die Transkriptionsraten eines oder mehrerer Gene in Organismen, die definierten Bedingungen ausgesetzt wurden und/oder von Genotypen mit unterschiedlichen Eigenschaften oder Geweben stammen, miteinander verglichen.

Das Ziel von „functional genomics“ Ansätzen ist es, durch Genexpressionsanalysen gezielt Kandidatengene für bestimmte Merkmale zu identifizieren und daraus allelspezifische Marker abzuleiten, die in genetische Karten integriert werden können. Marker, die eine direkte funktionelle Assoziation mit dem Zielmerkmal besitzen und mit QTL für das Merkmal cosegregieren, sind potentielle Kandidaten für die Anwendung in Züchtungsprogrammen.

Für die Untersuchung der Genexpression stehen verschiedene anerkannte Methoden zur Verfügung. In den letzten 15 Jahren wurden zahlreiche Verfahren zur Transkriptomanalyse entwickelt, mit denen die globale Genexpression von Organismen oder Geweben untersucht werden können. Häufig werden Array-basierte Methoden verwendet, wie Micro- oder Macroarrays (Dezperetz et al. 1998, Shena et al. 1995). Hierfür wurden spezifische cDNA-Fragmente auf Chips geblottet und mit fluoreszenzmarkierter cDNA der zu untersuchenden Proben hybridisiert. Der Einfluss der Infektion mit *F. graminearum* oder der Behandlung mit dem Mycotoxin Deoxynivalenol auf die Genexpression im Ährgewebe von Weizen wurde mit diesen Methoden mehrmals untersucht (Bernardo et al. 2006, Ansari et al. 2007, Desmond et al. 2007, Walter et al. 2008, Li und Yen 2008, Jia et al. 2009). Bei gelbasierten Methoden der differentiellen Darstellung von Transkripten, wie beispielsweise dem differential Display

(Liang und Pardee, 1992) oder der cDNA-AFLP Analyse (Bachem et al. 1996), die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, wird keine Vorauswahl der zu untersuchenden Gene getroffen. Hier können theoretisch alle Transkripte erfasst werden, auch solche, die bisher in noch keinen Datenbanken hinterlegt wurden. Der limitierende Faktor dieser Methoden ist jedoch der nicht unerhebliche manuelle Arbeitsaufwand. Durch die Entwicklung neuer Sequenzierautomaten stehen ab dem Jahr 2005 die „Next Generation Sequencing“ Plattformen wie 454 (Roche), Solexa (Illumina) und Solid (Applied Biosystems) zur Verfügung, mit denen die Sequenzierung ganzer Transkriptome möglich ist. Hier erfolgt die Expressionsanalyse durch den Vergleich der Anzahl der einzelnen mRNAs in den zu untersuchenden Proben. Zudem können Sequenzpolymorphismen innerhalb der Transkripte verschiedener Genotypen identifiziert werden, so dass neben einer Assoziation von Transkriptlevel und Phänotyp auch eine Assoziation von Polymorphismen und Phänotyp durchgeführt werden.

Wenn gezielt die Expression eines bestimmten Gens, von dem bereits Sequenzinformationen vorliegen, untersucht werden soll, werden meist Northern Blots oder quantitative PCR Techniken durchgeführt. Bei Northern Blots wird die RNA einer Probe auf einer Membran fixiert und diese mit genspezifischen, markierten Sonden hybridisiert. Für quantitative PCR-Techniken wird die RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in copy (c)-DNA umgeschrieben und diese als Template in einer PCR mit genspezifischen Primern eingesetzt. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten quantitativen Real-time PCR wird zur Bestimmung der Transkriptmenge von der Zyklenzahl, bei der die exponentielle Phase der Amplifikation in der PCR einsetzt (=Cp-value), auf die ursprüngliche Transkriptmenge geschlossen. Hierzu wird dem PCR-Ansatz ein DNA-intercalierender Farbstoff, wie z.B. CYBR-Green, zugesetzt und die quantitative PCR in Thermocyclern, die mit LCD-Kameras ausgestattet sind, durchgeführt. Diese halten während der gesamten Amplifikation die Zunahme der Fluoreszenz, und damit indirekt die Zunahme des PCR-Produktes, fest. Neben intercalierenden Farbstoffen werden auch fluoreszenzmarkierte Sonden, wie Taqman-Sonden und Molecular Beacons, eingesetzt. Sowohl quantitative PCR-Techniken, als auch Northern Blots werden zur Validierung der Ergebnisse von globalen Transkriptomanalysen, wie Micro- und Macroarrays, cDNA-AFLP und Transkriptomsequenzierungen, eingesetzt, da sie als sehr zuverlässig und sensibel gelten.

In der vorliegenden Arbeit sollen unter Anwendung der Expressionsanalyse mit der Technik cDNA-AFLP Gene identifiziert werden, die an der Abwehr und der Resistenz von Weizen gegenüber *F. graminearum* beteiligt sind. Abbildung 3 gibt eine Übersicht über den Arbeitsablauf der Expressionsanalyse, wie er in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde.

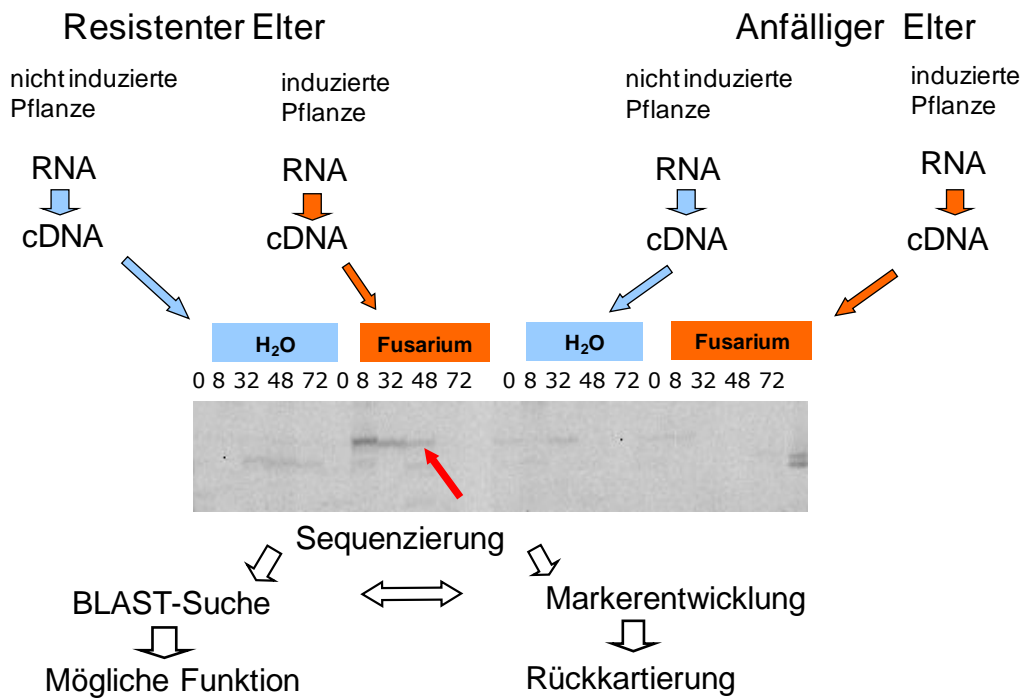


Abb. 3: Übersicht über das Prinzip der Expressionsanalyse unter Anwendung der cDNA-AFLP-Technik

Die Ähren des anfälligen und des resistenten Elter von Kartierungspopulationen wurden mit *F. graminearum* infiziert und zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion beprobt. Aus dem Ährengewebe jedes Probenahmezeitpunktes wurde die RNA extrahiert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde als Template für die cDNA-AFLP-Analyse eingesetzt und ergab im cDNA-AFLP-Gel ein spezifisches Bandenmuster der zum Zeitpunkt der Probenahme vorhandenen Transkripte. Banden, die zwischen infizierten und Wasser-behandelten Proben sowie zwischen den anfälligen und resistenten Genotypen Unterschiede zeigten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten, kloniert und sequenziert.

Die Sequenzen wurden einer BLAST-Analyse unterzogen, um mögliche Ähnlichkeiten mit Genen bekannter Funktion feststellen und Rückschlüsse auf die Prozesse in den infizierten Geweben ziehen zu können. Zudem wurden Primer auf die TDF-Sequenz oder die von ESTs aus Datenbanken gelegt und damit genomische DNA der jeweiligen resistenten und anfälligen Eltern amplifiziert und sequenziert. Auf diese Weise sollten Sequenzpolymorphismen zwischen den Eltern gefunden werden, anhand derer das Genfragment in die genetische Karte der jeweiligen Population integriert werden kann. TDFs, die mit QTLs für Fusariumresistenz

colokalisieren, sind Kandidaten für Resistenzgene. Die Verwendung dieser Gene innerhalb der markergestützten Selektion kann im Anschluss geprüft werden.

Zahlreiche Expressionsanalysen wurden mit anfälligen und resistenten Weizensorten nach der Inokulation mit *F. graminearum* (Pritsch et al. 2000, Kruger et al. 2002, Kong et al. 2005, Zhou et al. 2005, Goswami et al. 2006, Hill-Ambroz 2006, Zhou et al. 2006, Bernardo et al. 2006, Kong et al. 2007, Golkari et al. 2007, Li und Yen 2008, Golkari et al. 2009, Steiner et al. 2009, Jia et al. 2009) oder der Behandlung mit dem Trichothecen Deoxynivalenol (Ansari et al. 2007, Desmond et al. 2008, Walter et al. 2008) durchgeführt. Bei den bisher untersuchten resistenten Weizensorten handelt es sich hauptsächlich um die chinesische Weizensorte Sumai3 oder deren Nachkommen Ning 7840 und CM 82036, die alle das Resistenzgen *FHB1* auf Chromosom 3BS besitzen, das eine starke Typ 2-Resistenz vermittelt. Kong et al. (2007) führten zudem Studien mit der 7D-7e12 (*L. elongatum*) Substitutionslinie KS24-1 durch, die ebenfalls eine Typ 2-Resistenz besitzt.

Auffällig ist bei vielen Studien die Expression von ROS generierenden Enzymen, wie Peroxidasen (Pritsch et al. 200, Kruger et al. 2002, Zhou et al. 2005, 2006, Desmond et al. 2008), sowie antioxidativen Enzymen, wie Catalase, Superoxiddismutase, Ascorbat Peroxidase, Peroxidredoxin, Germin-like Proteinen (Kuger et a. 2002, Zhou et al. 2005, 2006, Desmond et al. 2008) sowohl nach der Inokulation mit *F. graminearum* als auch nach der Behandlung mit DON in resistenten und anfälligen Genotypen. In der resistenten Sorte Sumai3 wurde bereits 4 Stunden nach der Behandlung mit DON eine „Wheat Alternative Oxidase“ zur Verminderung von oxidativem Stress hochreguliert (Walter et al. 2008). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Infektionen mit *F. graminearum* sowie mit dem Toxin Deoxynivalenol allein einen „oxidativen Burst“ bzw. oxidativen Stress verursachen können (Zhou et al. 2006, Walter et al. 2008). Da Pritsch et al. (2000) die Hochregulierung von Peroxidasen bereits ab 6 Stunden nach der Inokulation zeigen konnte - ein Zeitpunkt, zu dem DON noch nicht im Wirtsgewebe nachweisbar ist - (Kang und Buchenauer 1999), ist es wahrscheinlich, dass der oxidative Burst nicht allein durch DON verursacht wird.

Eine Hochregulierung der PR-Proteine 1-5 im Zeitraum von 6 bis 48 Stunden nach der Inokulation sowohl in Sumai3 als auch in der anfälligen Sorte Wheaton konnten Pritsch et al. (2000) zeigen. Dabei war die Reaktion in der resistenten Sorte Sumai3 stärker und hielt länger an, (max. 48 hai = hours after inoculation) als in Wheaton (max. 32 hai). Eine verstärkte Expression von Chitinasen (PR3), β -1,3 Glucanasen (PR1, PR2) sowie Thaumatin ähnlichen Proteinen (PR4, PR5) nach der Inokulation mit *F. graminearum* wurde in mehreren Studien

bestätigt (Kruger et al. 2002, Zhou et al. 2006, Bernardo et al. 2006). Mackintosh et al. (2006) erhielten durch Überexpression von α -1 Purothionin, Thaumatin-like Protein-1 und β -1,3-Glucanasen transgene Linien, die im Vergleich zur untransformierten Kontrolle einen verzögerten Infektionsverlauf zeigten. Auch die Überexpression einer Class II Chitinase aus Gerste erhöhte die FHB Resistenz von transgenen Weizenlinien (Shin et al. 2008).

Eine weitere Reaktion auf die Inokulation von Ähren mit *F. graminearum* (Bernardo et al. 2006, Ansari et al. 2007) und die Behandlung von Wurzeln von Weizenkeimlingen mit DON (Ansari et al. 2007) ist die Aktivierung von Transposons. Diese mobilen Elemente werden unter normalen Bedingungen nicht transkribiert, können jedoch bei Stress aktiviert werden und sich auf die Regulation benachbarter Gene auswirken (Kashkush et al. 2003).

In mehren Studien konnte bei resistenten Sorten die verstärkte Expression von Genen aus dem Phenylpropansyntheseweg, der unter anderem zur Lignin und Terpenoid-Synthese führt, nach der Fusarium-Inokulation gezeigt werden (Kruger et al. 2002, Steiner et al. 2009). Dies bestärken die Ergebnisse von Kang und Buchenauer (2000b), wonach die Zellwände resistenter Weizensorten drei Tage nach der Inokulation mit *F. culmorum* deutlich stärker mit Lignin verstärkt wurden, als die Zellwände der anfälligen Sorte.

Cytochrom P450 Monooxygenasen sind eine sehr große Genfamilie, die ebenfalls am Sekundärstoffwechsel von Pflanzenzellen beteiligt ist. Einige Mitglieder dieser Familie werden nach der Infektion mit *F. graminearum* in resistenten und anfälligen Sorten im Vergleich zur nicht inokulierten Kontrollen differentiell exprimiert (Bernardo et al. 2006, Hill-Ambroz et al. 2006, Kong et al. 2007, Steiner et al. 2009).

Deoxynivalenol ist ein wichtiger Virulenzfaktor von *F. graminearum*, der die Ausbreitung des Pilzes in die Ähre ermöglicht. Nur mit Hilfe dieses Toxins lässt sich die Abwehrreaktion des Wirtes hemmen. Sonst führt die Abwehrreaktion zu starken Zellwandverstärkungen am Rachisnodium, wodurch der Pilz an seiner weiteren Ausbreitung durch die Ähre gehindert wird (Jansen et al. 2005). Aus diesem Grund ist die verstärkte Expression von Genen, die für mögliche Entgiftungsenzyme für DON kodieren, von großem Interesse. Weizensorten unterschiedlicher Herkunft akkumulieren bei Fusariumbefall DON-Glycosyl in ihren Vakuolen. Dabei korreliert die Fähigkeit zur DON-Glycolysierung mit der FHB-Resistenz der Genotypen (Berthiller et al. 2005, Lemmens et al. 2005). Poppenberger et al. (2003) isolierten eine UDP-Glycosyltransferase aus *A. thaliana* (*DOGTI*), die in der Lage ist, DON in das wesentlich weniger toxische DON-3-O-Glycosid umzuwandeln. Linien von *A. thaliana*, in

denen diese Glycosyltransferase überexprimiert wurde, zeigten eine verstärkte Toleranz gegenüber DON. *DOG1* ist durch die Phytohormone Jasmonat, Ethylen sowie Salicylsäure induzierbar (Poppenberger et al. 2003). In mehreren Expressionsstudien waren UDP-Glycosyltransferasen nach der Inokulation mit *F. graminearum* (Hill-Ambroz et al. 2006, Steiner et al. 2009) sowie durch die Behandlung mit DON (Walter et al. 2008) hochreguliert. Durch QTL-Analysen konnte ein QTL für die Entgiftung von DON im gleichen Bereich von Chromosom 3BS wie der QTL für Typ 2-Resistenz QTL von Sumai 3 (*FHB1*) kartiert werden (Lemmens et al. 2005). *FHB1* ist bereits feinkartiert (Liu et al. 2006) und das zugrunde liegende Resistenzgen soll durch einen Map Based Cloning-Ansatz eindeutig identifiziert werden. Zu den zu testenden Kandidatengenen im nicht mehr rekombinanten Bereich zählt jedoch keine UDP-Glycosyltransferase (J. Anderson, persönliche Mitteilung).

Es wird angenommen, dass ABC-Transporter eine Rolle in der Entgiftung und dem Transport von DON spielen. Mitglieder dieser großen Familie von Transmembranproteinen wirken am aktiven Transport von spezifischen Substanzen durch die Membranen mit und könnten in der Lage sein, konjugiertes DON zur Lagerung in die Vakuole zu transportieren. Insbesondere Multidrug Resistance Proteine (MDR-Proteine), die zu den ABC-Transportern zählen, wurden nach der *F. graminearum*-Infektion mehrfach als induziert beschrieben (Kang et al. 2007, Handa et al. 2008). In KS24-1, einem Genotyp mit guter Typ 2-Resistenz, ist ein MDR-Protein 36 und 72 hai bis zu 400-fach im Vergleich zur mock-inokulierten Kontrolle hochreguliert (Kang et al. 2007). Handa et al. (2008) identifizierten durch Synthänie zu Reis ein MDR-Protein, das in den QTL für DON-Entgiftung der Population Gamenya/Sumai3 kartiert. Dieses MDR-Protein ist in Gamenya, der Sorte, die das Resistenzallel besitzt, stärker induziert als in Sumai3 (Handa et al. 2008).

Weitere Kandidatengene für Fusariumresistenz sind ein putatives „Blight Protein“ und ein NBS-LRR, die in der resistenten Sorte Ning 7840 jeweils 6 und 72 hai stark hochreguliert sind (Kong et al. 2007). Ein Transkriptionsfaktor der „basic Leucin Zipper“-Familie ist in jenen Linien der Population CM 82036/Remus, die den QTL auf 3BS besitzen, nach der Behandlung mit DON im Vergleich zu Linien ohne diesen QTL hochreguliert (Ansari et al. 2007). Dieses Gen kartiert jedoch nicht auf Chromosom 3BS.

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Reaktion der adaptierten europäischen Winterweizen Dream (res.), Lynx (anf.), G16-92 (res.), Hussar (anf.), SVP72017 (res.) und Capo (res.) auf die Infektion mit *F. graminearum* mittels Genexpressionsanalyse (cDNA-AFLP) zu untersuchen und Unterschiede zwischen anfälligen und resistenten Genotypen aufzuzeigen. Dazu sollten nach der Infektion mit *F. graminearum* differentiell regulierte Gene identifiziert werden und Vergleiche in der Genexpression von anfälligen und resistenten Winterweizensorten durchgeführt werden. Zudem sollen die Unterschiede der Genexpression im zeitlichen Verlauf während des voranschreitenden Infektionsverlaufs innerhalb der ersten vier Tage der Infektion dargestellt werden. Diese Beobachtungen liefern Hinweise auf beteiligte Abwehrmechanismen. Die Ergebnisse der cDNA-AFLP-Analyse sollten mit der quantitativen Real-time PCR validiert werden.

Die für die Expressionsstudien ausgewählten Winterweizengenotypen sind die Eltern von für das Merkmal der Ährenfusarioseresistenz spaltenden Kartierungspopulationen. Für die Populationen Dream/Lynx und G16-92/Hussar wurden bereits QTL-Kartierungen für die Ährenfusarioseresistenz durchgeführt, in die Boniturdaten von vier Umwelten einfließen (Schmolke et al. 2005, 2008). Die durch die cDNA-Analyse identifizierten differentiell exprimierten Gene sollten in diese bestehenden QTL-Karten integriert werden, um eine mögliche Colokalisierung mit Resistenz-QTL aufzudecken. Solche Gene sind Kandidaten für Resistenzgene von Weizen gegenüber Ährenfusariosen und können für den Einsatz in der markergestützten Selektion getestet werden

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Für die Expressionsanalysen wurden die Eltern von drei für das Merkmal Ährenfusarioseresistenz spaltenden Kartierungspopulationen verwendet. In der Population Dream/Lynx konnten QTL für Fusariumresistenz auf den Chromosomen 6AL, 1B, 2BL und 7BS identifiziert werden, die jeweils 19%, 12%, 11% und 21% der phänotypischen Varianz erklären. Dabei werden die QTL auf Chromosom 6AL, 2BL und 7BS von Dream, der QTL auf 1B von Lynx weitervererbt (Schmolke et al. 2005). In der Population G16-92/Hussar wurden QTL für Fusariumresistenz auf den Chromosomen 1A und 2BL identifiziert, wobei der QTL auf Chromosom 1A von Hussar stammt und 10% der phänotypischen Varianz erklärt, und der QTL auf 2BL von G16-92 weitervererbt wird und 14% der phänotypischen Varianz erklärt (Schmolke et al. 2008). Für die Population SVP72017/Capo konnte bis jetzt keine QTL-Analyse durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden polymorphe cDNA-Fragmente aus diesen Populationseltern in den Populationen History/Rubens und Solitär/Travix (Holzapfel et al. 2008) rückkartiert. Jedoch gibt es für SVP72017 zwei weitere Kartierungspopulationen, mit jeweils Sngh3559 (Züchter: Saatenunion) und Inspiration (Züchter: Saatzucht Breun) als anfälligen Elter, für die eine QTL-Analyse mit den phänotypischen Daten von vier Umwelten durchgeführt wurde (J. Groth, persönliche Mitteilung). In der Population Sngh3559/SVP72017 ist SVP72017 der Donor eines QTL auf Chromosom 2AL, der ca. 12% der phänotypischen Varianz erklärt. Bei allen Eltern handelt es sich um europäische Winterweizen ohne eingekreuzte asiatische Resistenzdonoren.

Tabelle 1: Übersicht über die Herkunft (¹Buerstmayr et al. 2000, ²Schmolke 2004), die Einstufung der Resistenz gegen Ährenfusarium (³beschreibende Sortenliste 2004, ⁴Einschätzung anhand von Feldbonituren (L. Hartl, G. Zimmermann, persönliche Mitteilung) sowie Halmverkürzungsallele der Rht-Gene der für die Expressionsanalyse verwendeten Genotypen

Elter	Stammbaum, Herkunft, Ährenfusariosebewertung, Rht-Allele
Dream	<ul style="list-style-type: none"> • Disponent/Kronjuwel//Monopol/3/Orestis * • Saatzucht Schweiger • Boniturnote Ährenfusarium: 3³ • <i>RhtB1a, RhtD1a</i>
Lynx	<ul style="list-style-type: none"> • CWW-44442-64/Rendevous * • Cambridge Plant Breeders • Boniturnote Ährenfusarium: 7⁴ • <i>RhtB1a, RhtD1b</i>
G16-92	<ul style="list-style-type: none"> • Arina/Caripulus//Töring5/mexikanischer Stamm * • Institut für Pflanzengenetik, Bundesanstalt für Züchtungsforschung Grünbach • Boniturnote Ährenfusarium: 3⁴ • <i>RhtB1a, RhtD1a</i>
Hussar	<ul style="list-style-type: none"> • Squadron/Redezvous * • Imperial Chemical Industries • Boniturnote Ährenfusarium: 7⁴ • <i>RhtB1a, RhtD1b</i>
SVP 72017-17-5-10-1	<ul style="list-style-type: none"> • Marzotto//Dippes Triumph/Mironovskaja 808 ** • Centre for Plant Breeding Research, Wageningen, Niederlande • Boniturnote Ährenfusarium: 1-2⁴ • <i>RhtB1b, RhtD1a</i>
Capo	<ul style="list-style-type: none"> • Martin/Pokal ** • Probstdorfer Saatzucht • Boniturnote Ährenfusarium: 3³ • <i>RhtB1a, RhtD1a</i>

Die Pflanzen wurden in 14 cm großen Töpfen in einer Mischung aus Kompost-Erde (3/5) und handelsüblicher Blumenerde (2/5) zu je 4 Körnern/Topf ausgesät. Nach der Keimung wurden sie für acht Wochen bei 4°C vernalisiert und nach der Vernalisation auf 2 Pflanzen/Topf ausgedünnt, so dass für die Versuche 60 Pflanzen/Genotyp zur Verfügung standen. Die Pflanzen wurden bei 20°C Tages- und 16°C Nachttemperatur und einer Tageslänge von 16 Stunden im Gewächshaus angezogen. Die Düngung mit Eurofertil NPK 12-12-17 (+2) erfolgte direkt nach der Vernalisation, sowie drei Wochen und sechs Wochen später. Die letzte Düngung entfiel, wenn zu diesem Zeitpunkt das Entwicklungsstadium BBCH 51 (Beginn des Ährenschiebens) bereits erreicht war.

Die Anzucht von Dream, Lynx, G16-92 und Hussar erfolgte von Dezember 2005 bis April 2006 für die Expressionsanalyse und ein zweites Mal von Dezember 2006 bis Mai 2007 für die genaue Bonitur des Infektionsverlaufs. SVP72017 und Capo wurden Juli 2006 bis November 2006, sowohl für die Expressionsanalyse als auch für die Bonitur des Infektionsverlaufs, angezogen.

2.2. Inokulation

Kurz vor Beginn der Inokulation wurde die Temperatur im Gewächshaus auf 24°C Tag- und 18°C Nachttemperatur erhöht. Da die Inokulation der Ähren mit *F. graminearum* zu Beginn der Blüte (BBCH: 61-65) erfolgen muss, richtete sich der Inokulationstermin nach der Entwicklung der Pflanzen. Der Blühbeginn der jeweiligen Populationseletern war in den Versuchen sehr ähnlich, so dass die Probenahme innerhalb eines gleichen Zeitraums erfolgen konnte. Jedoch lag der Blühbeginn von Dream und Lynx ca. zwei Wochen hinter dem von G16-92 und Hussar. Die Anzucht und somit auch die Inokulation von SVP72017 und Capo wurde ein halbes Jahr später durchgeführt. Auf Grund der unterschiedlichen Inokulationszeitpunkte werden im Folgenden immer die Eltern einer Population direkt miteinander verglichen.

Die Inokulation erfolgte nach der Einzelblüteninokulationsmethode von Steiner et al. (2009). Durch diese Inokulationsmethode wird gewährleistet, dass jede Blüte mit der gleichen Menge der Makrokonidiensuspension behandelt wird und der Pilz die Innenseiten von Lemma und Palea infizieren kann. Es wurden jeweils die basalen Blüten von vier Ährchen pro Ähre in der Mitte der Ähre inokuliert (Abb. 5a). Dabei wurden die Blüten zu Beginn der Anthese vorsichtig geöffnet und 10 µl Makrokonidiensuspension (10.000MK/ml) des *F. graminearum*

Stamms IFA 65 (Quelle: IFA-Tulln) zwischen Lemma und Palea getropft. Anschließend wurden die Ähren mit Wasser besprüht und für 24 Stunden mit einer transparenten Plastiktüte bedeckt, um die andauernde Feuchtigkeit der Ähren zu erhalten, die der Pilz für die Infektion benötigt.

Es wurden nur Lemma, Palea und der entsprechende Rachisabschnitt der inokulierten Blüten geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Glumae, die mittleren, nicht inokulierten Blüten des Ährchens, sowie die Antheren und das Ovar der infizierten Blüten, wurden zuvor entfernt (Abb. 5b). Kontrollpflanzen wurden ebenfalls, wie oben beschrieben, behandelt, jedoch wurde statt der Makrokonidiensuspension 10 µl autoklaviertes, entsalztes Wasser verwendet. Die Probenahme von inokulierten Pflanzen und Kontrollpflanzen erfolgte jeweils nach 0, 8, 24, 32, 48, 72 und 96 Stunden. Zudem wurde pro Genotyp eine Probe von vollkommen unbehandelten Ähren zum Zeitpunkt der Anthese genommen.

Jede Probe besteht aus einer Mischprobe von mindestens sechs Ähren pro Zeitpunkt und Behandlung. Das Blütengewebe wurde sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Pro Inokulationstag wurde mindestens eine Ähre für einen Zeitraum von 21 Tage beobachtet, um feststellen zu können, ob eine Fusariuminfektion stattfand. Dies diente zum einen der Überprüfung der Virulenz des Inokulums, zum anderen konnte so getestet werden, ob ein Übertrag von *F. graminearum* auf Wasser-behandelten Kontrollpflanzen stattfand. Insgesamt wurden, bei Dream 6 Fusarium-inokulierte und 7 Kontrollähren, bei Lynx 8 Fusarium-inokulierte und 4 Kontrollähren, bei G16-92 6 Fusarium-inokulierte und 3 Kontrollähren, bei Hussar 7 Fusarium-inokulierte und 5 Kontrollähren, bei SVP72017 22 Fusarium-inokulierte und 8 Kontrollähren und bei Capo 17 Fusarium-inokulierte und 5 Kontrollähren, untersucht.

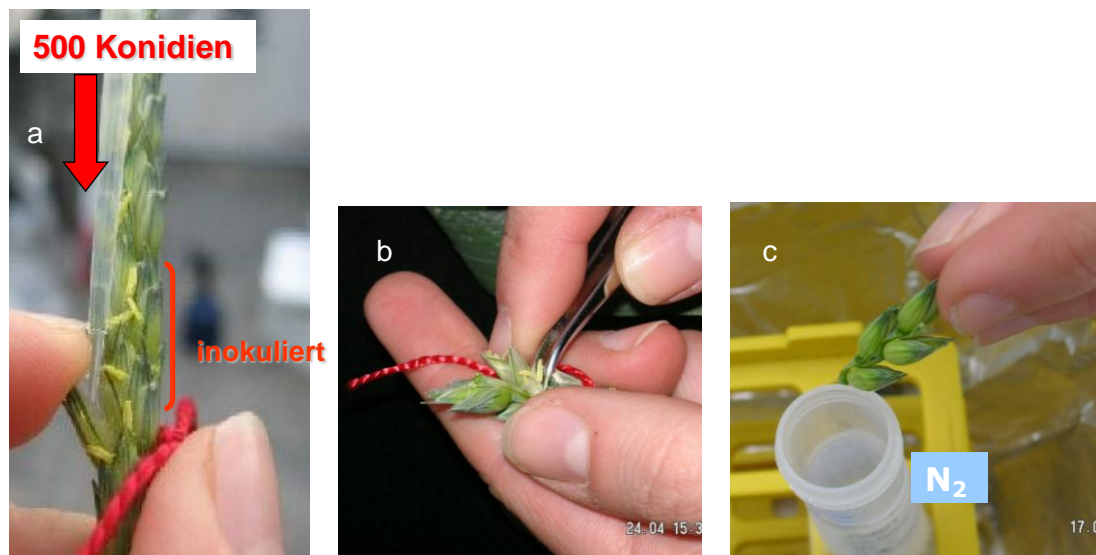


Abb. 4 : Inokulation und Probenahme nach Steiner et al. 2009

Abb. 4a: Einzelblüteninokulation mit einer Makrokonidien suspension des Pilzes *F. graminearum*

Abb. 4b: Entfernung des Ovars und der Antheren aus den inokulierten Blüten

Abb 4c: Einfrieren des inokulierten Ährenteils

2.3. Charakterisierung der Resistenz

Um die Resistenz charakterisieren zu können, wurden die Ähren aller sechs Genotypen wie oben beschrieben mit *F. graminearum* infiziert. Da nach dem im ersten Inokulationsversuch mit Dream, Lynx, G16-92 und Hussar, nach der die Probenahme für die Expressionsanalyse durchgeführt wurde, nur das Vorhandensein oder Fehlen von Symptomen festgehalten wurde, wurden diese Genotypen in einem weiteren Versuch erneut inokuliert und der Infektionsverlauf genauer bonitiert. Die Anzucht von SVP72017 und Capo erfolgte nur einmal, da hier der Infektionsverlauf in den nicht-beernteten infizierten Ähren genau festgehalten wurde. Die Symptome von 10 bis 22 Pflanzen pro Genotyp (genaue Anzahl der untersuchten Pflanzen: SVP72017: 22, Capo: 17, G16-92: 17, Hussar: 13, Dream: 13, Lynx 10) wurden im Abstand von zwei bis drei Tagen bonitiert, um die Eltern der Populationen hinsichtlich ihres Krankheitsverlaufs miteinander vergleichen zu können. Um die Resistenz gegenüber der Ausbreitung in der Ähre (Typ 2-Resistenz) beurteilen zu können, wurden die infizierten Ährchen unterhalb der Infektionsstelle im Zeitraum von 18-21 Tage nach der Inokulation gezählt.

2.4. Molekularbiologische Arbeiten

2.4.1. DNA-Extraktion

Die Extraktion genomischer DNA erfolgte nach der Natriumbisulfit-Methode (Anderson et al. 1992) mit den Modifikationen von Behn et al. (2004).

Jeweils zwei Blätter von jungen Weizenpflanzen wurden für drei Tage an der Vakuum-Gefriertrocknungsanlage getrocknet und anschließend in der Kugelmühle fein vermahlen.

Die extrahierte DNA wurde in 0,1 TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

Um die Konzentration und die Qualität bestimmen zu können, wurde ein Aliquot der DNA-Lösung auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und die Konzentration durch Schätzen mit Hilfe eines Lambda/HindIII Standards mit definierter Bandenstärke bestimmt.

2.4.2. RNA-Extraktion

Vor der RNA-Extraktion mussten die Ährenproben in flüssigem Stickstoff fein vermahlen werden. Aus ca. 300 mg des Pulvers wurde mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) die Gesamt-RNA extrahiert. In der Probe enthaltene DNA konnte dabei durch enzymatischen Verdau bei Raumtemperatur auf der Extraktionssäule mit dem RNase free DNase Set (Qiagen, Hilden) entfernt werden. Die RNA wurde mit 100µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser von der Säule eluiert und anschließend bei -80°C gelagert. Beide Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Zur photometrischen Messung der Konzentration mit dem Gene Quant DNA/RNA Calculator (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde die RNA 1:10 in DEPC- H₂O MilliQ verdünnt und die Extinktion bei 260 nm bestimmt.

Die Qualität der RNA-Lösung wurde auf einem 1,5% Agarosegel (11% Formaldehyd) unter denaturierenden Bedingungen überprüft.

2.4.3. cDNA-AFLP

2.4.3.1 cDNA-Synthese für cDNA-AFLP

Für die cDNA-Erststrangsynthese wurde 0,125µg RNA eingesetzt und die Synthese mit dem SMART First-strand Kit (Clontech/Takara), jeweils mit der Hälfte des vom Hersteller empfohlenen Reaktionsansatzes, durchgeführt. Einzelstrang-DNA wurde 1:5 mit 0,1 TE verdünnt und die Reaktion durch 7-minütiges Erhitzen bei 72° C abgebrochen.

Die Zweitstrang-Synthese erfolgte mit dem Advantage LD-PCR Kit von Clontech und gemäß den Herstellerangaben (5 µl verdünntes Template aus der Erststrangsynthese, 1x Advantage 2

Puffer, 1 mM dNTPs, 0,1 μ M PCR-Primer, 1x Advantage 2 Polymerase Mix, mit H₂O auf das Volumen von 50 μ l aufgefüllt).

Die LD-PCR Bedingungen waren wie folgt:

- 1 min 95 °C
 - 15 sec Denaturierung bei 95°C
 - 30 sec Primeranlagerung bei 65°C
 - 6 min Primerverlängerung bei 68°C
- } 18 Zyklen

Die Bestimmung der optimale Zyklenzahl erfolgte experimentell. Um die Enzyme der reversen Transkription und LD-PCR zu entfernen, wurde die cDNA für 1 h bei 45°C mit 0,13 U Proteinase K (Roche) inkubiert, mit einer 1,5 M NH₄OAc Lösung in 70% EtOH gefällt und 2 Mal mit EtOH_{abs.} gewaschen. Anschließend wurde die doppelsträngige cDNA in 20 μ l H₂O MilliQ resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.3.2 Durchführung der cDNA-AFLP

Die cDNA-AFLP-Analysen von Dream, Lynx, G16-92 und Hussar erfolgte mit den Proben der Probenahmezeitpunkte 8, 32, 48 und 72 Stunden nach der Inokulation mit *F. graminearum* und der jeweiligen mock-behandelten Kontrollproben dieser Zeitpunkte sowie einer vollkommen unbehandelten Kontrolle. Bei SVP72017 und Capo wurden cDNA-AFLPs mit allen sieben beprobten Zeitpunkten durchgeführt.

Für die cDNA-AFLP wurde die Methode von Bachem et al. (1996) mit folgenden Modifikationen angewandt: 300 ng ds-cDNA wurden mit 5,0 U *MseI* und 2,5 U *PstI* oder 2,5 U *Sse8387I* für 3 Stunden bei 37°C verdaut. Die Ligation mit 25 pmol *MseI*-Adapter und 2,5 pmol *Sse8387I* oder 2,5 pmol *PstI*-Adapter erfolgte im gleichen Schritt durch die Zugabe von 1U T4-Ligase. Die Proben von Dream, Lynx, G16-92 und Hussar wurden dabei mit den Enzymen *PstI/MseI* und *Sse8387I/MseI* geschnitten, SVP72017 und Capo nur mit *PstI/MseI*. Die Fragmente wurden 1:4 in TE 0,1-Puffer verdünnt und anschließend als Template für die Preamplifikation verwendet. Die Präamplifikation und die selektive Amplifikation erfolgte nach der Methode von Hartl et al. 1999 und Schmolke et al. 2005. Für die selektive Amplifikation wurden 30 Primerkombinationen pro Enzymsystem getestet, wobei jeweils ein Primer mit Fluorescein markiert war. Die Benennung der Primer folgte dabei der Nomenklatur von Keygene. Die Produkte der selektiven Amplifikation wurden auf einem 5% Polyacrylamid (PAA) Gel bei 50 V über eine Laufstrecke von 30 cm aufgetrennt und die Gele auf einem Typhoon 9200 Scanner (GE-Healthcare) eingescannt.

2.4.3.3 Klonierung differentiell exprimierter TDFs

Differentiell exprimierte cDNA-AFLP-Fragmente, sogenannte „Transcript Derived Fragments“ (TDFs), wurden mit einem Skalpell aus dem 5% PAA-Gel herausgeschnitten und über Nacht in 50 µl autoklaviertem MilliQ-Wasser im Kühlschrank eluiert. Diese Lösung diente als Template für die Reamplifikation des TDFs mit adapterspezifischen AFLP-Primern. Die PCR-Ansätze für die Reamplifikation waren wie folgt:

0,5 µl des Eluats, jeweils 0,3 µM des präselektiven Primer P03 und des jeweiligen selektiven *Mse*-Primers, 1,5 mM MgCl₂, 0,8 µM dNTPs, 0,25 U Taq Polymerase (Thermo-Fisher, Großbritannien) und 1x des zugehörigen PCR-Puffers (Thermo-Fisher, Großbritannien). Der Ansatz wurde mit Wasser auf 60 µl aufgefüllt.

Für jedes TDF wurden 2 PCR-Ansätze gepoolt und diese mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt. Die DNA-Konzentrationsbestimmung des PCR-Produkts erfolgte photometrisch.

Die Ligation und die Transformation erfolgten mit dem PCR Cloning^{Plus} Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben. Zur Ligation wurden 5ng des p-drive cloning Vectors, einem T/A-Klonierungsvektor, 34 ng des gereinigten PCR-Produktes zugegeben und der Ansatz 30 min bei 4°C inkubiert. Die chemokompetenten *E. coli*-Zellen wurden nach der Zugabe des Ligationsansatzes durch 30- sekündiges Erhitzen auf 42 °C transformiert und danach auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 125 µl SOC-Medium zu den *E. coli*-Bakterien gegeben und die Mischung auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin, IPTG und XGal ausplattiert.

Durch die im Vektor enthaltene Ampicillin-Resistenz konnten auf diesem Medium nur transformierte Zellen wachsen. Die Identifizierung der inserthaltigen, transformierten Bakterienkolonien erfolgte nach Übernachtinkubation bei 37 °C durch Blau-Weiß-Selektion. Weiße Bakterienkolonien, die das DNA-Fragment aufgenommen hatten, wurden mit einem Zahnstocher gepickt und in LB-Medium mit Ampicillin überführt. Diese Kultur wurde 24 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Reinigung der Plasmid-DNA aus der Bakteriensuspension erfolgte mit dem Nucleo-Spin-Kit (Machery und Nagel, Düren) nach den Herstellerangaben.

Zur Kontrolle des korrekten Einbaus und der Größe des klonierten DNA-Fragmentes wurde mit einem Aliquot der Plasmid (p-) DNA-Lösung ein *EcoRI*-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 0,2 µg p-DNA, 5U *EcoRI* (MBI) und 1 x Puffer O+ (MBI) add 20 µl H₂O für 3 h bei 37°C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf einem 2% Agarosegel bei 80V

aufgetrennt. Von jedem cDNA-AFLP-Fragment wurde Plasmid-DNA aus 3 Kolonien sequenziert (MWG-Biotech).

2.4.3.4 Durchführung der BLAST-Analysen

Die Sequenzen aller TDFs wurden einer Recherche in den Datenbanken von NCBI¹ und TIGR/Craig Vetre Institute² unterzogen. Bei NCBI wurde die Datenbank nr (= non-redundant nucleotide collection) und EST-others (ESTs ohne Mensch und Maus-EST) durchsucht. Zuerst wurde BLAST-N, d.h. der Vergleich von Nukleotid-Abfolgen durchgeführt. Die Sequenzen, die bei BLAST-N keine Ähnlichkeit mit Genen bekannter Funktion zeigten, wurden einer erneuten Analyse mit BLAST-X unterzogen. Hierbei werden die translatierten Sequenzen der TDFs mit einer Protein-Sequenz verglichen. Die Grenze der Ähnlichkeit zwischen TDF und BLAST-Hit wurde bei einem E-Value von $e^{-0.5}$ gezogen. Die „transcript assemblies“ der TIGR-Datenbank beginnen in der Akzessionsnummer mit TA. Sie wurden aus überlappenden ESTs zusammengesetzt und selbst einer Datenbanksuche unterzogen. Die angegebene Funktion eines „transcript assemblies“ bezieht sich auf dessen BLAST-Hit.

TDFs, für die bei der ersten BLAST-Suche in der Datenbank von NCBI (nr) ein Hit mit DNA-Sequenzen von Fusarium Pilzen erzielt werden konnte, wurden zusätzlich einer Recherche in der Datenbank des Broad Instituts³ unterzogen.

2.4.4. Quantitative Real-time PCR

Für die cDNA-Synthese für die quantitative Real-time PCR wurde das Revert Aid First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Leonrod) nach den Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden 2 ng der gleichen Gesamt-RNA eingesetzt, die auch für die cDNA-AFLPs verwendet wurde. Die Erststrangsynthese wurde bei 42 °C unter Verwendung eines oligo dT Primers in einem Reaktionsvolumen von 100 µl durchgeführt. Die cDNA wurde anschließend 1:5 in TE 0,1 Puffer verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die quantitative Real-time PCR wurde ein Reaktionsansatz, bestehend aus 3 µl cDNA, 11 µl Quanti Tect SYBR Green PCR Mix (Qiagen, Hilden) und jeweils 0,17 µM F- und R-Primer ad 22 µl H₂O, angesetzt.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>

² <http://blast.jcvi.org/euk-blast/index.cgi?project=tae1>

³ <http://www.broadinstitute.org/science/projects/fungal-genome-initiative/blast-similarity-search>

Die Bedingungen für die quantitative Real-time PCR im ABI 7000 Thermocycler waren wie folgt:

- 15 min 94 °C zur Aktivierung der Hotstart Polymerase
 - 15 sec Denaturierung bei 94°C
 - 60 sec kombinierte Primeranlagerung und Verlängerung bei 60°C
- } 40 Zyklen

Jede Reaktion wurde in 3 technischen Wiederholungen durchgeführt. Jedem Lauf war eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen, um mögliche unspezifische PCR-Reaktionen, Primerdimere oder die Verunreinigung mit genomischer DNA visualisieren zu können. Als Referenzgen diente Ubiquitin (Acc. Nr. in Genbank: X56601), das sowohl in inokulierten als auch in wasserbehandelten Proben eine gleichmäßige Expression zeigte. Die relative Quantifizierung erfolgte mit der delta delta Ct-Methode (Livack und Schmittgen 2001), wobei die wasserbehandelte Kontrolle des gleichen Genotyps und des gleichen Probenahmezeitpunktes als Kalibrator verwendet wurde.

Die Formel für die Berechnung der relativen Expression lautet: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

mit $\Delta\Delta Ct = ((Ct - Ct \text{ reference gene sample}) - (Ct \text{ target calibrator} - Ct \text{ reference gene calibrator}))$.

Die Standardgerade für die Berechnung der Effizienz der verwendeten Primer wurde mit verdünnter cDNA ($1e^{-1 \text{ bis } 4}$) durchgeführt und die Effizienz mit der Gleichung $E = (-1/\text{Steigung der Standardgerade})$ berechnet (Rasmussen et al. 2001).

Die Primer für die quantitative Real-time PCR wurden mit der Primer 3-Software (Rozen and Saletzky, 2000) gelegt. Die Sequenzen der verwendeten Primer und die Steigung der Standardgeraden sowie die Effizienz sind in der Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Liste der für die quantitative Real-time PCR verwendeten Primer mit Angabe der Steigung der Standardgerade einer cDNA-Verdünnungsreihe und der daraus resultierenden Effizienz der Primer

Fragment	Primer	Primer-Sequenz	Steigung (Standardgerade)	Effizienz
ubiquitin (X56601)	Ubiqu_x_2	F: tctccgtggtggggccagtaagct R: cacagaccagactccattggagga	-3,34	1,992
TDF_022	H022_x	F: taagtaccgctgctacca R: cgatcgatccttgattat	-3,2	2,054
Ta.97.1.S1_at	Ta.97.1_x_3	F: atggcgtcccacagtgc R: caagacagacggagctgtg	-3,5	1,93
Ta.97.2.S1_x_at	Ta.97.2_x_3	F: catggcgtccctggtag R: gacggagctgtgatga	-3,29	2,012
Ta.22732.1.S1_x_at	WIRII_x	F: ggtggccagcctaattaca R: tcgatccttgattgtttgac	-3,168	2,068
TDF_020	G020_x_2	F: gtacgtgaacggtgctcct R: ttcgactgggacttctcaac	-3,369	1,981
TDF_102	C102_x	F: ccatacagtggagccattt R: aggtccgccttacaattcc	-3,32	2,00
TDF_076	C076_2_x	F: acgggagtaggaggattgct R: atcgtcacggcttcaaattc	-3,29	2,01
TDF_032	S032_x	F: gcctgcacctacgactgtt R: agttggggtgatgaatcctg	-3,23	2,04
TDF_048	Sgram048_x_2_F	F: cctctattttgacagctcct R: ttgactacacctcaacagctt	-3,32	2,00

2.4.5. Markerentwicklung

2.4.5.1 Sequenzierung genomischer DNA

Eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit war es, differentiell exprimierte cDNA-AFLP Fragmente in die genetischen Karten von Winterweizenpopulationen zu integrieren um ihre Lage auf den Chromosomen mit der von bereits identifizierten QTL für Ährenfusarioseresistenz vergleichen zu können. Genetische Karten werden anhand von Spaltungsverhältnissen der einzelnen Marker errechnet. Für die genetische Kartierung müssen daher Polymorphismen in der Sequenz des zu kartierenden DNA-Abschnitts zwischen den Eltern der Kartierungspopulation vorhanden sein, aus denen Marker für die Genotypisierung der Populationslinien entwickelt werden können.

Um Polymorphismen zwischen den Eltern der einzelnen Kartierungseltern finden zu können, wurden Primer von den Sequenzen der TDFs - oder auch ESTs aus Datenbanken mit einer sehr guten Sequenzübereinstimmung zum TDF - abgeleitet und mit ihnen genomische DNA mindestens zweier Eltern amplifiziert. Neben den TDFs wurden auch Primer von drei *WIR1*-Sequenzen abgeleitet, die auf dem Wheat Affimetrix 61K Microarray geblottet sind, der von unseren Kooperationspartnern an der Universität Gießen verwendet wurde. Zwei der ausgewählten cDNA-Sequenzen sind als *WIR1a* annotiert (Ta.97.2.S1_x_at; Ta.22732.1.S1_at) und eine Sequenz als *WIR1b* (Ta.97.1.S1_at).

Die Primer wurden mit der Primer 3-Software (Rozen and Saletzky, 2000) oder manuell gelegt. Die Berechnung der theoretischen Annealingtemperatur der manuell gelegten Primer erfolgte gemäß der Formel von Rychlik und Rhoads (1989) ($T_m = 4 \times \text{Anzahl C oder G} + 2 \times \text{Anzahl T oder A}$ gelegt). Die Annealing-Temperatur, $MgCl_2$ -Konzentration und das PCR-Programm wurden für jeden Primer optimiert. Im Standard- PCR-Ansatz lagen die Reagenzien in folgender Konzentration in einem Gesamtvolumen von 60 μ l vor:

50 ng DNA, 1,5mM $MgCl_2$, 0,27 mM dNTPs, jeweils 0,17 μ M F + R-Primer, 1 x Reaktionspuffer (Thermo-Fisher, Großbritannien), 1,5 U Polymerase (Thermo-Fisher, Großbritannien).

Die Standardbedingungen der PCR, welche je nach Ansprüchen des Primers modifiziert wurden, waren wie folgt:

2 min Anfangsdenaturierung der DNA bei 95 °C

1 min Denaturierung bei 94 °C	} 35 Zyklen
1 min Primeranlagerung bei 60 °C	
1 min Primerverlängerung bei 72 °C	

10 min Fragmentverlängerung bei 72°C

Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer und deren optimale Annealing-Temperaturen.

Tabelle 3: Liste der Primer, die von TDFs zur Amplifikation von genomischer DNA abgeleitet wurden.

Falls der Primer von der Sequenz eines ESTs aus einer Datenbank mit sehr guter Sequenzhomologie zum jeweiligen TDF gelegt wurde, ist in der Spalte „Sequenz“ die Akzessionsnummer des ESTs angegeben, wenn die Primer direkt vom TDF abgeleitet wurden, ist der Name des TDFs angegeben

TDF	Name Primer	Tm opt	Größe Produkt	F-Primer	R-Primer	Sequenz
TDF_001	Dgram001_5	59	500	atccccaaggccaagaaacta	caatgtagcctccccctcat	CV775922
TDF_003	Dgram003_	59	über 1000	tcatgtccatacttacgaga	gatgccctcattcctcatt	TA84259_4565
TDF_005	Dgram005_3	62	750	gcagatcaatcttccgtcacttt	accagggtcaaaatccactact	TDF_005
TDF_009	Hgram009_2	59	700	cagaagtaccgtcatatccaa	taacctcgacgcagctcca	CJ679693
TDF_013	Ggram013_3	59	500	ctgcaggatcaaataccacca	gagaccctcatcaatcatctt	TDF_013
TDF_017	Dgram_017	59	230	gcaggattagaatttgcacaaa	ttgatgctgctaagagagtga	TDF_017
TDF_022	Hgram022	59	350	aggctctgggtgctttcga	taggagtataaggatgatgca	TDF_022
TDF_032	Ggram023_2	55	über 1000	gggatattgatgaagcact	gtttacggctgcctctt	TA75635_4565
TDF_024	Hgram024	59	über 1000	acctccctctctgctcaa	tcagaaggttctcatacca	TA63063_4565
TDF_027	Sgram027	53	120	ctgcaggctcttgccaagt	acatcccgaagtgttcaggt	TDF_027
TDF_028	Sgram028	53	350	tcctactagcagtgcaagcgca	cacagggtgaagccgatgt	BJ258087
TDF_029	Sgram029	53	150	ctgcagggccatcgagaagt	cctgaacaagaccgtaagaga	TDF_029
TDF_032	Sgram032_3	59	680,870	acatcatcagcggctaacccta	ctgtactgtcactggcttcac	TDF_032
TDF_038	Sgram038	59	650	aaccacatcgaattgggttga	tggtgatgtctcgtttgct	TA90835_4565
TDF_041	Sgram041	62	700	tgcaggacacaactctatccaa	taacgtcgcacggtatgt	TDF_041
TDF_042	Sgram042_2	55	150	ttccgagtcgctaccccaga	acatggatcgttcgccgaa	TDF_042
TDF_043	Sgram043_2_2	58	600	ggtgaggatctgggcccactta	acggcaggccacgtaatgt	TA76820_4565
TDF_045	Cgram045_2	60	150	caggcggatcctaattttca	aactagctgccacattagcaa	TDF_045
TDF_047	Sgram047	58	700	agcttatggcagtgctccaa	tggccttcaggaagacgaga	TA51075_4565
TDF_048	Sgram048_2	59	450	aacagcttcaggagctgga	gctgcaggatcatgagctgt	TDF_048
TDF_050	Sgram050_3	60	350	ggatgctgcaaaagtcacaa	aacgataaaaagcaccaaaagt	TDF_050

TDF	Name Primer	Tm opt	Größe Produkt	F-Primer	R-Primer	Sequenz
TDF_076	Cgram076_3	55	1400	caatggctggtgactgccta	gaaaggcaacaaactgaactga	TA100376_4565
TDF_087	Hgram087	62	600	agctccacatacctgaagcagag	actccactccttggtacttcac	TDF_087
TDF_090	Ggram090	62	200	aggtcacggtctccttgagttg	tggataaaaaaatgggttgaaga	TDF_090
TDF_091	Ggram091	62	150	atccttggtggtcaccaatcaaat	tggctatggaggagttggttatg	TDF_091
TDF_097	Dgram097	62	180	gcagggcacaagataacttca	tttgtgaccttcatcccacag	TDF_097
TDF_098	Dgram098	56	300	ctagccgtgtgggaacatca	ataacaagccaggagcggtct	TDF_098
TDF_101	Cgram101_2	65	300	atgcagcctaagcaacacatc	gtcagcgagaagatgatggag	TDF_101
TDF_102	Cgram102	55	300	gcaggcttatcggtagagagt	gctgtcctcacactgctggt	TDF_102
TDF_103	Sgram103	53	550	tgcaggacaccttcttatcc	aatgcagctgaccaccag	TDF_103
TDF_107	Sgram107_2	62	350	caaaagtcatcaaggccagaa	aacgataaaaggcaccaaaag	TDF_107
TDF_108	Sgram108	62	300	aggatgaactccaacacatgc	gcaggattgaaagggttttc	TDF_108
TDF_111	Sgram111	60	150	aggctcgacttttccgagtc	acctccaattggtgttgcac	TDF_111
TDF_112	Sgram112	62	200	gcagcaagcacatgaagactc	ttaacatgacacgatcctttct	TDF_112
TDF_114	Sgram114_2	62	120	cagggcaccaaattggttag	gccaaaccagcttcatgc	TDF_114
TDF_117	Sgram117	62	500	ggtatggaggtgttctgctg	gagcaaagccagaatactgcaa	TDF_117
TDF_118	Sgram118	52	100	aggtaggcgccgtagtagcat	cttgtttccccgctgatct	TDF_118
TDF_121	Sgram121	62	150	cagggactttcaagccgatatt	tagcagccgactacattgtgga	TDF_121
TDF_122	Sgram122	59	100	gatctggccggagtcgag	accaagagctgattatacctgaa	TDF_122
TDF_134	Sgram134_2	59	500	ccctctgctggcagtgac	taccaaagaaaaacacaaattca	CD910653

Die PCR mit den in Tabelle 3 angegebenen Primern erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 60 µl. Jeweils 2 PCR-Ansätze wurden gepoolt und mit dem QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Für den Fall, dass trotz der Optimierungsmaßnahmen Nebenprodukte auftraten, wurde das PCR-Produkt auf ein 2% Agarosegel aufgetragen, die Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gelextraktion Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die Sequenzierung des gereinigten PCR-Produkts wurde von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

Wenn innerhalb der Sequenz eines PCR-Produktes zwischen den Eltern von Kartierungspopulationen Polymorphismen auftraten, wurde je nach Art des Polymorphismus ein Marker für das TDF entwickelt, mit dem die Linien der Population genotypisiert werden konnten.

2.4.5.2 Insertions-Deletions-Polymorphismen

Bei Insertions-Deletions-Polymorphismen wurden die Primer von der spezifischen Sequenz abgeleitet, so dass die Polymorphismen im PCR-Produkt nach dem Auftrag auf einem Agarosegel (große Deletion) oder einem PAA-Gel (kleine Deletion) gut erkennbar sind. Auf Agarosegelen sind Deletionen > 50 Bp gut erkennbar und auf Polyacrylamid (PAA)-Gelen Deletionen > 4 Bp.

Im Standard- PCR-Ansatz lagen die Reagenzien in folgender Konzentration in einem Gesamtvolumen von 20 µl vor:

35 ng DNA, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, jeweils 0,5 µM F + R-Primer, 1 x Reaktionspuffer (Thermo-Fisher, Großbritannien), 0,5 U Polymerase (Thermo-Fisher, Großbritannien).

Die Standardbedingungen der PCR, welche je nach ansprüchen des Primers modifiziert wurden, waren wie folgt:

2 min Anfangsdenaturierung der DNA bei 95 °C
10 sec Denaturierung bei 94 °C
30 sec Primeranlagerung bei T_m (opt)
50 sec Primerverlängerung bei 72 °C
15 min Fragmentverlängerung bei 72°C

} 35 Zyklen

Tabelle 4: Übersicht über die Primer, die Annealing-Temperatur und die Produktlänge der verwendeten INDEL-Marker.

TDF	Primer	Primer-Sequenz	T _m (opt)	Gel
TDF_022	Hgram022	F: aggctctgggtgctttcga R: taggagtataaggtgatgca	59	PAA
TDF_032	Sgram032_3	F: acatcatcagcggctaacccta R: ctgtactgtcactggctccac	55	2% Agarose
TDF_076	Cgram076_4	F: taagtacatcgtcagggcttcc R: tggatggcattagtcgtaaa	60	PAA
	Cgram076_5	F: gaacaaattaaccccga R: ccatcatcttctccagcaca	60	PAA
	Cgram076_7	F: tcatgcagtggtgcttgatct R: ccattcacttgagcaacttc	60	PAA/ 2% Agarose

2.4.5.3 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Unterscheiden sich Sequenzen nur in einer einzelnen Base, spricht man von einem „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP). Es gibt mehrere Möglichkeiten der SNP-Detektion. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür entweder CAPS („Cleaved Amplified polymorphic sequence“) oder Pyrosequencing Marker entwickelt.

SNP-Detektion mit Pyrosequencing:

Die SNP-Genotypisierung für die polymorphen *WIRI*-Gene Ta.97.1.S1_at und Ta.97.2.S1_x_at erfolgte mit der Technik des Pyrosequencing (Qiagen, Hilden):

Mit dieser Methode wird ein kurzer Abschnitt der DNA, der den SNP enthält, sequenziert.

Zuerst wurde mit Hilfe der PSQ Assay design Software (Biotage, Schweden) ein F-Primer und ein R-Primer sowie ein Sequenzier-Primer generiert, der kurz vor dem SNP liegt. Je nachdem, welcher DNA-Strang sequenziert wird, muss entweder der F- oder der R-Primer am 5'-Ende biotinmarkiert sein.

Für die *WIRI*-Sequenz Ta.97.1.S1_at wurden folgende Primer (Biomers, Ulm) verwendet:

- F-Primer: ctctcttcgctgccatcg
- R-Primer (biotinmarkiert): ggaacagcagggacggttagg
- Sequenzier-Primer: tggttcccgtccag

Für Ta.97.2.S1_x_at wurden diese Primer verwendet:

- F-Primer: gtgcagcatgccccatct

- R-Primer (biotinmarkiert): tgtgctaaccaattacata
- Sequenzier-Primer: agattggtgcgtggcagtagat

Um ein möglichst sauberes Produkt zu erhalten, wurde eine PCR mit Hotstart Polymerase (Thermo Fisher, Großbritannien) durchgeführt. Der 50 µl Ansatz enthielt 40 ng gDNA, 1x High Performance Buffer, 0,2 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 µM jeweils des F- und R-Primers und 0,5 U der Hot Start Taq Polymerase (Thermo Fisher, Großbritannien).

Die PCR wurde mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

- 15 min Denaturierung und Aktivierung der Hotstart Polymerase bei 94°C
 - 30 sec Denaturierung bei 94°C
 - 30 sec Primeranlagerung bei 60°C (-0.5°C/ Zyklus)
 - 1 min Primerverlängerung bei 72°C
 - 30 sec Denaturierung bei 94°C
 - 30 sec Primeranlagerung bei 55°C
 - 1 min Primerverlängerung bei 72°C
 - 3 min Fragmentverlängerung bei 72 °C
- } 10 Zyklen
- } 35 Zyklen

Das Pyrosequencing mit dem Pyro Gold Regents Kit (Qiagen, Hilden) wurde nach den Herstellerangaben mit dem PSQ 96MA 2.1 System (Biotage, Schweden) durchgeführt.

Entwicklung von CAPS-Markern:

Für die Entwicklung von CAPS-Markern muss der SNP innerhalb der Schnittstelle eines Restriktionsenzym liegen. Für das polymorphe TDF_103 wurde ein CAPS-Marker zur Genotypisierung der Linien der Population Solitär/Travix entwickelt. Dabei wurde zuerst eine PCR mit TDF_103 spezifischen Primern (Tabelle 3) und der Annealing-Temperatur 53 °C durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt für 2 Stunden bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *TaqI* verdaut. Das Enzym schneidet das Produkt entweder 17 Mal, wobei kein Fragment > 70 Bp entsteht, oder nur 16 Mal, wobei ein Fragment von 130 Bp entsteht. Der Restriktionsverdau wurde auf einem 2% igem Agarosegel aufgetragen. Dabei war nur das Fragment der Größe von 130 Bp als Bande im Gel deutlich zu sehen.

2.4.5.4 Polymorphismus in der Primerbindungsstelle

Für das *WIRI*-Genfragment Ta.22732.S1_at wurden drei verschiedene Primer abgeleitet, um einen PCR-Marker für die Genotypisierung der Linien der Population Dream/Lynx zu erhalten. Eine PCR mit dem Primerpaar WIRII_2 (F-Primer: tagctgcctagctcccaaag, R-Primer:

cgatccttgcatgttttga; T_m : 60°C) ergab bei Annealingtemperaturen von 52-62°C mit gDNA von Lynx ein PCR-Produkt von 460 Bp, jedoch nicht mit gDNA von Dream. Bei der Testung der Linien der Population Dream/Lynx mit diesem Primerpaar ergab, dass bei ca. 50% der Linien das PCR-Produkt amplifiziert wurde. Bei einer Wiederholung der PCR-Reaktion zeigten die gleichen Linien die Bande bei 460 Bp, wie im ersten Versuch. Um den zu Grunde liegenden Sequenz-Polymorphismus aufdecken zu können und auch die Sequenz von Dream zu erhalten, wurden das Primerpaar WIRII_3 (F-Primer: ctagctgcctagctcccaaa, R-Primer: ttagtcccccttgagcttt; T_m : 60°C) von der Sequenz Ta.22732.S1_at abgeleitet, mit dem ein größeres Produkt als das von WIRII_2 amplifiziert werden sollte, sowie das Primerpaar WIRII_4 (F-Primer: ccctccaagctccaatcata, R-Primer: tcgatccttgcatgtttt; T_m : 60°C), mit welchem ein kleineres Fragment amplifiziert wird. Eine PCR mit dem Primerpaar WIRII_3, dessen Primerbindungsstellen außerhalb der Primerbindungsstellen des Primers WIRII_2 liegen, liefert bei dem Einsatz von genomischer DNA von Lynx ein PCR-Produkt, nicht aber wenn genomische DNA von Dream eingesetzt wird. Das Primerpaar WIRII_4, das innerhalb der beiden getesteten Primer gelegt wurde, amplifiziert sowohl mit genomischer DNA von Lynx, als auch von Dream ein Produkt, das nach der Sequenzierung 100% Sequenzhomologie zu dem PCR-Produkt besitzt, das mit den Primern WIRII_2 und genomischer DNA von Lynx gewonnen wurde. Innerhalb dieses Abschnittes zeigen sich keine Polymorphismen in der DNA von Dream und Lynx. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass sich innerhalb der Primerbindungsstelle der Primer WIRII_2 ein Sequenzpolymorphismus zwischen Dream und Lynx befindet, wobei es sich wahrscheinlich um eine größere Insertion handelt.

Eine PCR mit einem ersten Primerpaar, das von der Sequenz von TDF_102 (putatives Cytochrom P450) abgeleitet wurde (Primer: Cgram102, siehe Tabelle 3), ergab bei getesteten Annealing-Temperaturen von 52-62 °C nur bei dem Einsatz gDNA von Capo als Template ein PCR-Produkt von ca. 200 Bp. Dieses PCR-Produkt stimmt in seiner Sequenz mit der von TDF_102 überein. Beim Einsatz von genomischer DNA von SVP72017 als Template konnte mit diesen Primern trotz weiterer PCR-Optimierungsmaßnahmen kein Produkt erzielt werden. Die Amplifikation von genomischer DNA mit einem Primerpaar (Cgram102_x, Tabelle 2), das innerhalb des ersten Primerpaares liegt, zeigte, dass dort bei allen getesteten Genotypen ein PCR-Produkt von 110 Bp erzielt werden konnte. Es wird daher angenommen, dass in der Primerbindungsstelle von Cgram102 ein Sequenzpolymorphismus zwischen SVP72017 und Capo bestehen muss.

2.5. Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen erfolgten mit SAS Version 9.1 (SAS Institut 2004). Die Varianzanalyse der befallenen Ährchen 3 bis 6 Tage nach der Inokulation wurden mit der Prozedur PROC GLM durchgeführt und ein Scheffe-Test ($p < 0.05$) angeschlossen. Für die statistische Bewertung des Einflusses des Markers C076_4 auf den mittleren Fusariumbefall von 163 Sorten über vier Umwelten wurde ebenfalls eine Varianzanalyse und ein Scheffe-Test ($p < 0,05$) durchgeführt.

Für die Varianzanalyse der befallenen Ährchen 18 bis 21 Tage nach der Inokulation wurde die Prozedur NPAR1WAY (Wilcoxon-Rangnummern-Test) verwendet, da die Daten nicht normal verteilt waren.

2.6. Kartierung der Genfragmente und QTL-Analyse

Aufgrund ihrer Polymorphismen konnten TDF_022, TDF_032, TDF_076, TDF_102 sowie die *WIRI*-Gene Ta.97.1.S1_at, Ta.97.2.S1_x_at. und Ta.22832.1.S1_x_at in die genetischen Karten der Populationen Dream/Lynx (Schmolke et al. 2005), G16-92/Hussar (Schmolke et al. 2008), History/Rubens und Solitär/Travix (Holzapfel et al. 2008) sowie in die Population Sng3559/SVP72017 (J. Groth, persönliche Mitteilung) rückkartiert werden. Von den Populationen G16-92/Hussar und Dream/Lynx wurden bereits in 4 Umwelten phänotypische Daten für Fusarium-Resistenz, Wuchshöhe, Ährenschieben und Ährendichte erhoben und damit QTL-Analysen durchgeführt (Schmolke et al. 2005, 2008). Für die Population SVP72017/Capo steht hingegen keine genetische Karte zur Verfügung. Differentiell exprimierte TDFs, die zwischen diesen Eltern Sequenzpolymorphismen aufwiesen, wurden zunächst in die Populationen History/Rubens oder Solitär/Travix (Holzapfel et al. 2008) rückkartiert. Die EST-Marker konnten zudem in den QTL-Karten der Populationen Sng3559/SVP72017 und Inspiration/SVP72017 validiert werden (J. Groth, persönliche Mitteilung).

Für die Kartierung wurde das Programm JoinMap 3.0 (Plant Research International BV, Wageningen) verwendet. Dabei wurde der LOD-treshold > 3.0 für die Gruppierung von Kopplungsgruppen gesetzt und die Haldane-Funktion für die Berechnung der Distanzen verwendet. Diese Einstellungen entsprechen denen, die für die Berechnung der Original-Karten verwendet wurden (Schmolke et al. 2005, 2008, Holzapfel et al. 2008).

Für die Chromosomen 2BS der Population History/Rubens und 7BS der Population Dream/Lynx wurde zudem ein „Single Intervall Mapping“ mit PLABQTL Version 1.1 (Utz und Melchinger 1996) durchgeführt, da dort Marker in QTL-Intervalle kartierten und daher die Intervalle neu berechnet wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Inokulation und Resistenztest

Die Ähren der Weizengenotypen G16-92, Hussar, Dream, Lynx, SVP72017 und Capo wurden unter Anwendung einer Einzelblüteninokulationsmethode mit Konidien von *F. graminearum* inokuliert, um eine spezifische Abwehrreaktion gegen diesen Pilz zu induzieren. Um die Virulenz des Inokulums zu prüfen und sicherstellen zu können, dass keine Übertragung von *F. graminearum*-Konidien auf mock-behandelte Ähren stattfand, wurde jeweils mindestens eine inokulierte sowie eine mock-behandelte Ähre jedes Inokulationstages während eines Zeitraums von drei Wochen beobachtet. Diese Verlaufskontrollen zeigen, dass bei inokulierten Ähren immer die typische Symptome einer Ährenfusariose auftraten, und somit das Inokulum an jedem Tag virulent war. In keiner der mit Wasser behandelten Kontrollähren konnten hingegen Symptome beobachtet werden.

Im Anschluss an die Inokulation von G16-92, Hussar, Dream und Lynx zur Expressionsanalyse wurden die Verlaufskontrollen - wie bereits oben beschrieben - lediglich daraufhin untersucht, ob Symptome der Ährenfusariose vorhanden sind. Um eine genauere Aussage über die Resistenz dieser Genotypen treffen zu können, wurden die Ähren in einem zweiten Versuch zu Blühbeginn mit Makrokonidien von *F. graminearum* inokuliert und anschließend im Abstand von zwei bis drei Tagen bonitiert. Ähren von SVP72017 und Capo wurden direkt im Anschluss an die Inokulation für die Expressionsanalyse im Abstand von zwei bis drei Tagen bonitiert. Dabei wurden die Symptome an den direkt inokulierten Blüten und an den Ährchen unterhalb der Infektionsstelle festgehalten.

Innerhalb der ersten drei bis sechs Tage nach der Inokulation mit *F. graminearum* unterschieden sich die untersuchten Genotypen nach der Anwendung einer Varianzanalyse und des Scheffe-Tests (Scheffe $<0,05$) nicht signifikant in der Anzahl befallener Blüten.

Um die Ausbreitungsresistenz bewerten zu können, wurde die Anzahl der infizierten Ährchen unterhalb der Infektionsstelle im Zeitraum von 18 bis 21 Tagen nach der Inokulation festgehalten. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich der Pilz in den anfälligen Genotypen bereits stark innerhalb der Ähre ausgebreitet. Die resistenten und anfälligen Eltern der Populationen unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Ausbreitungsresistenz (Abb. 5). Diese Unterschiede sind nach der Anwendung des Wilcoxon-Rangnummern-Tests signifikant. G16-92 zeigte nach 18 bis 21 Tagen im Mittel 1,1 Ährchen und Hussar 6,8 Ährchen Ausbreitung

nach unten (Abb. 5a). Bei Dream waren durchschnittlich 2,7 Ährchen unterhalb der Infektionsstelle infiziert und bei Lynx 6,8 (Abb. 5b). SVP72107 zeigte zum gleichen Zeitpunkt 1,8 Ährchen und Capo 9 Ährchen Ausbreitung (Abb. 5c). Bei allen resistenten Eltern gab es jedoch vereinzelte Ähren, in denen sich der Pilz stark ausbreiten konnte. Das Muster der Ausbreitung von *F. graminearum* in Ähren von SVP72017 unterschied sich stark von dem in Ähren von G16-92 und Dream. In letzteren breitete sich die Infektion langsam von einer infizierten Blüte auf das ganze Ährchen und anschließend basipetal nacheinander von einem Ährchen auf das andere aus. In 65% der Ähren von SVP72017 hingegen blieb die Infektion über den gesamten Beobachtungszeitraum von 21 Tagen auf eine Blüte oder ein Ährchen beschränkt. Auffällig war eine zudem eine starke lokale Verbräunung der Rachilla, die in anderen Genotypen nicht beobachtet werden konnte. Bei 14 % der inokulierten Ähren von SVP72017 verbräunte die gesamte Rachis und ab ca. 18 Tage nach der Inokulation trockneten alle Ährchen auf einmal ab. Diese Ähren wurden mit der maximalen Anzahl von 10 befallenen Ährchen klassifiziert

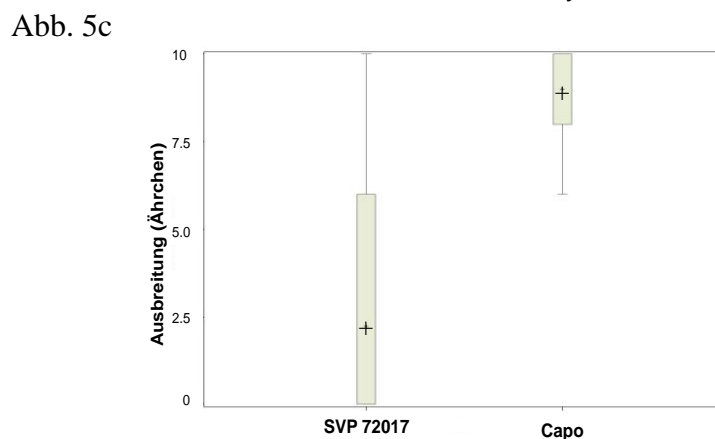
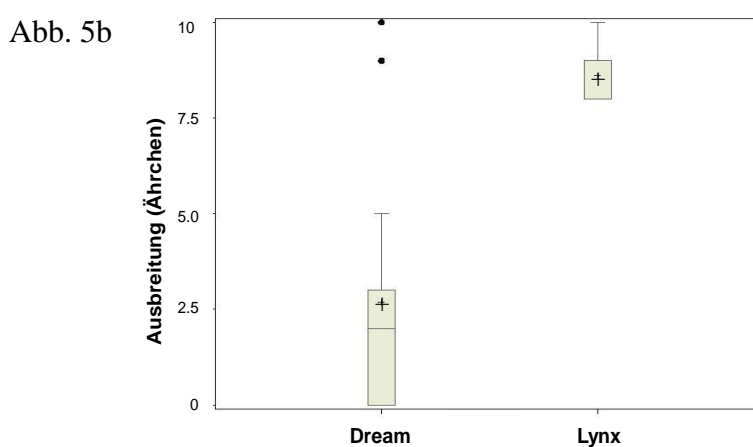
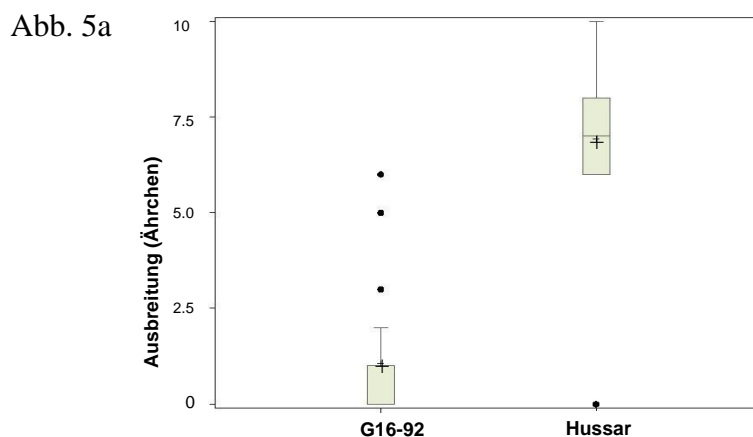


Abb. 5: Ausbreitung von *F. graminearum* innerhalb der Weizenähren.

5a: Ausbreitung in G16-92 und Hussar, 5b: Ausbreitung in Dream und Lynx, 5c: Ausbreitung in SVP72017 und Capo

Die Anzahl der infizierten Ährchen, die sich unterhalb der Infektionsstelle befinden, wurde 18 bis 21 Tage nach der Einzelblüteninokulation mit einer Makrokonidien suspension des Pathogens *F. graminearum* festgehalten. (Legende: Durchgezogene Linie: Median, +: Mittelwert)

Die Unterschiede in der Ausbreitung zwischen den jeweiligen Eltern einer Kartierungspopulation sind nach dem Wilcoxon-Rangnummern-Test signifikant.

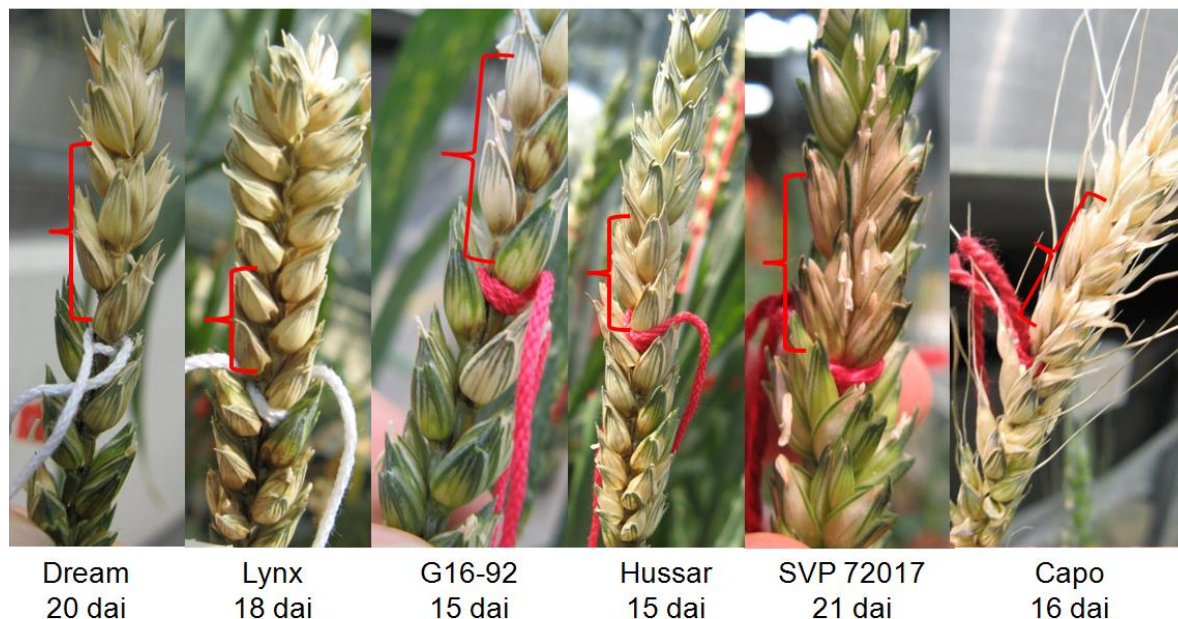


Abb. 6: Beispiele für die Unterschiede in der Ausbreitungsresistenz zwischen den untersuchten Genotypen

Die Ähren wurden jeweils zur Anthese mit *F. graminearum* infiziert. Die roten Klammern markieren den Bereich der inokulierten Blüten. Infizierte Ährchen unterhalb dieser Stelle werden als Ausbreitung gewertet.

3.2. Expressionsanalyse

3.2.1. cDNA-AFLP-Analyse

Die cDNA-AFLP-Analysen der Genotypen Dream, Lynx, G16-92 und Hussar wurden mit den Enzymsystemen *PstI/MseI* und *Sse8387I/MseI* mit jeweils 30 Primerkombinationen durchgeführt. Da bei AFLPs mit dem Enzymsystem *Sse8387I/MseI* lediglich zwei differentiell exprimierte Banden gefunden werden konnten, wurden bei SVP72017 und Capo nur cDNA-AFLP-Analysen mit *PstI/MseI* durchgeführt, ebenfalls mit 30 Primerkombinationen. cDNA-AFLP mit *PstI/MseI* lieferten durchschnittlich 85 Banden und mit *Sse8387I/MseI* ca. 55 Banden pro Gel. Insgesamt wurden bei Dream, Lynx, G16-92 und Hussar ca. 4000 Banden und bei SVP72017 und Capo ca. 2500 Banden hinsichtlich der differentiellen Expression untersucht (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der cDNA-AFLP-Analysen

Genotyp	Sse8387I/MseI	PstI/MseI	Anzahl Banden	sequenzierte TDFs
G16-92	x	x	ca. 4000	21
Hussar	x	x	ca. 4000	13
Dream	x	x	ca. 4000	11
Lynx	x	x	ca. 4000	3
SVP72107		x	ca. 2500	37
Capo		x	ca. 2500	16

Insgesamt wurden 101 differentiell exprimierte cDNA-AFLP-Fragmente aus dem PAA-Gel ausgeschnitten, kloniert und von jedem Fragment jeweils 3 Klone sequenziert. Dabei wurde z.T. das gleiche TDF in verschiedenen Genotypen ausgeschnitten. Daher ist die Anzahl der TDFs in Tabelle 6 geringer als die Anzahl der sequenzierten Fragmente. Insgesamt stammen 8 TDFs vom Pilz *F. graminearum*.

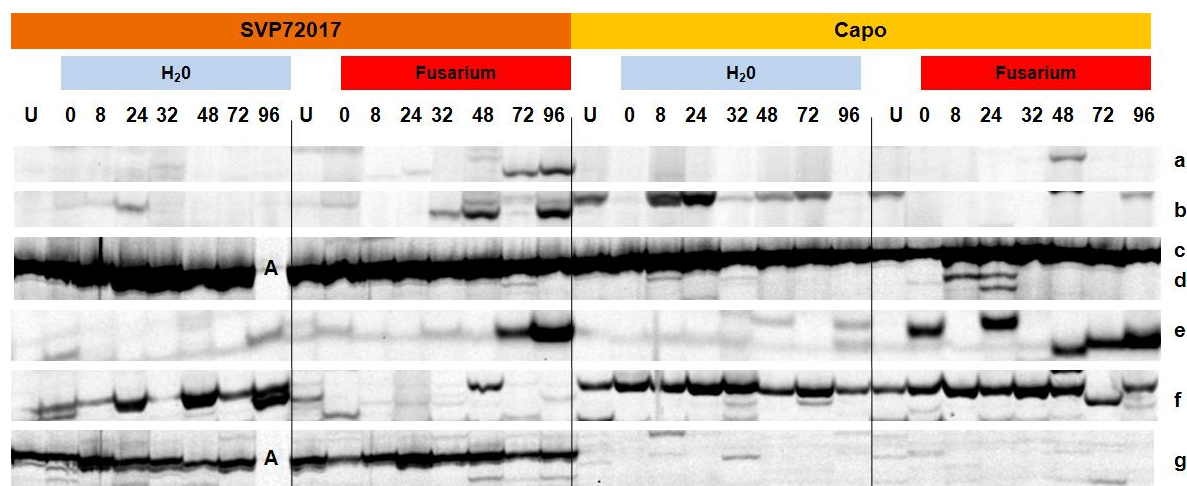


Abb. 7: Beispiele für verschiedene Expressionsmuster von TDFs in AFLPs von SVP72017 und Capo nach der Behandlung mit Wasser (H₂O) oder einer Makrokonidien suspension von *F. graminearum* (Fusarium) im Zeitraum von 0 bis 96 Stunden nach der Inokulation

„U“ bezeichnet eine unbehandelte Kontrollähre zum Zeitpunkt der Anthese.

(Legende: a = späte Hochregulierung im resistenten Genotyp, b = mittlere Hochregulierung im resistenten Genotyp, c = konstitutive Bande in beiden Genotypen, d = frühe Hochregulierung im anfälligen Genotyp, e = in beiden Eltern hochreguliert, f = im resistenten Elter herunterreguliert, g = genotypspezifische Bande, A= Ausfall im cDNA-AFLP,)

3.2.2. Ergebnisse der BLAST-Analysen

Die Tabellen 6 und 7 zeigen eine Übersicht über die differentiell exprimierten TDFs nach der Infektion mit *F. graminearum*. Die Sequenzen der TDFs wurden einer BLAST-Analyse in den Datenbanken von NCBI (non-redundant (nr) und EST-Datenbank) und TIGR (wheat database: *Triticum aestivum* transcript assemblies) unterzogen. In Tabelle 6 wurden die Fragmente hinsichtlich ihres Expressionsmusters in der cDNA-AFLP-Analyse eingeteilt. TDFs, bei denen BLAST-Treffer mit Genen bekannter Funktion mit einem E-value kleiner als $e-05$ gefunden wurden, wurde der beste BLAST-Treffer eines bekannten Gens aufgeführt. Bei allen anderen TDFs wird der Treffer mit dem kleinsten E-value angegeben. Die BLAST-Ergebnisse beziehen sich grundsätzlich auf die Resultate, die mit BLAST N erzielt wurden. Ergebnisse, die mit BLAST X erzielt wurden, sind in der Tabelle 1 mit (X) gekennzeichnet.

Tabelle 6: Liste der sequenzierten TDFs mit dem jeweiligen besten BLAST-Ergebnis und dem E-value.

Gelb unterlegte TDFs werden 0-24 hai, türkis unterlegte 32-48 hai und pink unterlegte TDFs 72-96 hai zum ersten Mal reguliert.

Von den mit * gekennzeichneten TDFs konnten genomische Sequenzen gewonnen werden.

Im resistenten Elter nach der Inokulation mit <i>F.graminearum</i> im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert						
TDF	Primer	Genotyp	Größe (Bp)	BLAST-Ergebnis		E-value
TDF_001*	P65M54	Dream	182	NM00193922	<i>Zea mays</i> , spindle and kinetochore-ass. Protein 1 homolog	4.0e-22
TDF_005*	S23M48	Dream	557	CV065800	<i>Triticum aestivum</i> , EST	8.0e-05
TDF_023*	P64M58	G16-92	188	DQ923395.1	<i>Triticum aestivum</i> , LUE1 protein	8.0e-63
TDF_030	P72M60	SVP	168	TA84503_4565	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Similarity to glucoserelated supressor protein	1.2e-28
TDF_031	P72M60	SVP	165	BQ608584	<i>Triticum aestivum</i> , Ribosomal protein 117	7.5e-24
TDF_032*	P76M52	SVP	302	CJ595840	<i>Triticum aestivum</i> , EST (Stress response library)	1.3e-17
TDF_033	P76M52	SVP	203	BAD25014	<i>Oryza sativa</i> , putative coatomer complex subunit beta 2 (X)	7.0e-16
TDF_034	P76M52	SVP	187	BQ802767	<i>Triticum aestivum</i> , EST	7.2e-92
TDF_040	P72M60	SVP	170	X91347	<i>Hordeum vulgare</i> , UDP-glucose uridylyltransferase	4.0e-41
TDF_042*	P70M50	SVP	208	CD879307	<i>Triticum aestivum</i> , EST	2.8e-07
TDF_048*	P66M49	SVP	413	FJ535237	<i>Triticum aestivum</i> , UDP-Glycosyl transferase cultivar Wangshuibai	0
TDF_093	P66M55	Dream	237	ACG33621	<i>Zea mays</i> , ubiquitin-like protein SMT3 (X)	3.0e-21
TDF_107*	P66M55	SVP	337	EU965935	<i>Zea mays</i> , ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isoenzyme L3 mRNA	1.0e-24
TDF_108*	P66M55	SVP	376		unknown	
TDF_118*	P75M53	SVP	110		unknown	
TDF_013*	P66M49	G16-92	293	100281697	<i>Zea mays</i> , LOC 100281697 Ubiquinone biosynthesis ubiB	2.0e-99
TDF_017*	P66M55	G16-92	249		unknown	
TDF_019	P70M58	G16-92	319	CJ666769	<i>Triticum. aestivum</i> , EST	5.0e-123
TDF_020	P74M53	G16-92	145	DR740066	<i>Triticum aestivum</i> , putative lipid transfer protein	3.3e-27
TDF_088	P72M60	G16-92	583	EU960877	<i>Zea mays</i> , 40S ribosomal protein S9 mRNA	0
TDF_006	P65M54	G16-92	227	AF542974.1	<i>Triticum aestivum</i> , Emr1 m RNA, complete cds	1.97e-29
TDF_016	P66M55	G16-92	245	DQ003612	<i>Agropyron crisatum</i> , pyrroline-5-carboxylate synthase mRNA	1.2e-64
TDF_029*	P72M60	SVP	187	GQ165812	<i>Triticum aestivum</i> , BAC clone 205008 chromosome 4BL	5.0e-78
TDF_041*	P64M58	SVP	315	CJ521041	<i>Triticum aestivum</i> , EST (Stress response library)	2.0e-13
TDF_103*	P64M58	SVP	330	CD902327	<i>Triticum aestivum</i> , EST	2.8e-116
TDF_010	P65M54	G16-92	164	FGSG_07141.3	<i>Gibberella zeae</i> , importin subunit alpha	0
TDF_025	P64M58	SVP	277	FGSG_13336.2	<i>Gibberella zeae</i> , conserved hypothetical protein	0

Im im resistenten Elter nach der Inokulation mit <i>F. graminearum</i> im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert						
TDF	Primer	Genotyp	Größe (Bp)	BLAST-Ergebnis		E-value
TDF_024*	P72M60	G16-92	145	TA63063_4565	<i>Triticum aestivum</i> , Spermidine Synthase 1	8.3e-22
TDF_049	P66M55	SVP	360	CJ647709	<i>Triticum aestivum</i> , EST	2.0e-99
TDF_090*	P76M52	G16-92	157		unknown	
TDF_091*	P78M56	G16-92	428	CD9000558	<i>Triticum aestivum</i> , EST	0
TDF_134*	P77M51	SVP	140	CD910653	<i>Triticum aestivum</i> , EST	7.0e-72
Im anfälligen Elter nach der Inokulation mit <i>F. graminearum</i> im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert						
TDF	Primer	Genotyp	Größe (Bp)	BLAST-Ergebnis		E-value
TDF_045*	P69M59	Capo	142	BQ471108	<i>Hordeum vulgare</i> , EST	1.0e-13
TDF_064	P64M58	Capo	497	DQ923395.1	<i>Triticum aestivum</i> , LUE1 protein	9.0e-73
TDF_066	P70M58	Capo	309	TA97357_4565	<i>Triticum aestivum</i> , EST	3.1-63
TDF_076*	P75M53	Capo	336	TA100375_4565	<i>Oryza sativa</i> , NPR1-like protein	5.1e-49
TDF_085	P73M60	Capo	308	AJ610294	<i>Triticum turgidum</i> EST	6.0e-124
TDF_102*	P70M58	Capo	308	EU963212	<i>Zea mays</i> , cytochrome P450 CYP709H1 mRNA	3.0e-08
TDF_123	P70M50	Capo	253	EU957942	<i>Zea mays</i> , Nitrilase associated protein	1.0e-36
TDF_124	P70M50	Capo	250		unknown	
TDF_008	P65M54	Hussar	310	TA76669_4565	<i>Triticum aestivum</i> , NADPH-thioredoxin reductase	1.2e-62
TDF_009*	P65M54	Hussar	461	NP_001050367	<i>Oryza sativa</i> , COBRA-like protein 2 (X)	6.0e-71
TDF_135	P66M49	Hussar	134	CJ679452	<i>Triticum aestivum</i> , EST	6.0e-0.5
TDF_011	P65M54	Hussar	523	CK153346	<i>Zea mays</i> , Adenosine kinase	5.9e-111
TDF_018*	P70M58	Hussar	309	CJ666769	<i>Triticum aestivum</i> , EST	4.0e-107
TDF_047*	P74M53	Capo	600	AK335458	<i>Triticum aestivum</i> , EST	0
TDF_075	P70M50	Capo	336	TA59938_4565	<i>Oryza sativa</i> , Putative heat shock protein HSP 70	7.5e-65
TDF_101*	P70M58	Capo	343	TA77479_4565	<i>Triticum aestivum</i> , putative Cytochrom P450	2.5e-66
TDF_121*	P71M59	Capo	241	CA658787	<i>Triticum aestivum</i> , EST	1.2e-102
TDF_122*	P71M59	Capo	145	CK210090	<i>Triticum aestivum</i> , EST	7.2e-35
TDF_126	P78M56	Capo	411	BQ483615	<i>Triticum aestivum</i> , EST	0

In beiden Eltern nach der Inokulation mit <i>F. graminearum</i> im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert						
TDF	Primer	Genotyp	Größe (Bp)	BLAST-Ergebnis		E-value
TDF_003*	S14M51	Dream, Lynx	272	TA84259_4565	<i>Triticum aestivum</i> , 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	3.0e-55
TDF_027*	P70M58	SVP, Capo	171	AF326781	<i>Triticum monococcum</i> , BAC clone	2.6e-34
TDF_043*	P78M56	SVP, Capo	282	AM502866	<i>Triticum aestivum</i> , MIKC-type MADS-box transcription factor	3.0e-139
TDF_044	P69M59	SVP;Capo	151		unknown	
TDF_051	P70M58	SVP, Capo	167	BJ310174	<i>Triticum aestivum</i> , EST	2.0e-13
TDF_098*	P72M59	Dream, Lynx	365	CJ939501	<i>Triticum aestivum</i> , EST	
TDF_110	P69M59	SVP, Capo	151	FJ904941	<i>Secle cereale</i> , BAC clone	9.0e-19
TDF_111*	P70M50	SVP, Capo	208	CD879307	<i>Triticum aestivum</i> , EST	3.0e-07
TDF_112*	P70M50	SVP, Capo	204	CV780442	<i>Triticum aestivum</i> , EST	2.6e-109
TDF_135	P69M59	G16-92, Hussar	505	X58394	<i>Triticum aestivum</i> , mRNA for Thaumatin-like protein	0
TDF_136	P69M59	G16-92, Hussar	513	CV777807	<i>Triticum aestivum</i> , EST	0
TDF_065	P70M58	SVP, Capo	328		unknown	
TDF_035	P76M52	SVP, Capo	184	DV487417	<i>Brachypodium distachium</i> , EST	6.1e-14
TDF_092	P64M58	Dream, Lynx	263		unknown	
TDF_114*	P72M60	SVP, Capo	146	AF347064	<i>Triticum aestivum</i> , sucrose phosphate synthase	3.0e-66
TDF_132	P76M52	SVP, Capo	260	U7686	<i>Triticum aestivum</i> , beta tubulin5 (Tubb5) mRNA	2.0e-78
TDF_038*	P66M51	SVP, Capo	204	BE423469	<i>Triticum aestivum</i> , EST (Endosperm library)	3.6e-39
TDF_104	P66M51	SVP, Capo	255	CJ578951	<i>Triticum aestivum</i> , EST	2.1e-36
TDF_105	P66M51	SVP, Capo	257	DR733830	<i>Triticum aestivum</i> , EST	1.3e-31
TDF_117*	P74M53	SVP, Capo	646	DY761352	<i>Triticum aestivum</i> , EST	0
TDF_137	P72M60	Dream, Lynx	142	CJ719569	<i>Triticum aestivum</i> , EST	1.6e-26
TDF_138	P72M60	Dream, Lynx	156	AF347066	<i>Triticum aestivum</i> , truncated sucrose-phosphate synthase 4 mRNA	6.0e-58
TDF_015	P66M55	G16-92, Hussar	521	FGSG_02141.3	<i>Gibberella zeae</i> , predicted protein	0
TDF_036	P76M52	SVP, Capo	102	FGSG_002446.2	<i>Gibberella zeae</i> , conserved hypothetical protein	2.2e-29
TDF_037	P66M55	SVP, Capo	252	FGSG_10503.2:	<i>Gibberella zeae</i> , hypothetical protein similar to SNF7 family protein	0
TDF_089	P72M60	G16-92, Hussar	144	FGSG_05183.3	<i>Gibberella zeae</i> , glutathione reductase	0
TDF_133	P76M52	G16-92, Hussar	265	XM387394	<i>Gibberella zeae</i> , PH1 hypothetical protein	7.4e-144
TDF_165	P66M51	G16-92, Hussar	272	FOXG_04919.2	<i>Fusarium oxysporum</i> , charged multivesicular body protein	0
TDF_166	P64M58	G16-92, Hussar	266	FGSG_10320.3	<i>Gibberella zeae</i> , methionine aminopeptidase	0

Genotypspezifische Banden						
TDF	Primer	Genotyp	Größe (Bp)	BLAST-Ergebnis		E-value
TDF_046	P69M59	SVP, Capo	89	AY679115	<i>Triticum aestivum</i> , Gigantea 3	4.9e-37
TDF_022*	P70M50	Hussar	366	X87686	<i>Triticum aestivum</i> , mRNA for WIR1, pathogen defense protein	6.9e-86
TDF_086	P70M50	G16-92, Dream	428	BADS1322	<i>Oryza sativa</i> , Target of myb-like (X)	3.0e-11
	P70M50	Hussar, Lynx	414			
TDF_095*	P72M20	Dream, G16-92	252	CJ820422	<i>Triticum aestivum</i> , EST	2.9e-26
TDF_096	P72M20	Dream	253	EEF41115	<i>Ricinus communis</i> , importin beta-2 putative (X)	1.0e-31
		Dream, G16-92,				
TDF_097*	P72M20	Lynx	254	CK165903	<i>Triticum aestivum</i> , EST	4.1e-71
TDF_113	P72M20	SVP	253	CJ631508	<i>Triticum aestivum</i> , EST	1.0e-124

Tabelle 7: Zuordnung von TDFs mit Ähnlichkeit zu Genen mit bekannter Funktion in funktionale Gruppen. Die Einteilung erfolgte mittels Literaturrecherche.

Gelb unterlegte TDFs werden 0-24 hai, türkis unterlegte 32-48 hai und pink unterlegte TDFs 72-96 hai zum ersten Mal reguliert

TDF	BLAST	E-value
Stress		
TDF_008	TA76669_4565 <i>Triticum aestivum</i> , NADPH-thioredoxin reductase	1,2e-62
TDF_016	DQ003612 <i>Agropyron crisatum</i> , pyrroline-5-carboxylate synthase mRNA	1.2e-64
TDF_075	TA59938_4565 <i>Oryza sativa</i> , Putative heat shock protein HSP 70	7.5e-65
TDF_024	TA63063_4565 <i>Triticum aestivum</i> , Spermidine synthase	8.3e-22
Abwehr		
TDF_101	TA77479_4565 <i>Triticum aestivum</i> , putative Cytochrom P450	2.5e-66
TDF_102	EU963212 <i>Zea mays</i> , cytochrome P450 CYP709H1 mRNA	3e-08
TDF_135	X58394 <i>Triticum aestivum</i> , mRNA for Thaumatin-like protein	0
TDF_020	DR740066 <i>Triticum aestivum</i> , putative lipid transferprotein	3.3e-27
TDF_022	X87686 <i>Triticum aestivum</i> , mRNA for WIR1, pathogen defense protein	6.9e-86
Signaltransduktion		
TDF_043	AM502866 <i>Triticum aestivum</i> , MIKC-type MADS-box transcription factor	3e-139
TDF_046	AY679115 <i>Triticum aestivum</i> , Gigantea 3	4.9e-37
TDF_076	TA100375_4565 <i>Triticum austivum</i> , NPR1-like protein	5.1e-49
TDF_006	AF542974.1 <i>Triticum aestivum</i> , Emr1 m RNA, complete cds	1.97e-29
Zellzyklus, Zytoskelett, Zellwandsynthese		
TDF_001	NM00193922 <i>Zea mays</i> , spindle and kinetochore-ass. Protein 1 homolog	4e-22
TDF_003	TA84259_4565 <i>Triticum aestivum</i> , 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	3e-55
TDF_023	DQ923395.1 <i>Triticum aestivum</i> , LUE1 protein	8e-63
TDF_064	DQ923395.1 <i>Triticum aestivum</i> , LUE1 protein	9e-73
TDF_132	U7686 <i>Triticum aestivum</i> , beta tubulin5 (Tubb5) mRNA	2e-78
TDF_009	NP_001050367 <i>Oryza sativa</i> , COBRA-like protein 2 (X)	6e-71
TDF_096	EEF41115 <i>Ricinus communis</i> , importin beta-2 putative (X)	1e-31
Transport		
TDF_033	BAD25014 <i>Oryza sativa</i> , putative coatomer complex subunit beta 2 (X)	7e-16
Glycosyltransferasen		
TDF_040	X91347 <i>Hordeum vulgare</i> , UDP-glucose uridylyltransferase	4e-41
TDF_048	FJ535237 <i>Triticum aestivum</i> , UDP-Glycosyl transferase cultivar Wangshuibai	0
Posttranslationale Proteinmodifikation		
TDF_093	ACG33621 <i>Zea mays</i> , ubiquitin-like protein SMT3 (X)	3e-21
TDF_107	EU965935 <i>Zea mays</i> , ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isoenzyme L3 mRNA	1e-24
Metabolismus/Photosynthese		
TDF_030	TA84503_4565 <i>Arabidopsis thaliana</i> , Similarity to glucoserelated supressor protein	1,2 e-28
TDF_123	EU957942 <i>Zea mays</i> , Nitrilase associated protein	1e-36
TDF_013	100281697 <i>Zea mays</i> , LOC 100281697 Ubiquinone biosynthesis ubiB	2e-99
TDF_114	AF347064 <i>Triticum aestivum</i> , sucrose phosphate synthase	3e-66
TDF_011	CK153346 <i>Zea mays</i> , Adenosine kinase	5.9e-111
TDF_138	AF347066 <i>Triticum aestivum</i> , truncated sucrose-phopspahte synthase 4 mRNA	6e-58
Protein Biosynthese		
TDF_088	EU960877 <i>Zea mays</i> , 40S ribosomal protein S9 mRNA	0
TDF_031	BQ608584 <i>Triticum aestivum</i> , Ribosomal protein 117	7,5 e-24

3.3. Rückkartierung der differentiell exprimierten TDFs in bestehende QTL-Karten

Die Integration in bestehende genetische QTL-Karten ist eine wichtige Möglichkeit, die durch cDNA-AFLP-Analyse identifizierten, differentiell exprimierten Kandidatengene zu validieren. Hierzu wurden spezifische Primer für jedes TDF abgeleitet und mit diesen Primern eine PCR durchgeführt, wobei die genomische DNA des jeweils resistenten und anfälligen Elters einer Population als Template eingesetzt wurde. Das Ziel war es hierbei Sequenzpolymorphismen zwischen den Kreuzungseltern zu finden, aus denen Marker für das Kandidatengen entwickelt werden können. Anhand dieser Marker können die Kandidatengene in bestehende genetische Karten rückkartiert werden.

Von den 87 differentiell exprimierten Weizen-TDFs wurden 42 erfolgreich mit genomischer DNA in den jeweils resistenten und anfälligen Eltern der Kartierungspopulationen amplifiziert und sequenziert. Von den 42 sequenzierten genomischen PCR-Produkten zeigten 5 Sequenzpolymorphismen zwischen den Eltern von Kartierungspopulationen. Bei den übrigen 37 PCR-Produkten konnten keine Sequenzunterschiede zwischen den Eltern der Kartierungspopulationen gefunden werden.

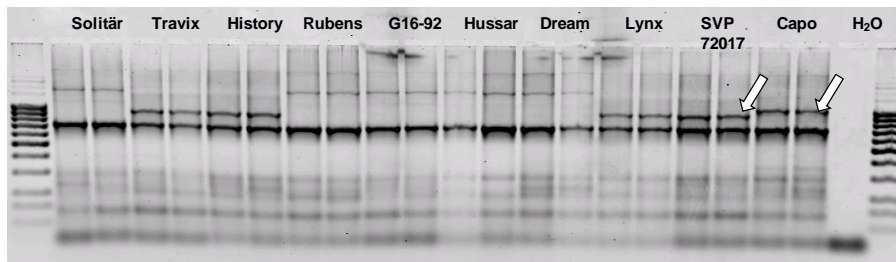
Im Folgenden werden die von den TDFs mit Sequenzpolymorphismen abgeleiteten Marker und deren Kartierung beschrieben.

TDF_032

TDF_032 (Blast-Ergebnis: CJ595840/*Triticum aestivum*, EST; E-value 1,3e-17) wurde in cDNA-AFLPs des resistenten Elter SVP72017 bereits kurz nach der Inokulation mit *F. graminearum* (0 und 8 hai) als hochreguliert identifiziert. Von der Sequenz des TDFs wurden Primer abgeleitet, welche in einer PCR zusammen mit genomischer DNA von SVP72017 und Capo eingesetzt wurden. Bei der Auftrennung des PCR-Produktes auf einem 2% Agarosegel erhält man zwei Banden (Abb. 8a), eine kleinere Bande mit einer Größe von ca. 750Bp und eine größere Bande mit ca. 880 Bp in SVP und 980 Bp in Capo. Die Banden mit ca. 880 und ca. 980 Bp Länge zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit der Sequenz von TDF_032 und enthalten große Intronbereiche (ca. 75% des sequenzierten Fragments). Der Größenunterschied zwischen den Banden in SVP72017 und Capo beruht auf einer 108 Bp großen Deletion in der Sequenz von SVP72017 (Abb. 8b). Diese befindet sich nicht im codierenden Bereich des amplifizierten Fragmentes, da in diesem Abschnitt des sequenzierten PCR-Produktes keine Übereinstimmung in der Basenabfolge mit der cDNA-Sequenz von TDF_032 besteht.

Nachdem die PCR für TDF_032 mit genomischer DNA von 10 Winterweizengenotypen (Solitär, Travix, History, Rubens, G16-92, Hussar, Dream, Lynx, SVP72017, Capo) durchgeführt wurden, zeigte sich, dass von TDF_032 mindestens drei Allele vorkommen und von den getesteten Eltern nur Capo die Bande bei 980 bp besitzt. Solitär, Rubens, G16-92, Hussar und Dream zeigen eine Bande bei ca. 1500 bp, die auf einer größeren Insertion, ebenfalls im nicht-kodierenden Bereich des Gens, beruht. Travix, History und Lynx hingegen zeigen die gleiche Bandengröße wie SVP 72017 (Abb. 8b). Der Polymorphismus wurde in der Population History/Rubens auf Chromosom 5A im Abstand von 2 cM vom AFLP-Marker XP7661-461 und 10 cM vom Microsatelliten Xgwm 617-5A kartiert (Abb. 9c). Weder in der Population History/Rubens noch in Sng3559/SVP72017 befindet sich in dieser Genomregion ein QTL für Fusariumresistenz. Von den Eltern der Population Renan/Recital, die in diesem Abschnitt von Chromosom 5AS einen QTL für Resistenz gegenüber *F. culmorum* besitzen, zeigt der resistente Elter Renan, der den QTL vererbt, die Bande bei 980 Bp wie Capo und der anfällige Elter Recital die Bande bei 1500 Bp (Daten nicht gezeigt).

8a



8b

```

TDF_032_3_SVP      CTTTGTGATTTTGGCTATCCTATAGTTCTGAATGGGTCGCTATCACAGGTTCCCTCCTCC 597
TDF_032_3_Capo     CTTTGTGATTTTGGCTATCCTATAGTTCTGAATGGGTCGCTATCACAGGTTCCCTCCTCC 600
*****

TDF_032_3_SVP      TGGTCTTGCAITGCCCCAAAATTTCTCATCGTCTTGCAGTTTGTITGCTTTGTTGATTTT 657
TDF_032_3_Capo     TGGTCTTGCAITGCCCCAAAATTTCTCATCGTCTTGCAGTTTGTITGCTTTGTTGATTTT 660
*****

TDF_032_3_SVP      GCTATCCTATAGTTCGAAATGGGTC----- 682
TDF_032_3_Capo     GCTATCCTATAGTTCGAAATGGGTCGCTATCACAGGTTCCCTCCTGCTTGCATTG 720
*****

TDF_032_3_SVP      -----
TDF_032_3_Capo     CCCCCAAAATTTCTCATCGTCTTGCAGTTTGTITGCTTTGTTGATTTTGGCTATCCTATAGT 780

TDF_032_3_SVP      -----CCCAGCCAGGCCAAACCAATCTTAGTGGAAATCATGGAGATCAAAGAT 730
TDF_032_3_Capo     TCTGAATGGGTCGCCAGCCAGGCCAAACCAATCTTAGTGGAAATCATGGAGATCAAAGAT 840
*****

TDF_032_3_SVP      TTTGCTATGTCAATATAATTCTATGAATTATATATTTCTTCTCGGAGAGTAACCTGTGTA 790
TDF_032_3_Capo     TTTGCTATGTCAATATAATTCTATGAATTATATATTTCTTCTCGGAGAGTAACCTGTGTA 900
*****

TDF_032_3_SVP      ATCTTTGAAAGCAGCCTCAGCTTCGTGTTTATGGTCTCTCAGCTTCGTGTTTATGGTGG 850
TDF_032_3_Capo     ATCTTTGAAAGCAGCCTCAGCTTCGTGTTTATGGTCTC--AGCTTCGTGTTTATGGTGG 958
*****

TDF_032_3_SVP      GCTGCGTGGAAAGCCAGTGCC 870
TDF_032_3_Capo     GCTGCGTG----- 966
*****
    
```

8c

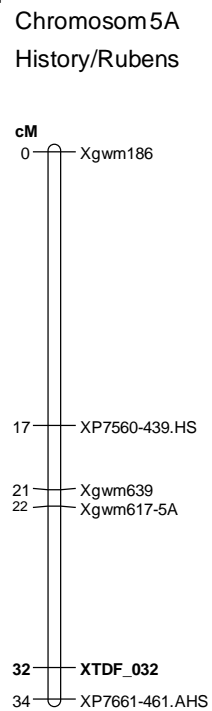


Abb. 8: Kartierung von TDF_032 (unbekannte Funktion)

Abb. 8a zeigt den Polymorphismus, der für die Kartierung verwendet wurde. Die Bande bei 880 Bp (SVP72017) und bei 980 Bp (Capo) ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Diese Unterschiede beruhen auf einer 108 Bp großen Deletion im Intron-Bereich des Gens (Abb. 8b). In der Population History/Rubens konnte TDF_032 auf Chromosom 5A kartiert werden (Abb. 8c) (Karte: Holzapfel et al. 2008).

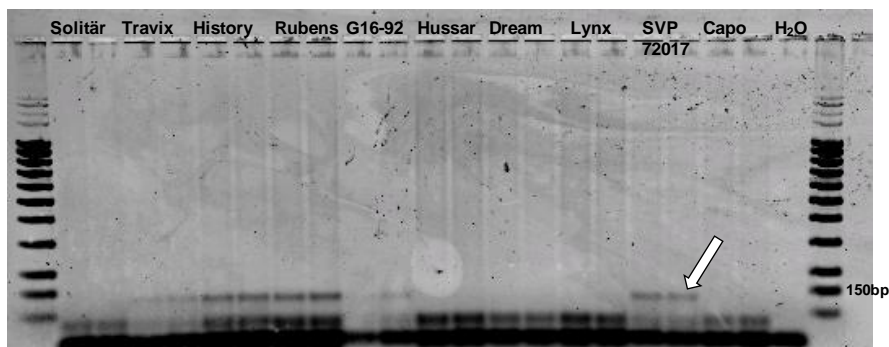
TDF_103

TDF_103 (BLAST-Ergebnis: CD902327, *Triticum aestivum*, EST; E-value 2.8 e-116) wurde in cDNA-AFLP-Gelen von SVP72017 72 Stunden und 96 Stunden nach der Inokulation mit *F. graminearum* als hochreguliert identifiziert. Von der Sequenz des TDF_103 wurden spezifische PCR-Primer abgeleitet und mit diesen eine PCR durchgeführt, bei der genomische DNA von SVP72017 und Capo als Template eingesetzt wurde. Das entstandene PCR-Produkt besitzt eine Länge von ca. 600 Bp. Die Sequenzierung dieses PCR-Produkts zeigte, dass innerhalb der Sequenz ein 48 Bp langer Abschnitt 11 Mal hintereinander wiederholt wird und somit ein „Tandem Repeat“ vorliegt. Bei Bp 502 befindet sich in der letzten amplifizierten Wiederholung ein SNP zwischen den Sequenzen von SVP72017 (T) und Capo (C), der

innerhalb einer Schnittstelle des Restriktionsenzym *TaqI* liegt (Abb. 9b). Durch den Restriktionsverdau mit *TaqI* wird das PCR-Produkt von Capo 17 Mal geschnitten und das PCR-Produkt von SVP72017 nur 16 Mal. Im PCR-Produkt von SVP72017 bleibt hierbei ein ca. 130 Bp langes Stück intakt, während in jenem von Capo das gesamte amplifizierte Fragment von *TaqI* in Stücke von maximal 70 Bp geschnitten wird. Nach der Auftrennung auf einem 2% Agarosegel erkennt man somit bei SVP 72017 eine Bande bei 130 Bp (Abb. 9a).

Angewandt auf ein Testsortiment von 10 Winterweizengenotypen (Solitär, Travix, History, Rubens, G16-92, Hussar, Dream, Lynx, SVP72017, Capo) zeigte sich, dass auch Travix, History, Rubens und G16-92 die 130 Bp Bande nach *TaqI*-Verdau besitzen, während das gleiche PCR-Produkt in Solitär, Hussar, Dream und Lynx entsprechend der Sorte Capo geschnitten wird. Der von TDF_103 abgeleitete SNP-Marker konnte in der Population Solitär/Travix in eine Kopplungsgruppe auf Chromosom 4B kartiert werden (Abb. 9c) (Karte von Holzapfel et al. 2008). Eine Validierung der Expression durch quantitative Real-time PCR war nicht möglich, da aufgrund des „Tandem Repeats“ keine spezifischen Primerpaare gefunden werden konnten.

9a



9b

```

S103_C      CTCGAGGACTTCTGCAATGCAGAGTCATTTCATCGATTTCCTAACCCCTCAAGGACTTC 480
S103_S      CTCGAGGACTTCTGCAATGCAGAGTCATTTCATCGATTTCCTAACCCCTCAAGGACTTC 379
*****

S103_C      TGCAATGCAGAGTCATTTCGATTCGATTTCTCTAATCCTCTTCCTAGTGGTTTGGTTGCTC 540
S103_S      TGCAATGCAGAGTCATTTCGATTCGATTTCTCTAATCCTCTTCCTAGTGGTTTGGTTGCTC 439
*****

S103_C      TCTTCTAAGGGAACAACCACTGCCTCTGGTGGGTAGGCTG----- 580
S103_S      TCTTCTAAGGGAACAACCACTGCCTCTGGTGGGTGAGCTGATTA 484
*****
    
```

9c

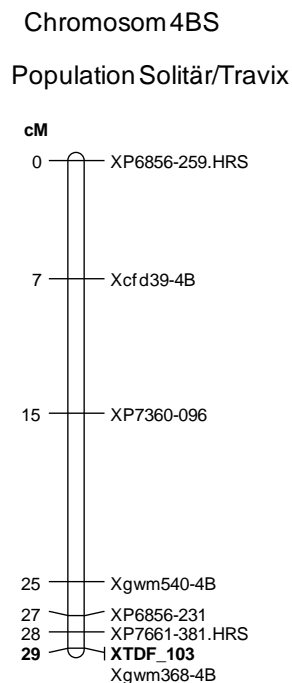


Abb. 9: Kartierung von TDF_103 (unbekannte Funktion)

Abb. 9b zeigt den Polymorphismus, der für die Kartierung verwendet wurde. Abb. 9a zeigt den aus dem SNP entwickelten CAPS Marker, angewandt auf die 10 Testsorten. In der Population Solitär/Travix konnte TDF_103 auf Chromosom 4B kartiert werden (Abb. 9c) (Karte: Holzapfel et al. 2008).

TDF_102 (putatives Cytochrom P450)

TDF_102 (BLAST-Ergebnis: *Zea mays*, Cytochrome P450 CYP709H1 mRNA, E-value: 3e-08) wurde in cDNA-AFLPs von Capo zu den Zeitpunkten 24, 48, und 72 Stunden nach der Inokulation mit *F. graminearum* als hochreguliert identifiziert. Eine PCR mit Primern, die von der Sequenz von TDF_102 abgeleitet wurden, ergaben bei getesteten Annealing-Temperaturen von 52-62 °C nur bei dem Einsatz genomischer DNA von Capo als Template ein PCR-Produkt von ca. 200 Bp. Die Testung der 10 Winterweizengenotypen (Solitär, Travix, History, Rubens, G16-92, Hussar, Dream, Lynx, SVP72017, Capo) mit dem Primer Cgram102 zeigte, dass Solitär, Travix, Rubens, G16-92, Dream und Lynx, nicht aber History und Hussar, die Bande bei 200 Bp zeigen (Abb. 10a). Die Testung eines weiteren Primerpaares führte zu der Schlussfolgerung, dass in der Primerbindungsstelle von Cgram102 ein Sequenzpolymorphismus zwischen verschiedene Winterweizengenotypen bestehen muss.

TDF_102 kartiert in der Population History/Rubens in eine Gruppe von 8 AFLP Markern auf Chromosom 2B (Abb. 10b). In diesem Bereich von Chromosom 2B wurde zuvor ein QTL detektiert, der in der Population History/Rubens je nach Umwelt zwischen 2,1 % und 8,0 % der phänotypischen Varianz des Fusariumbefalls erklärt (Holzapfel 2009). Donor des Fusarium-Resistenz-Allels ist die Sorte History.

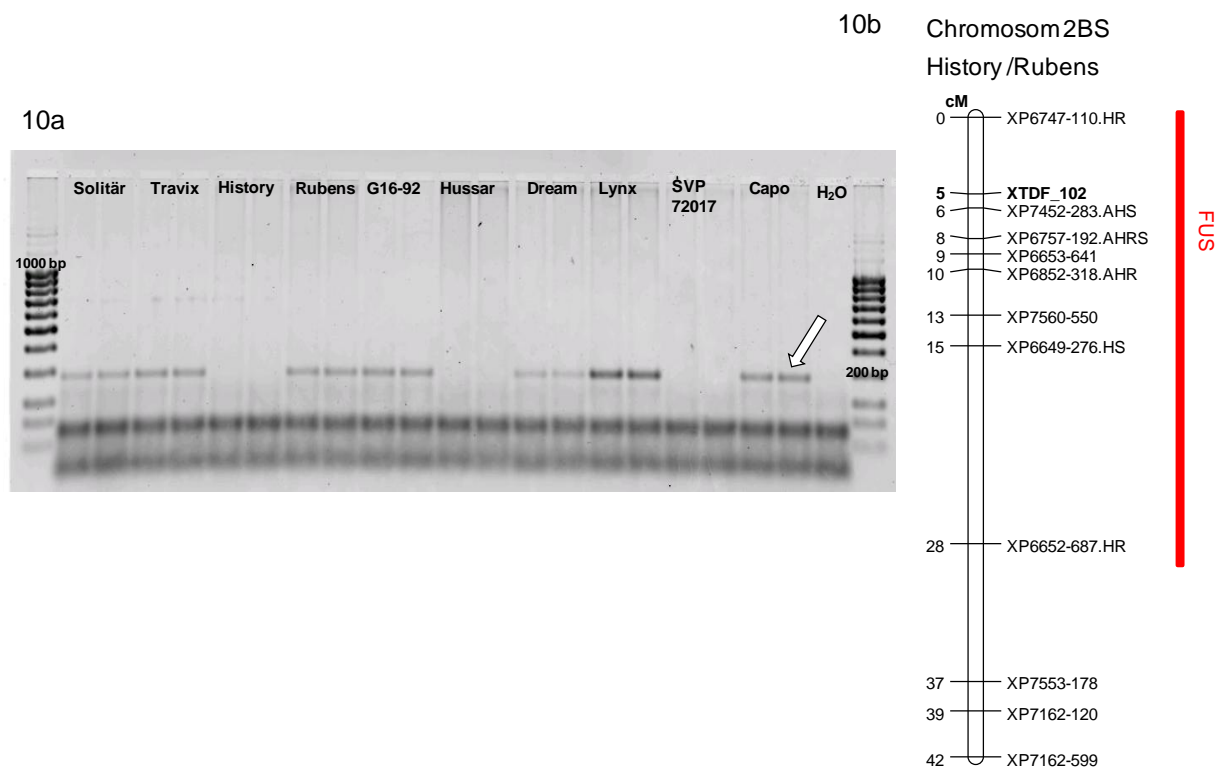


Abb. 10a: Dominanter PCR Marker (Primer: Cgram102), der für die Kartierung von TDF_102 auf Chromosom 2BS (Abb. 10b) in der Population History/Rubens (Karte: Holzapfel 2009) verwendet wurde.

TDF_076

TDF_076 (BLAST-Ergebnis: TA100375_4565, *Triticum aestivum*, *NPRI*-like protein; E-value 5.1e-49) wurde in cDNA-AFLPs der Sorte Capo 8, 24 und 32 Stunden nach der Inokulation mit *F. graminearum* stärker exprimiert als in den entsprechenden wasser-behandelten Kontrollproben. Um ein längeres Produkt sequenzieren und damit die Möglichkeit erhöhen zu können, einen Sequenzpolymorphismus zwischen den Eltern der Kartierungspopulationen zu finden, wurde bei der Primergenerierung der F-Primer auf die Sequenz von TDF_076 und der R-Primer auf die Sequenz (TA100376_4565, TIGR-Datenbank) mit dem besten BLAST-Ergebnis aus der Datenbankrecherche gelegt. Diese Sequenz besitzt eine sehr gute Übereinstimmung mit TDF_076, ist jedoch um 480 Bp länger. Durch eine PCR mit diesen Primern (Cgram076_3, Tabelle 3) und genomischer DNA verschiedener Weizengenotypen konnte ein PCR-Produkt von ca. 1400 Bp Länge gewonnen werden. Die Sequenzierung des entsprechenden PCR-Produktes in den Weizen SVP72017, Capo, G16-92, Hussar, History, Rubens, Inspiration, Sngh3559, Renan und Recital zeigte, dass sich in dem amplifizierten Genfragment drei Deletions-/Insertions-Polymorphismen zwischen den Sorten befinden. Zwei

dieser Polymorphismen liegen innerhalb der Intron-Bereiche des Gens und führen daher mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zu Veränderungen in der Aminosäureabfolge des Proteins. Der dritte Polymorphismus (Abb. 11a) liegt jedoch in einem Bereich, in dem die cDNA-Sequenz von TDF_076 mit der genomischen Sequenz des PCR-Produktes übereinstimmt und liegt daher im codierenden Bereich des Gens. Um die Polymorphismen gut auf dem PAA-Gel auswerten zu können, wurden weitere Primerpaare (Cgram076_4, Cgram076_5, Cgram_076_7; Tabelle 4) abgeleitet, um kürzere PCR-Produkte zu erhalten (Abb. 11b-c). Die Testung eines Sortiments aus 163 Winterweizensorten mit den 3 INDEL-Markern ergab, dass mit diesen mindestens 4 Allele des *NPRI*-like Gens nachgewiesen werden können, welche sich in den Kombinationen dieser Insertionen unterscheiden. Dabei besitzen 16,5 % der Sorten die gleichen INDEL-Kombinationen wie SVP7217, Inspiration und G16-92, 21,5% wie Sng3559, Lynx und Recital, 60% wie Capo, Renan und Dream, 2,5% besitzen eine weitere Kombination. Eine Varianzanalyse ergab, dass sich die Gruppen mit gleichem *NPRI*-Allel hinsichtlich des mittleren Fusariumbefalls aus Daten von 4 Umwelten nicht signifikant unterscheiden. Das Testsortiment sowie die mittleren Befallsdaten wurden von Dr. M. Schmolke (TU-München) zur Verfügung gestellt.

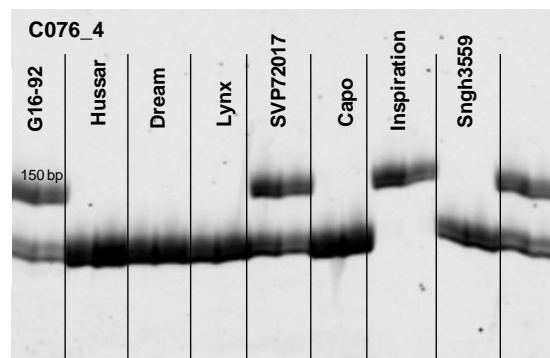
TDF_076 wurde in der Population History/Rubens auf Chromosom 2AL 1cM vom Microsatelliten Xgwm 382-2A kartiert (Karte Holzapfel et al. 2008). In der Population Sng3559/SVP72017 konnte TDF_076 ebenfalls auf Chromosom 2AL kartiert werden (Abb. 12). Dort colokalisiert TDF_076 mit einem QTL für Ährenfusarioseresistenz, der von SVP72107 vererbt wird. In der QTL-Analyse, erklärt der Marker 2-14% der phänotypischen Variation (Groth, nicht publiziert). SVP72017 und Inspiration zeigen im sequenzierten Bereich des *NPRI*-like Gens keine Sequenzunterschiede. In dieser Population wurde auch kein QTL für Fusariumresistenz auf Chromosom 2AL detektiert.

11a

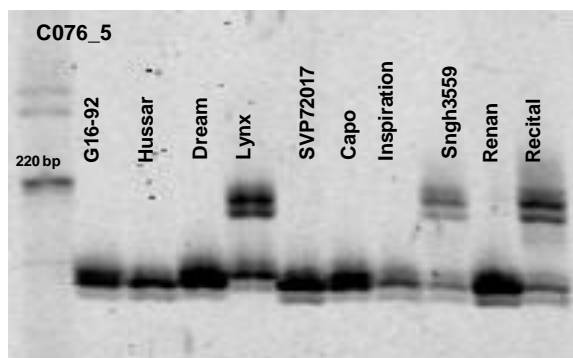
```

TDF_076_3_SVP      ----CAATTTTACATGGACGAGAGGCGGCGAGCAGCAGCAACACATACGGGCAACTTACGG 56
TDF_076_3_Capo     TGGTCAATTTTACATGGACGAGAGGCGGCGAGCAGCAGCAACACATACGGGCAACTTACGG 60
                    *****
TDF_076_3_SVP      GCAATATAAGTACATCGTCACGGCTTCCTGTTATGGATTAAATAAATACAAATACACA 116
TDF_076_3_Capo     GCAATATAAGTACATCGTCACGGCTTCCTGTTATGGATTAAATCAA-----ATTACACA 115
                    *****
TDF_076_3_SVP      AC----- 118
TDF_076_3_Capo     ACTCCAATTGGATTAGAAATATGATTAGGTAGGAGGCGAGACAGAAATCTTACAAATCTG 175
                    **
    
```

11b



11c



11d

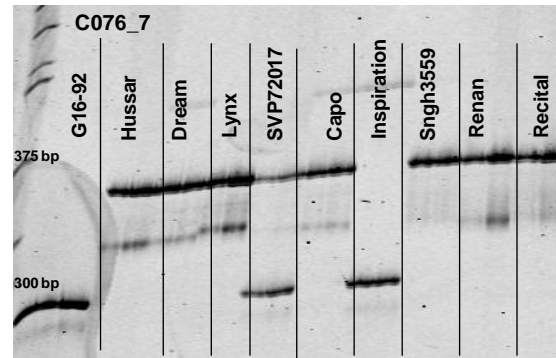


Abb. 11: PCR-Produkte von genomischer DNA bei Einsatz der Primer Cgram076_4, Cgram076_5 und Cgram076_7 (Abb. 10b-d). Der Auftrag der PCR Produkte auf einem 5% PAA Gel zeigt die drei Insertions-/Deletions-Polymorphismen in TDF_076 (*NPR1*-like protein). Der Marker C076_4 wurde zur Kartierung in den Populationen History/Rubens und SngH3559/SVP72017 (Abb. 12) verwendet und amplifiziert einen 5Bp Deletion im codierenden Bereich des Gens (Abb. 11a).

Sngh3559/SVP72017 Chromosom 2AL

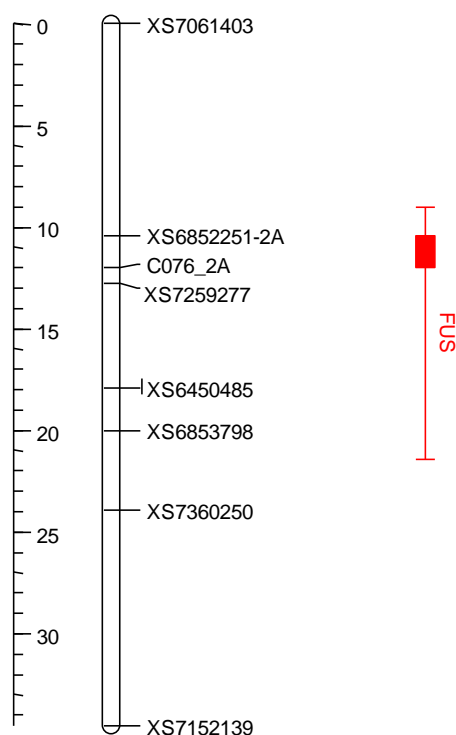


Abb. 12: Kartierung von TDF_076 in der Population Sngh3559/SVP72017. Die QTL-Analyse zeigt, dass der Peak der LOD-Kurve eines QTL für Fusariumresistenz genau bei TDF_076 liegt. (Multiple Intervall Mapping mit Multi-QTL: J. Groth, persönliche Mitteilung).

WIR1-Gene

TDF_022 (BLAST-Ergebnis: X87686, *Triticum aestivum*, mRNA für *WIR1*, pathogen defense protein; E-value: 6.9 e-86) ist in cDNA-AFLP-Gelen von Hussar als konstitutive, gleich starke Bande zu allen Zeitpunkten zu sehen. Das TDF aus Hussar wurde sequenziert und basierend auf der cDNA-Sequenz Primer (Hgram022, Tabelle 4) abgeleitet. Nach der Sequenzierung des entstehenden PCR-Produkts konnte ein Insertions-/Deletions-Polymorphismus zwischen G16-92 und Hussar nachgewiesen werden (Abb. 13b). Durch die Auftrennung des PCR-Produktes auf einem PAA-Gel war dieser Polymorphismus als Bande bei 290 Bp in G16-92 und 300 Bp bei Hussar sichtbar und direkt als Marker zur Kartierung von TDF_022 verwendbar. Von den getesteten Eltern der Kartierungspopulationen besitzt nur History das gleiche Allel wie Hussar (Abb. 13a). Die übrigen Genotypen besitzen die Bande bei 290 Bp wie G16-92. Der

Insertionspolymorphismus befindet sich im codierenden Bereich des Gens, da die cDNA-Sequenz des TDF_022 mit der gDNA-Sequenz im analysierten Bereich übereinstimmt.

TDF_022 konnte in der Population G16-92/Hussar in eine Koppelungsgruppe kartiert werden, die bei Schmolke et al. (2005) als Chromosom 5B bezeichnet wird. Bei der Kartierung in die Population History/Rubens kartierte TDF_022 jedoch auf Chromosom 5D. Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse wurden weitere Mikrosatellitenmarker in die Karte von G16-92/Hussar aufgenommen, die auf Chromosom 5D liegen. Xcfd81, der auf Chromosom 4D oder 5D liegen kann, kartiert 2cM von TDF_022 entfernt (Abb. 13c). Durch die Analyse von nullitetrasomen Linien von Chinese Spring konnte TDF_022 eindeutig Chromosom 5D zugeordnet werden.

Neben TDF_022 wurden 3 weitere *WIRI*-Sequenzen (Ta.22732.S1_at, Ta.97.1.S1_at, Ta.97.2.S1_at) auf Sequenzpolymorphismen zwischen den Eltern der Populationen untersucht. Hierbei wurden Probesets des Affimetrix 61 K Micorarrays ausgewählt, der von den Kooperationspartnern der Universität Giessen für Expressionsanalysen von Dream und Lynx nach der Inokulation mit *F. graminearum* verwendet wurde. Die *WIRI*-EST-Sequenzen konnten durch eine Key-Word-Suche auf der Harvest-Website ermittelt (C. Wagner und M.Rhiel, persönliche Mitteilung) und zur weiteren Analyse und Bearbeitung überlassen werden. Die Sequenzen aller 4 *WIRI*-Genfragmente sind zwischen den Eltern der Kartierungspopulationen polymorph und konnten daher in die bestehenden Karten der Dream/Lynx bzw. der G16-92/Hussar Population integriert werden. G16-92 und Hussar zeigen in der genomischen Sequenz des als *WIRIb* annotierten Probesets Ta.97.1.S1_at 3 SNP-Polymorphismen (Abb. 13b). Für den in der Abbildung gekennzeichneten SNP wurde zur Genotypisierung der Linien ein Pyrosequencing-Assay erstellt (Abb. 13c). Ta.97.1.S1_at konnte so in der Population G16-92/Hussar in 1 cM Abstand zu TDF_022 auf Chromosom 5DS kartiert werden.

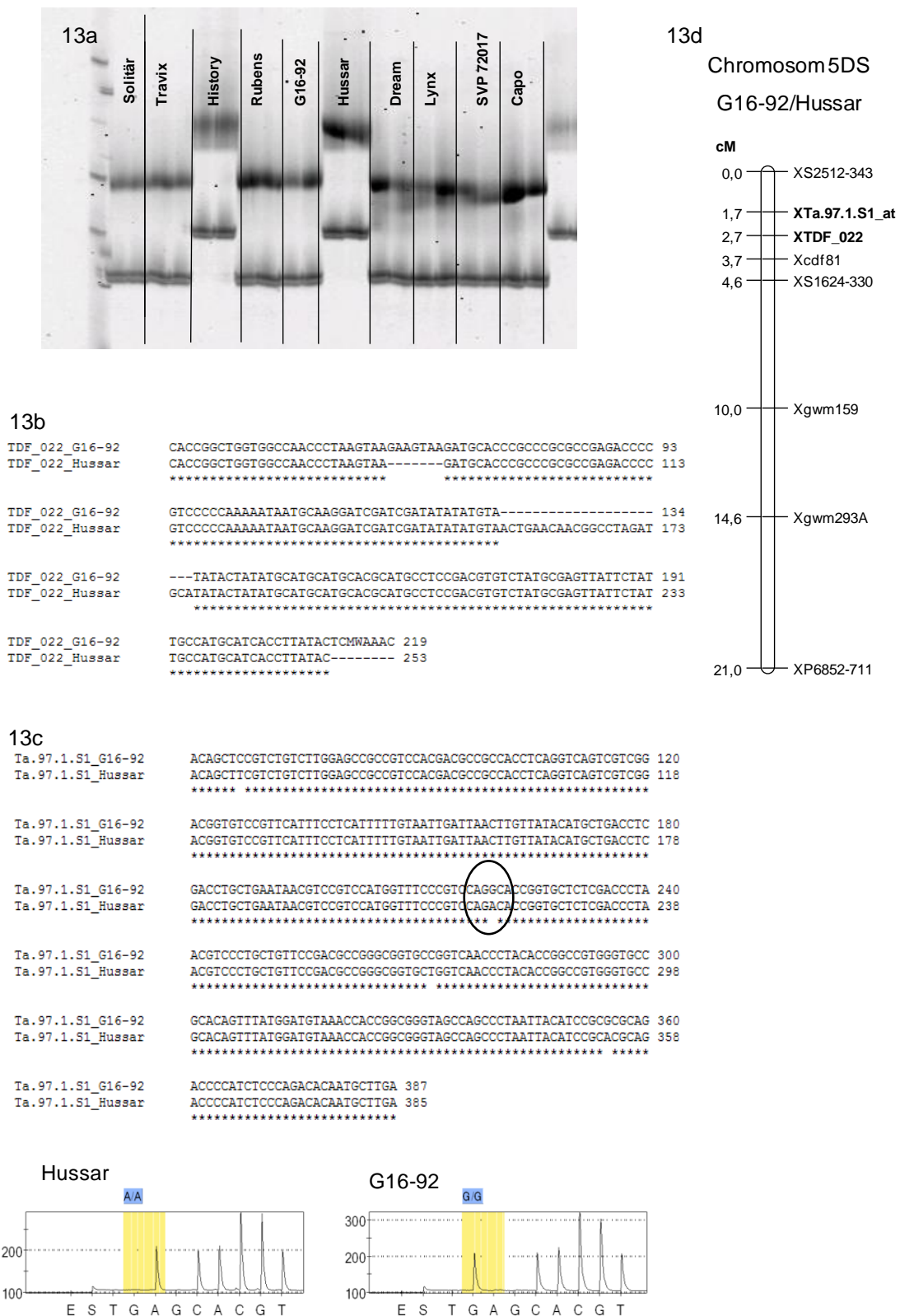


Abb. 13: Polymorphismen zwischen G16-92 und Hussar innerhalb der WIR1-Sequenzen TDF_022 und Ta.97.1.S1_at und deren Integration in die genetische Karte der Population G16-92/Hussar.

Abb. 13b: INDEL-Polymorphismus Dream innerhalb der Sequenz von TDF_022 von G16-92 und Hussar, der mit von TDF_022 abgeleiteten Primern zu einem PCR-Produkt unterschiedlicher Größe führt (Abb. 13a). Innerhalb der Sequenz Ta.97.1.S1_at besitzen G16-92 und Hussar drei SNPs, wobei der markierte SNP (Abb. 13c) für die Genotypisierung der RILS der Population G16-92/Hussar mit Hilfe von Pyrosequencing verwendet wurde. Abb. 13c zeigt die Pyrogramme der Pyrosequenzierung von G16-92 und Hussar. Beide *WIRI*-Gene konnten in der Population G16-92/Hussar auf Chromosom 5B/D kartiert werden (13d) (Karte: Schmolke et al. 2008).

Ta. 97.2.S1_x_at und Ta.22732_x_at sind beide als *WIRIa*-Gene annotiert. Für Ta.22732_x_at wurden Primer (WIRII_2) abgeleitet, wo bei Einsatz von genomischer DNA von Lynx als Template ein PCR-Produkt von 460 Bp amplifiziert werden konnte, nicht, aber wenn genomische DNA von Dream eingesetzt wurde. Die Ergebnisse der Testung weiterer spezifischer Primerpaare (S.37) legen die Vermutung nahe, dass sich innerhalb der Primerbindungsstelle der Primer WIRII_2 ein Sequenzpolymorphismus zwischen Dream und Lynx befindet, wobei es sich wahrscheinlich um eine größere Insertion handelt.

Der SNP zwischen Dream und Lynx in der *WIRI*-Sequenz Ta.97.2.S1_x_at (Abb. 14b) wurde von Markus Rhiel (Universität Giessen) über Sequenzierungsanalysen gefunden und uns mitgeteilt. Dieser SNP liegt nicht im kodierenden Bereich des Gens (M. Rhiel, persönliche Mitteilung). Für die Genotypisierung der Linien der Population Dream/Lynx wurde ein Pyrosequencing Assay erstellt (Abb. 14c).

Anhand der oben beschriebenen Marker für Ta.22732_x_at und Ta.97.2.S1_x_at konnten die beiden *WIRIa*-Sequenzen auf Chromosom 7BS der Population Dream/Lynx kartiert werden. Sie colokalisieren mit einem QTL für Fusariumresistenz, dessen Vertrauensintervall sich nach Single Intervall Mapping (Plab QTL) von Ta.97.2.S1_x_at bis XP7260-156 erstreckt (Abb. 14d).

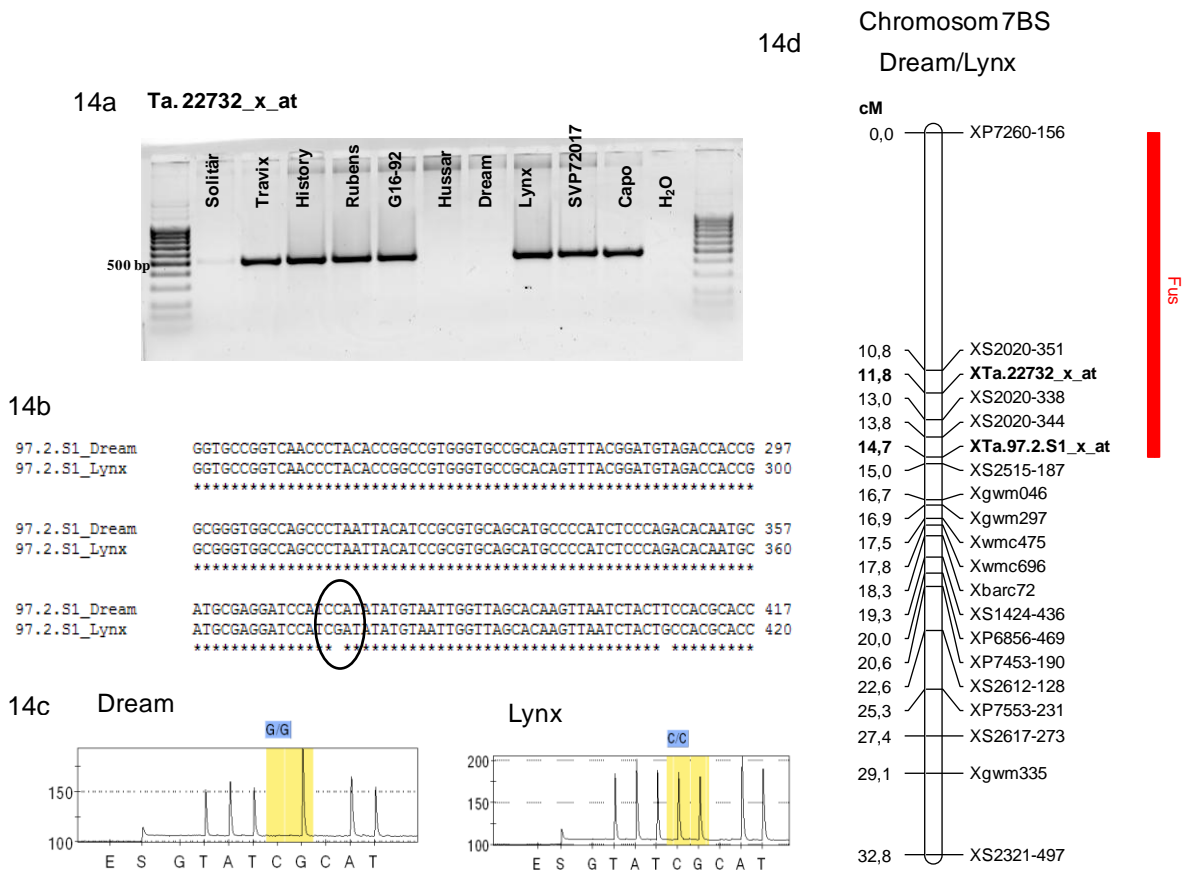


Abb. 14: Kartierung der *WIR1a*-Genfragmente Ta.22732.S1_at und Ta.97.2.S1_x_at

Für Ta.22732_x_at wurden Primer für einen dominanten Marker entwickelt (Abb. 13a). Anhand dieses Markers konnten Linien der Population Dream/Lynx genotypisiert werden, und Ta.22732_x_at in die gentische Karte integriert werden (Abb. 14d). Innerhalb der genomischen Sequenzen von Ta.97.2.S1_x_at befindet sich zwischen Dream und Lynx ein SNP (Abb. 14b) (M. Rhiel, Universität Giessen). Durch die Anwendung von Pyrosequencing konnten die Linien der Population genotypisiert werden. Abb. 14c zeigt die Pyrogramme von Dream und Lynx. Ta.97.2.S1_x_at kartiert 3cM oberhalb von Ta.22732.S1_at auf Chromosom 7BS. Beide *WIR1*-Sequenzen liegen in einem QTL-Intervall für Fusariumresistenz (Abb. 14d) (Karte Schmolke et al. 2005).

3.4. Ergebnisse der Real-time PCR

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse, die mit der cDNA-AFLP-Technik durchgeführt wurde, wurden für sechs TDFs mit quantitativer Real-time PCR validiert. Zusätzlich wurde die Expression der drei WIR1-Gene überprüft. Als besonders interessant für diese weitere Bearbeitung wurden TDFs erachtet, die entweder eine Ähnlichkeit mit Genen von interessanter Funktion besitzen oder die in genetische Karten integriert werden konnten. Eine Validierung der Ergebnisse ist sinnvoll, weil mit cDNA-AFLP-Analysen nicht die gleiche Sensitivität wie mit der quantitativen Real-time PCR erreicht werden kann.

Zudem kann es bei Sequenzpolymorphismen, welche die AFLP-Restriktionsschnittstellen betreffen, zu Ausfällen von Banden im cDNA-AFLP kommen. Bei fünf der untersuchten TDFs stimmten die Ergebnisse von quantitativer Real-time PCR und cDNA-AFLP jedoch gut überein. Die quantitative Real-time PCR wurde in drei technischen Wiederholungen mit cDNA aus dem gleichen Pflanzenmaterial, das auch für die cDNA-AFLP-Analysen verwendet wurde, durchgeführt. Die Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR wurden unter der Anwendung der Delta Delta Ct-Methode (Livack und Schmittgen 2001), einer relativen Quantifizierungsmethode, auf das gleichmäßig exprimierte „Haushaltungsgen“ Ubiquitin sowie auf den Expressionslevel des zu untersuchenden Gens in wasser-behandelten Kontrolllähren normalisiert. Alle Werte, die dabei > 1 sind, werden demnach im Vergleich zur mock-Behandlung des gleichen Zeitpunktes hochreguliert, alle Werte < 1 entsprechend herunterreguliert.

Expression von TDF_032

TDF_032 ist in der cDNA-AFLP-Auswertung des resistenten Elter SVP 72017 bereits kurz nach der Inokulation mit *F. graminearum* (0 und 8 hai) zu sehen. Die Validierung der Ergebnisse mit quantitativer Real-time PCR bestätigt dieses Expressionsmuster. Dieses TDF ist in SVP72017 8 Stunden nach der Inokulation im Vergleich zur mock-behandelten Kontrolle sehr stark hochreguliert. Auch 72 hai ist TDF_032 in SVP72017 hochreguliert. Zu anderen Zeitpunkten ist die Expression schwach und steigt auch in infizierten Proben nicht an. In Capo ist die Expression von TDF_032 zu keinem untersuchten Zeitpunkt nach der Inokulation induziert. Dieses Expressionsmuster deutet auf eine frühe Abwehrreaktion hin, die spezifisch für den resistenten Elter SVP 72017 sein könnte.

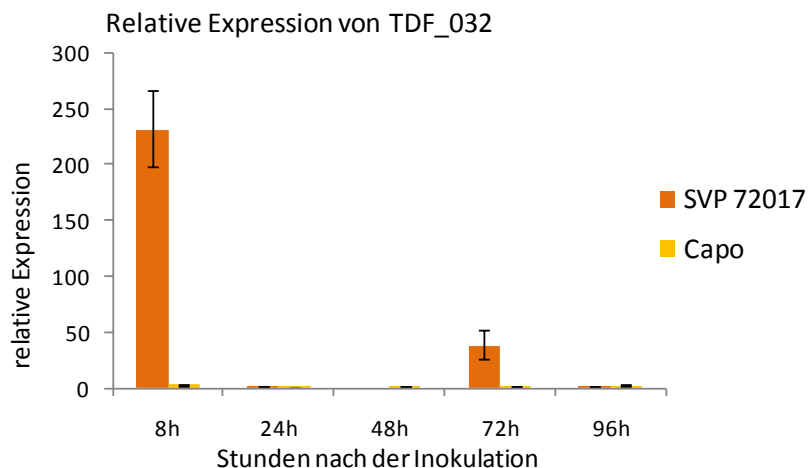


Abb. 15: Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR von TDF_032 in *F. graminearum* infizierten Blütengewebe von SVP72017 (res.) und Capo (anf.).

Expression von TDF_102

In der cDNA-AFLP-Analyse von Capo ist TDF_102 24, 48 und 72 Stunden nach der Inokulation hochreguliert. Die Validierung der Expression mit quantitativer Real-time PCR zeigte, dass TDF_102 in Capo zu allen Zeitpunkten nach der Inokulation stärker exprimiert wird als in den jeweiligen Kontrollähren (Abb. 16). Besonders stark ist die Hochregulation zum Zeitpunkt 72 h, wobei es ca. 10 Mal stärker exprimiert wird als in der Kontrolle. In SVP72017 ist dieses Gen zu allen anderen untersuchten Zeitpunkten nach der Infektion mit *F. graminearum* herunterreguliert. Somit stimmt das Expressionsmuster aus den cDNA-AFLP weitgehend mit den Ergebnissen der quantitativen Real-time PCR überein.

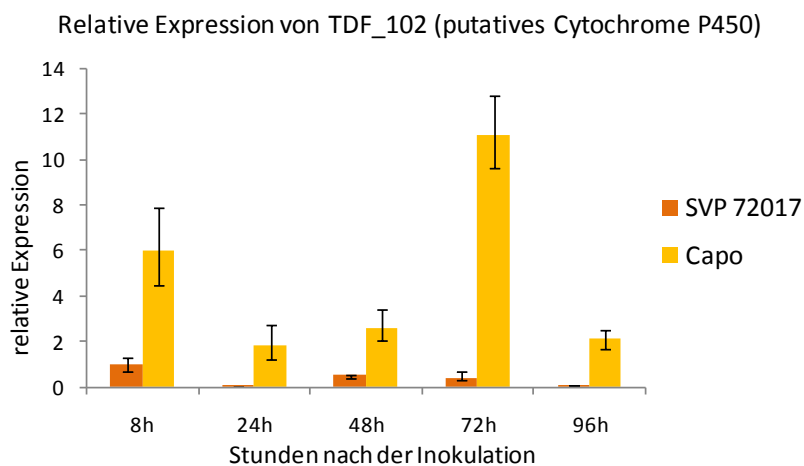
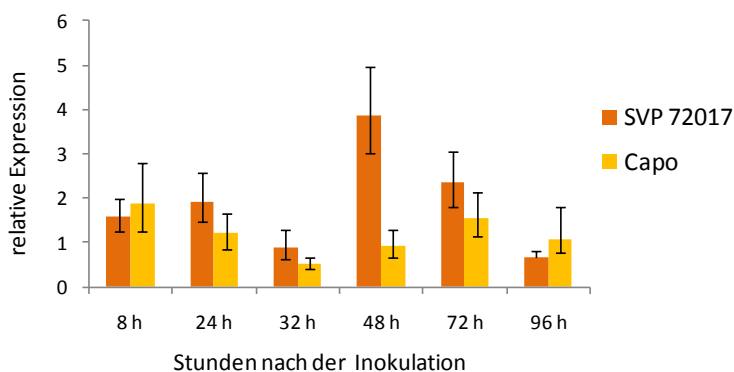


Abb. 16: Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR von TDF_102 in *F. graminearum* infizierten Blütengewebe von SVP72017 (res.) und Capo (anf.).

Expression von TDF_076

TDF_076 wird in cDNA-AFLPs von Capo 8, 24 und 32 Stunden nach der Inokulation mit *F. graminearum* hochreguliert. Die Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR zeigten, dass TDF_076 sowohl in Capo als auch in SVP72017 nach der Inokulation mit *F. graminearum* stärker exprimiert wird als in Kontrollpflanzen. Die Hochregulierung ist in SVP72017, insbesondere zum Zeitpunkt 48 h, stärker als in Capo. Die Expression von TDF_076 wurde ebenfalls in G16-92 und Hussar gemessen. In G16-92 ist es zu allen Zeitpunkten nach der Inokulation leicht negativ reguliert. In Hussar hingegen ist es zu allen Zeitpunkten leicht induziert. TDF_076 ist in allen getesteten Genotypen sehr schwach exprimiert.

17a Relative Expression von TDF_076 (NPR1-like)



17b Relative Expression von TDF_076 (NPR1-like)

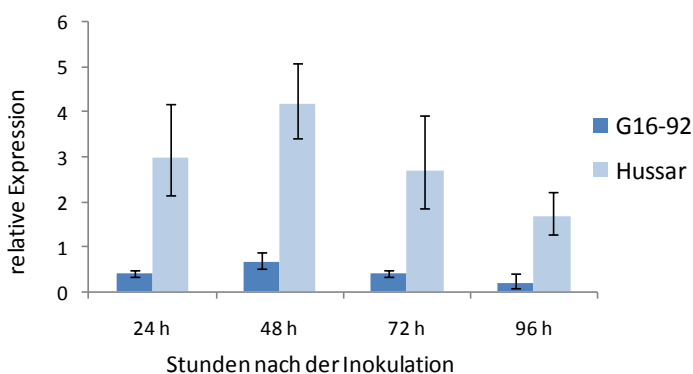


Abb. 17: Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR von TDF_076 in *F. graminearum* infiziertem Blütengewebe von G16-92 (res.) und Hussar (anf.) (Abb. 16a) sowie von SVP72017 (res.) und Capo (anf.) (Abb. 17b).

Real-time PCR der *WIRI*-Sequenzen

TDF_022 (BLAST-Ergebnis: X87686, *Triticum aestivum*, mRNA für *WIRI*, pathogen defense protein; E-value: 6.9 e-86) wurde in cDNA-AFLPs von Hussar als konstitutive, gleich starke Bande identifiziert, die in cDNA-AFLPs von G16-92 fehlt. Es besitzt einen großen Insertions-/Deletions-Polymorphismus im codierenden Bereich des Gens zwischen den Eltern der Kartierungspopulation G16-92/Hussar. Die quantitative Real-time PCR mit den Primern zeigte, dass TDF_022 in beiden Eltern exprimiert wird und nicht nur im anfälligen Hussar (Abb. 18). Die Tatsache, dass die Bande in cDNA-AFLPs von G16-92 nicht zu sehen ist, muss somit auf eine Veränderung der Restriktionsschnittstellen oder auf einen weiteren INDEL-Polymorphismus an einer anderen Stelle des Gens zurückzuführen sein. TDF_022 und die anderen untersuchten *WIRI*-Sequenzen zeigen im Blütengewebe von G16-92 und Hussar eine sehr ähnliche Regulation. Sie sind nach der Inokulation mit *F. graminearum* in G16-92 zu fast allen beprobten Zeitpunkten stärker hochreguliert als in Hussar. Die stärksten Unterschiede zwischen G16-92 und Hussar in der Expression der untersuchten *WIRI*-Sequenzen zeigen sich 72 und 96 Stunden nach der Inokulation.

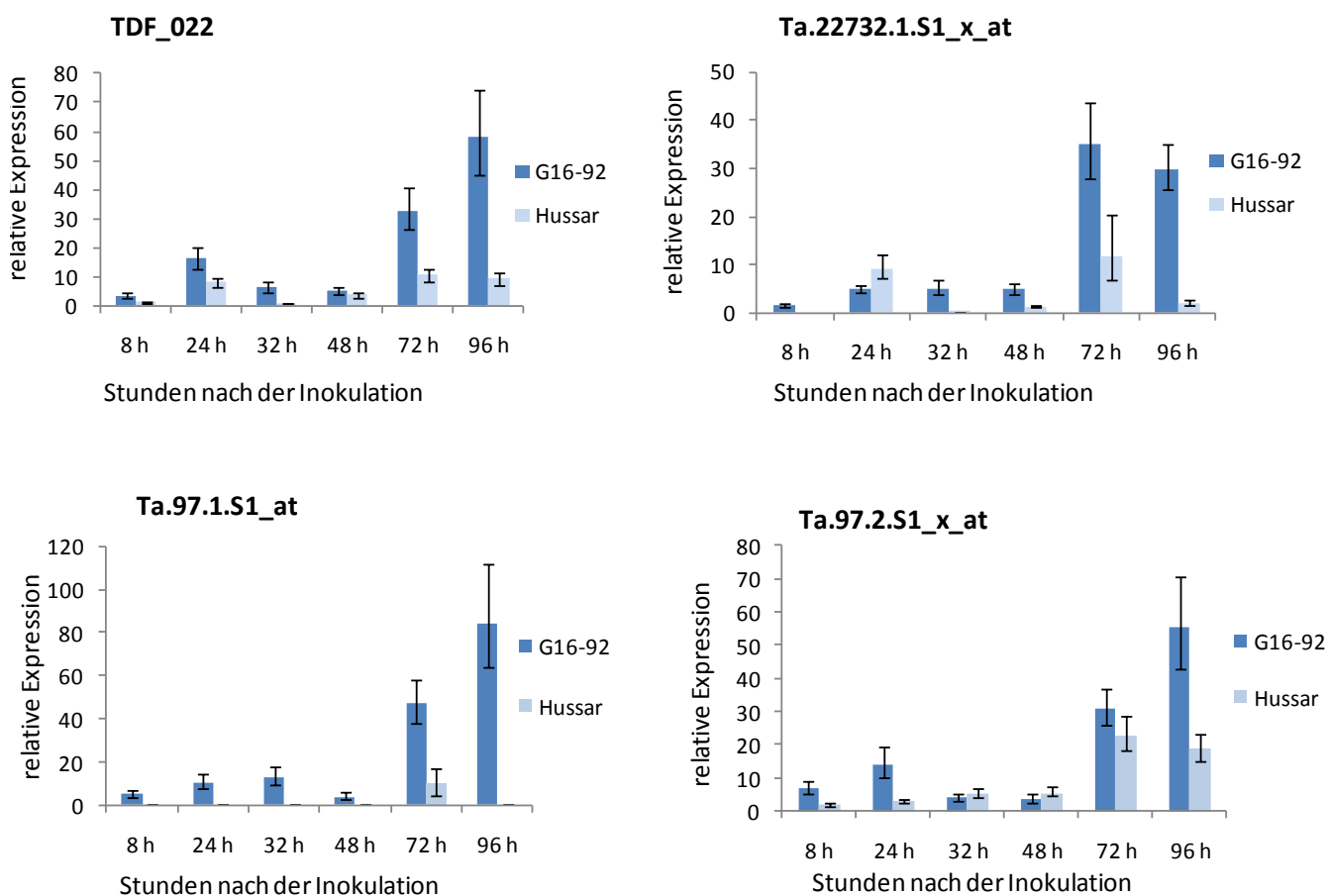


Abb. 18: Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR von 4 *WIRI*-Sequenzen (TDF_022, Ta.22732.1.S1_at, Ta.97.1.S1_at und Ta.97.2.S1_x_at) in *F. graminearum* infizierten Blütengewebe von G16-92 (res.) und Hussar (anf.).

Die quantitative Real-time PCR für TDF_022 und Ta2273.S1_at wurde auch mit cDNA von SVP72017 und Capo durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Induktion der Expression dieser *WIRI*-Gene durch die Fusariuminfektion in diesen Genotypen weniger stark ausgeprägt ist als in G16-92 und sie sich nur wenig unterscheiden (Abb. 19). Auffällig ist jedoch die frühere Induktion in SVP72017 ab 48 hai.

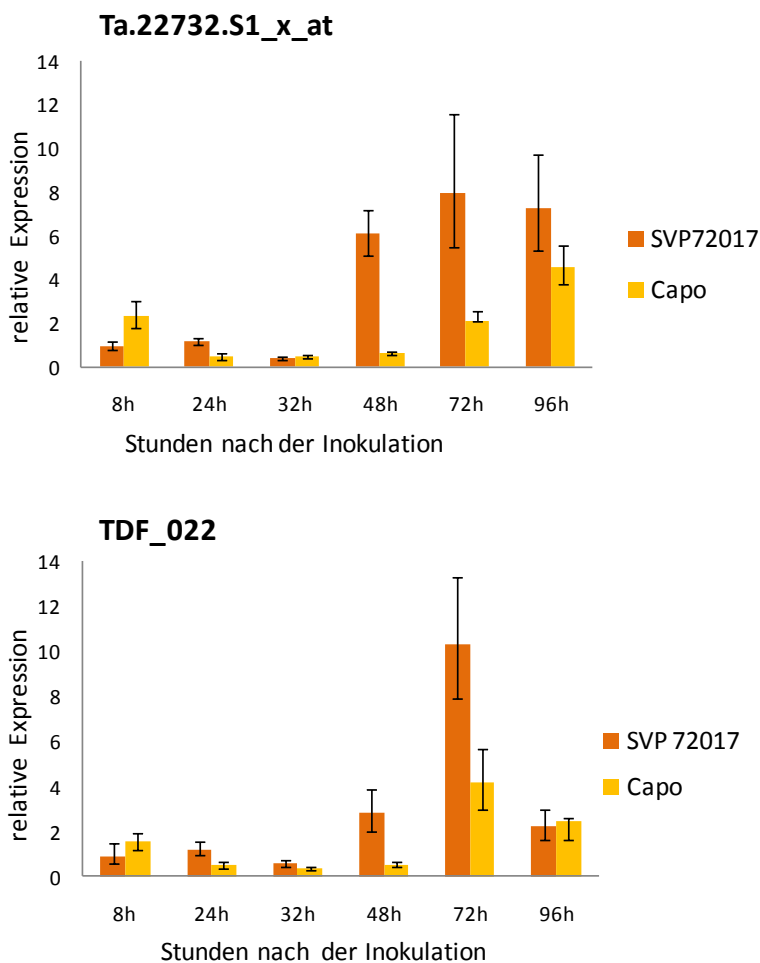


Abb. 19: Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR von TDF_022 (Abb. 18a) und Ta.22732.S1_at (Abb. 18b) in *F. graminearum* infizierten Blütengewebe von SVP72017 (res.) und Capo (anf.).

Auch in Dream und Lynx wurde die Expression von Ta.97.1.S1_at, Ta.97.2S1_x_at, Ta.22732.S1_at und TDF_022 mit quantitativer Real-time PCR untersucht. Die Real-time PCR für TDF_022 und Ta.22732.S1_at wurde dabei von M. Rhiel an der Universität Giessen durchgeführt. Die vier untersuchten *WIRI*-Gene werden in der Ährenfusariose-resistenten Sorte Dream zu den meisten Zeitpunkten nach der Inokulation mit *F. graminearum* stärker exprimiert als in den mock-behandelten Kontrollpflanzen.

Im Gegensatz dazu sinkt die Genexpression aller *WIRI*-Gene in der für Ährenfusariosen anfälligen Sorte Lynx nach der Inokulation mit *F. graminearum* leicht (d.h. relative Expression < 1). In den mock-behandelten Kontrollpflanzen ist die konstitutive Expression dieser Gene in Lynx jedoch deutlich höher als in Dream sowie in allen anderen untersuchten Genotypen.

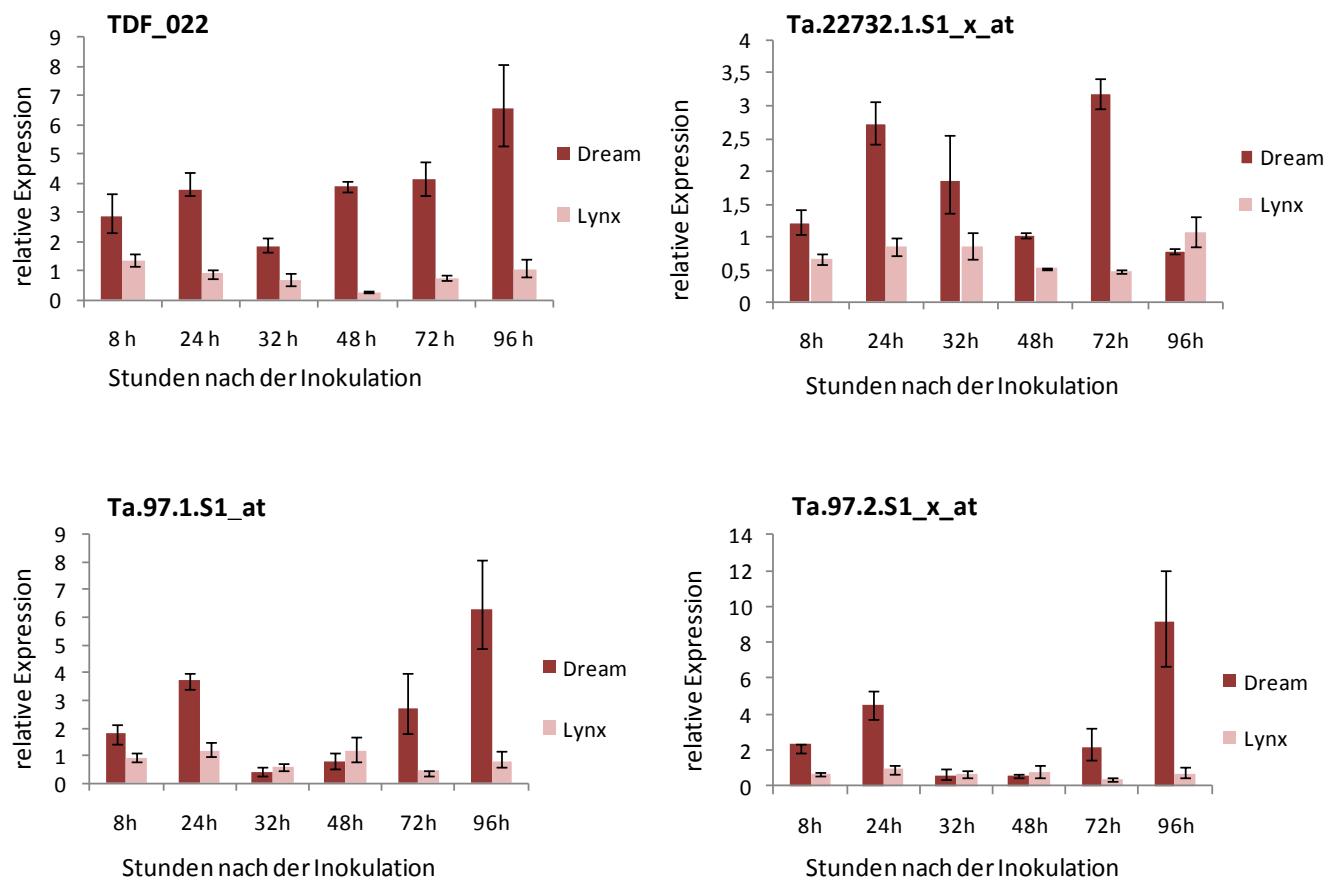


Abb. 20: Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR von 4 *WIRI*-Sequenzen (TDF_022, Ta.22732.1.S1_at, Ta.97.1.S1_at und Ta.97.2.S1_x_at) in *F. graminearum* infiziertem Blütengewebe von Dream (res.) und Lynx (anf.). Nach der Inokulation mit *F. graminearum* wird in Dream die Expression dieser Gene induziert, in Lynx hingegen nimmt sie leicht ab (= relative Expression < 1).

Die Real-time PCR für TDF_022 und Ta.22732.S1_at wurde von M. Rhiel an der Universität Giessen durchgeführt.

TDF_020 (putatives Lipid Transfer Protein)

TDF_020 (BLAST-Ergebnis: DR740066/ *Triticum aestivum* EST mit Ähnlichkeit zu Lipid transfer Protein; E-value: 3.3 e-27) ist in den cDNA-AFLP von mit *F. graminearum* inokulierten Proben von G16-92 32, 48 und 72 hpi zu sehen. Lipid Transfer Proteine werden zu den PR (Pathogenesis Related)-Proteinen gezählt (PR13) (Van Loon and Van Strien 1999). Durch Amplifikation von genomischer DNA von nullitetrasomen Linien von Chinese Spring mit TDF_020 abgeleiteten Primern (Ggram020_x_2, Tabelle 2) konnte das Fragment

Chromosom 4A zugeordnet werden. Eine genauere Kartierung war jedoch nicht möglich, da mit den Primern Ggram020_x_2 nur ein sehr kurzes (90 Bp) großes Fragment ohne Sequenzpolymorphismen zwischen G16-92 und Hussar amplifiziert werden konnte.

In G16-92 und Hussar konnten durch die Validierung mit quantitativer Real-time PCR die Ergebnisse der Expressionsanalyse mit cDNA-AFLP-Analyse vollständig bestätigt werden. TDF_020 ist in Ährgewebe von G16-92 nach der Inokulation mit *F. graminearum* zu allen untersuchten Zeitpunkten stärker exprimiert als in den mock-behandelten Kontrollen. In Hussar hingegen ist TDF_020 so schwach exprimiert, dass lediglich zum Zeitpunkt 72 hpi der Grenzwert überschritten wurde und ein Ct-Wert gemessen werden konnte.

Zum Vergleich der Ergebnisse der Expressionsanalyse in G16-92 und Hussar wurde die Genexpression von TDF_020 in SVP72017 und Capo sowie in Dream und Lynx ebenfalls mit quantitativer Real-time PCR untersucht, auch wenn dieses TDF in den cDNA-AFLPs dieser Genotypen nicht auffällig war.

Hier zeigt sich, dass die Expression von TDF_020, sowohl in Capo, als auch in SVP72017, ab 48 Stunden nach der Inokulation induziert wird. Die Expressionsunterschiede fallen in SVP 72017 und Capo wesentlich geringer aus als in G16-92 und Hussar. Im Blütengewebe von Dream ist die Genexpression von TDF_020 nach der Inokulation mit *F. graminearum* maximal 3-fach hochreguliert. In Lynx wird es jedoch zu keinem Zeitpunkt und in keiner Behandlung exprimiert.

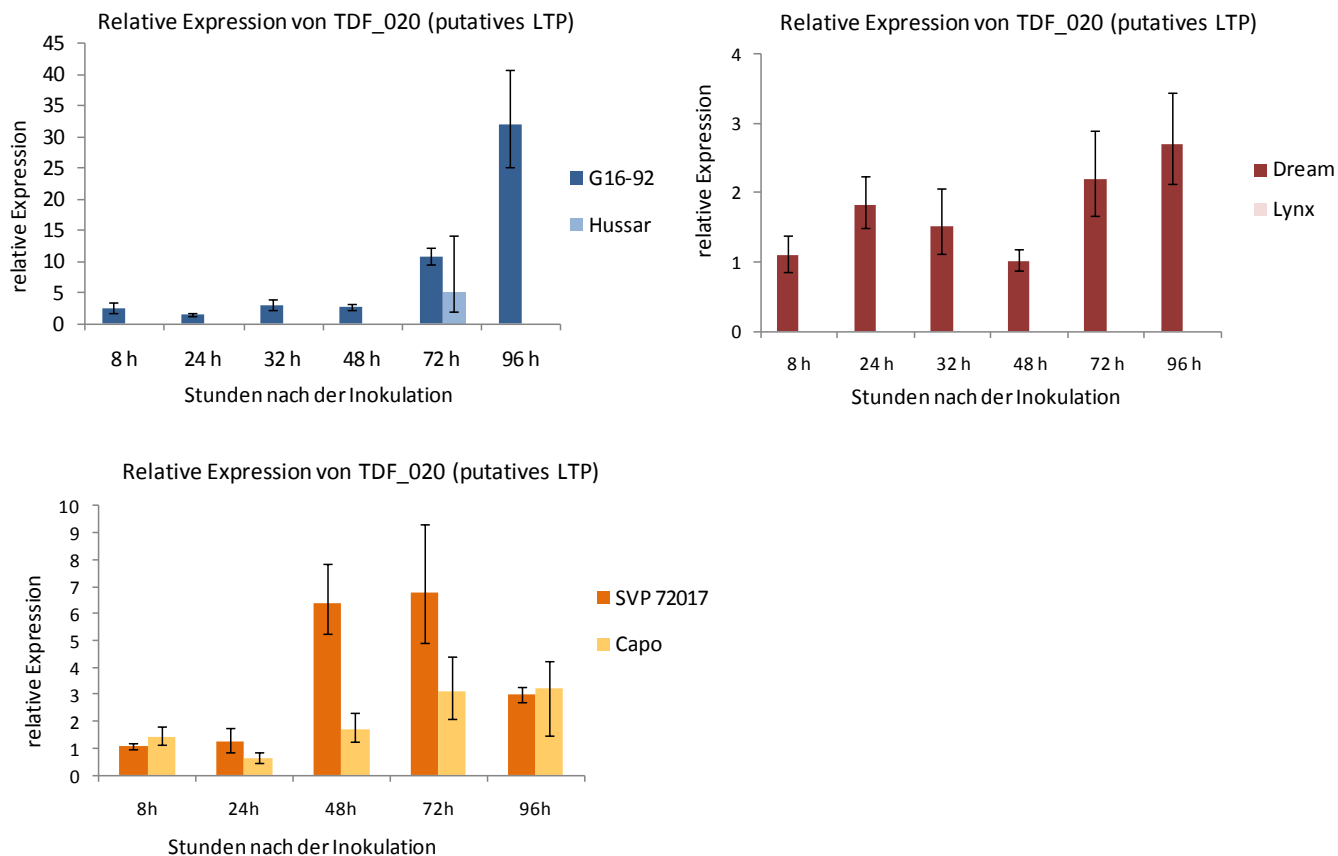


Abb. 21: Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR von TDF_020 (putatives LTP) in *F. graminearum* infizierten Blütengewebe von G16-92, Hussar (Abb. 20a), Dream, Lynx (Abb. 20b) sowie SVP und Capo (Abb. 20c).

Expression von TDF_048

TDF_048 (BLAST-Ergebnis: FJ53237/ *Triticum aestivum*, UDP-Glycosyl transferase cultivar Wangshuibai, E-value 0) wurde in cDNA-AFLP-Analysen bei SVP72017 8, 24, 32 und 48 Stunden als hochreguliert identifiziert. Aufgrund der großen Ähnlichkeit mit einer UDP-Glycosyltransferase, deren Expression auch in der hochresistenten asiatischen Sommerweizensorte Wangshuibai nach der Inokulation mit *F. graminearum* stark induziert ist (Lulin et al. 2009), wurde die Expression von TDF_048 mit quantitativer Real-time PCR validiert. Dabei zeigte sich, dass diese UDP-Glycosyltransferase erst 72 und 96 Stunden nach der Inokulation hochreguliert wird, und das sowohl in SVP als auch in Capo (Abb. 21).

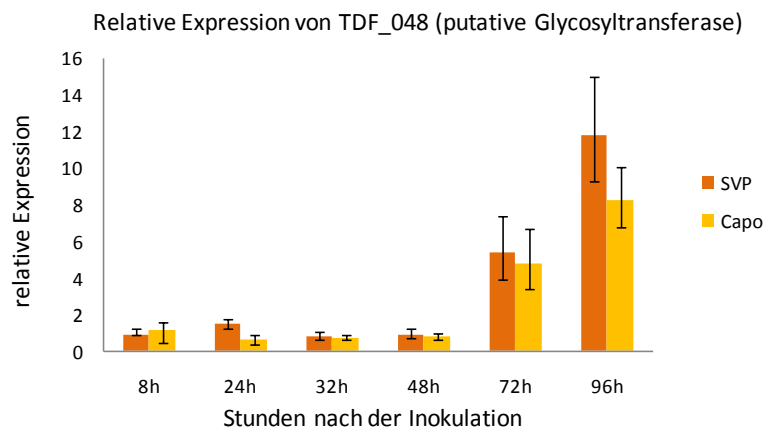


Abb. 22: Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR von TDF_048 (putative Glycosyltransferase) in *F. graminearum* infiziertem Blütengewebe von SVP72017 und Capo.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Expressionsanalyse von Winterweizen nach der Inokulation mit *F. graminearum*, einem wichtigen Erreger der partiellen Taubährigkeit von Getreide, durchgeführt. Das Ziel war es hierbei die Reaktion der adaptierten europäischen Winterweizen auf die Inokulation mit diesem Pilz auf RNA-Ebene zu untersuchen und Unterschiede zwischen anfälligen und resistenten Genotypen aufzuzeigen. Differenziell exprimierte Gene wurden zur Validierung in bereits bestehende genetische Karten integriert.

Im Folgenden werden die gewonnenen Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Daten verglichen und diskutiert. In einem Ausblick wird der Nutzen der wichtigsten Ergebnisse für die Markergestützte Selektion und die Verwendung der Ergebnisse als Basis weiterergahender funktioneller Untersuchungen diskutiert.

4.1. Versuche zur Typ 2-Resistenz

Die bisherigen Aussagen über die Resistenz von G16-92, Hussar, Dream, Lynx, SVP72017 und Capo wurden gewonnen, indem der prozentuale Befall nach einer Sprühinokulation mit *F. graminearum*-Konidien abgeschätzt und hierdurch die kombinierte Typ1- und Typ 2-Resistenz erfasst wurde (Bürstmayr et al. 2000, Schmolke et al. 2005, 2008). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Einzelblüteninokulation eignet sich jedoch besonders für die Evaluierung der Typ 2-Resistenz (Dill-Macky 2003). Der größte Vorteil dieser Inokulationsmethode liegt darin, dass jede Blüte mit der gleichen Menge an Sporensuspension behandelt werden kann. Somit wird durch die Einzelblüteninokulation eine gleichmäßige Induktion von Abwehrmechanismen im Blütengewebe ermöglicht. Beim Öffnen der Blüten kann es jedoch während der Inokulation zu leichten Verletzungen der Spelzen kommen. Zum einen führen diese Verletzungen zu einer Wundreaktion, die wiederum zu veränderten Genaktivitäten führt, zum anderen bilden die kleinen Wunden Eintrittspforten für den Pilz. Aus diesem Grund wurde von jedem Genotyp und Probenahmezeitpunkt eine mit Wasser statt *F. graminearum*-Konidien behandelte Kontrollprobe genommen, die zum Vergleich des Expressionsniveaus in der cDNA-AFLP-Analyse und zur Normalisierung der relativen Expression in der Auswertung der quantitativen Real-time PCR verwendet wurde.

Um die Resistenz der einzelnen Genotypen abschätzen zu können, wurde der Infektionsverlauf im Abstand von zwei bis drei Tagen festgehalten. Zwischen den Eltern der

Kartierungspopulationen zeigten sich hinsichtlich der Anzahl der infizierten Ährchen unterhalb der Infektionsstelle, die im Zeitraum von 18 bis 21 Tagen nach der Inokulation als Ausbreitung festgehalten wurde, statistisch signifikante Unterschiede. Die resistenten Genotypen zeigten eine deutlich geringere Ausbreitung als die als anfällig eingestuft Sorten. Die Ergebnisse von Sirandidou et al. (2003), die in resistenten europäischen Winterweizensorten eine leichte bis gute Typ 2-Resistenz feststellen konnten, werden hier bestätigt. Die Sorte Capo ist dabei eine Ausnahme, da sie in der beschreibenden Sortenliste mit einer mittleren bis guten Fusariumresistenz eingetragen ist, sich jedoch in der Ausbreitungsresistenz nicht von den hochanfälligen Sorten Hussar und Lynx unterschied. Wahrscheinlich beruht die Resistenz von Capo größtenteils auf Typ1-Resistenzmechanismen, die durch die Einzelblüteninokulationstechnik umgangen werden. Zwischen den resistenten Genotypen wurden Unterschiede im Verlauf der Ausbreitung beobachtet. Bei G16-92 und Dream bleichte unterhalb der Infektionsstelle jeweils ein Ährchen nach dem anderen aus, bei SVP72017 hingegen fand entweder keine Ausbreitung statt oder die gesamte Ähre trocknete ab dem ca. 18. Tag nach der Inokulation plötzlich ab. Dies könnte auf Unterschiede im Mechanismus der Typ 2- Resistenz zwischen SVP72017 auf der einen und Dream oder G16-92 auf der anderen Seite hindeuten. In SVP72017 scheint es dem Pilz häufig nicht zu gelingen, in die vaskulären Bündel der Rachis einzudringen. Wahrscheinlich ist er nicht in der Lage eine Barriere an der Rachilla zu durchbrechen. Wenn er jedoch die Rachis erreicht hat, schädigt er dort das Gewebe stark, was schließlich zum Absterben der ganzen Ähre führt. Inwieweit diese Schädigungen auf die Wirkung von DON zurückzuführen sind, kann mit dem verwendeten Versuchsansatz nicht geklärt werden. Taube Ährchen oberhalb der Infektion wurden bei der Abschätzung der Ausbreitungsresistenz nicht berücksichtigt, da diese auch durch das Absterben der Rachis und daraus resultierendem Wassermangel entstehen können.

4.2. Die Expressionsanalyse mit der cDNA-AFLP-Technik

Um die Genexpression im Ährengewebe von anfälligen und resistenten Weizensorten nach der Inokulation mit *F. graminearum* untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der cDNA-AFLP-Analyse verwendet. Die Vorteile der cDNA-AFLP-Technik liegen in ihrer guten Reproduzierbarkeit und der Möglichkeit, mit dieser Technik die Expression sowohl schwach exprimierter als auch noch nicht auf einem Microarray geblotteter Gene zu untersuchen. Letzteres ist darauf zurückzuführen, dass bei den cDNA-AFLPs im Gegensatz zu Array basierten Methoden keine Vorauswahl an ESTs getroffen wird. Auch lässt sich eine

größere Anzahl von Proben, die von verschiedenen Zeitpunkten oder Genotypen stammen, parallel auf einem Gel untersuchen. Dies ermöglicht sowohl einen guten Überblick über den Verlauf der Genexpression zu unterschiedlichen Stadien der Wirt-Parasit-Interaktion als auch gute Vergleichsmöglichkeiten zwischen den Genotypen. Nachteile der cDNA-AFLP sind der große Arbeitsaufwand, da die differentiell exprimierten Fragmente ausgeschnitten, kloniert und sequenziert werden müssen, sowie die geringe Länge der cDNA-Fragmente, die meistens zwischen 150 und 500 Basen liegen. Die Anzahl der Gene, deren Expression mit cDNA-AFLP untersucht werden kann, liegt deutlich unter der Anzahl von Genen, die auf modernen Microarrays geblottet sind. Durch eine Transkriptomsequenzierung mit Next Generation Sequencing Plattformen, wie z.B. die 454 oder Solxa, könnten theoretisch alle exprimierten Gene eines Organismus erfasst werden. Diese Methoden liefern in kurzer Zeit sehr viele Daten, sind jedoch sehr teuer. Daher eignet sich der Einsatz dieser Methoden vor allem für Versuche, bei denen nur wenige Varianten miteinander verglichen werden müssen. Bei einem Versuchsansatz wie er in der vorliegenden Arbeit gewählt wurde, müssten von 78 Einzelproben entsprechende cDNA-Banken erstellt und diese anschließend sequenziert werden. Die Kosten hierfür würden über 100.000 Euro betragen. Da in dieser Arbeit zum ersten Mal eine Expressionsanalyse von Winterweizen nach der Inokulation mit *F. graminearum* durchgeführt wurde, war nicht bekannt, welcher Zeitpunkt nach der Inokulation am wichtigsten für die Expression resistenzrelevanter Gene ist. Daher wäre die Gefahr groß gewesen, bei der Untersuchung von lediglich einem oder zwei Probenahmezeitpunkten die Expression wichtiger Gene nicht erfassen zu können.

Die Anzahl von durchschnittlich 55 cDNA-AFLP-Banden für das Enzymsystem *Sse8387I/MseI* und 85 Banden für *PstI/MseI* ist mit der von Steiner et al. (2009) erreichten Bandendichte vergleichbar, die eine cDNA-AFLP Analyse mit asiatischem Sommerweizen nach der Inokulation mit *F. graminearum* durchgeführt hatten. Die Unterschiede in der Anzahl der Banden zwischen den Enzymsystemen sind auf die längere Erkennungssequenz von *Sse8387I* und damit auf die geringere Anzahl von Schnittstellen zurückzuführen. Aufgrund der geringen Anzahl an differentiellen Banden wurde für SVP72017 und Capo auf die Durchführung von cDNA-AFLP mit dem Enzymsystem *Sse8387I/MseI* verzichtet.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle cDNA-AFLP-Fragmente analysiert, deren Expression sich in den *F. graminearum* infizierten Proben im Vergleich zu den wasserbehandelten Kontrollen des gleichen Probenahmezeitpunktes unterschied. Dabei konnte vorerst nicht

unterschieden werden, ob die TDFs vom Weizen oder vom Pilz stammen, so dass eine größere Anzahl an Genfragmenten von *F. graminearum* sequenziert wurde.

Bei den vom Weizen stammenden TDFs haben 40 % eine Sequenzähnlichkeit mit Genen bekannter Funktion. Dieser Wert stimmt mit den Ergebnissen von kürzlich veröffentlichten Studien, in denen cDNA-AFLP-Analysen mit Weizen durchgeführt wurde, überein (Wang et al. 2009, Steiner et al. 2009, Capman et al. 2009, Wang et al. 2010). Die meisten TDFs besitzen starke Sequenzhomologien zu Weizen EST aus Datenbanken. Lediglich 5 TDFs besitzen keine Homologien zu bereits in Datenbanken hinterlegten Sequenzen.

Im Gegensatz zum Weizen ist das Genom von *F. graminearum* bereits vollständig sequenziert. Daher besitzen alle vom Pilz stammenden TDFs eine nahezu vollständige Sequenzübereinstimmung mit Genen bekannter Funktion. Diese TDFs werden jedoch im Weiteren nicht näher diskutiert.

Rückkartierung in bestehende QTL für Ährenfusarioseresistenz

Für die Rückkartierung von Genfragmenten in bestehende genetische Karten ist es notwendig, innerhalb dieser Sequenz einen Polymorphismus zwischen den Eltern einer Kartierungspopulation zu finden, aus dem ein Marker für die Genotypisierung der Linien abgeleitet werden kann. In lediglich 5 der 39 Genfragmente aus der cDNA-AFLP-Analyse, von denen die jeweils genomische Sequenz zweier Populationseltern gewonnen werden konnte, wurden Polymorphismen zwischen den Sequenzen der Eltern indentifiziert. Dies ist zum größten Teil auf die häufig geringe Länge der cDNA-AFLP Fragmente zurückzuführen, die im Mittel bei 280 Basen lag. Auch wenn dies berücksichtigt wurde, lag die Anzahl der Polymorphismen innerhalb der in dieser Arbeit untersuchten Fragmente deutlich unter den Angaben von Sommers et al. (2003), die in EST-Sequenzen von Weizen durchschnittlich einen Polymorphismus in 500 Basen nachweisen konnten. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die ungleichmäßige Verteilung von Polymorphismen zwischen ESTs, die ebenfalls von Sommers et al. (2003) gezeigt wurde. Während in den untersuchten TDFs aus der cDNA-AFLP-Analyse nur wenige Sequenzpolymorphismen gefunden werden konnten, ließen sich alle drei zusätzlich untersuchten *WIR1*-Genfragmente in die genetischen Karten integrieren.

Die Rückkartierung der differentiell exprimierten Genfragmente in bestehende genetische Karten wurde durchgeführt, um feststellen zu können, ob die Fragmente mit bereits identifizierten QTL für Ährenfusarioseresistenz colokalisieren. Bei der Suche nach den Genen, die einem QTL zugrunde liegen, ist die Colokalisierung von Gen und QTL eine erste

Bedingung, wenn auch kein Beweis dafür, dass es sich wirklich um das gesuchte Gen handelt. In der vorliegenden Arbeit colokalisieren vier Genfragmente mit QTL für Ährenfusarioseresistenz und vier weitere Genfragmente kartieren in genomische Bereiche, in denen kein QTL für dieses Merkmal identifiziert werden konnte. Erstere werden als besonders interessante Kandidatengene betrachtet, jedoch können letztere für die Resistenz von Weizen gegenüber *F. graminearum* trotzdem von Bedeutung sein. Die Populationen, mit denen die vorangehenden QTL-Kartierungen durchgeführt wurden, besitzen zwischen 90 (Sng3559/SVP72017) und 145 Linien (Dream/Lynx). Mit Populationen dieser Größe können QTL mit einem großen Einfluss auf die phänotypische Varianz kartiert werden. QTL, die einen geringeren Einfluss auf die phänotypische Varianz besitzen, können jedoch erst in Populationen mit mindestens 1000 Linien sicher erkannt werden (Schön et al. 2004). Es besteht somit die Möglichkeit, dass ein kartiertes Gen zwar einen Einfluss auf die Ährenfusarioseresistenz besitzt, der Effekt jedoch zu gering ist, um in QTL-Analysen der zur Verfügung stehenden Populationen erkannt zu werden.

Die Regulation der meisten Gene wird durch die Induktion oder Hemmung von bestimmten Signaltransduktionswegen verursacht. Daher ist die Ursache für die unterschiedliche Genexpression in verschiedenen Genotypen auf Polymorphismen in regulatorischen Genen zurückzuführen, die in den Signaltransduktionskaskaden vor dem differentiell exprimiertem Gen stehen.

4.3. Differentiell exprimierte Gene des Weizens nach *F. graminearum*-Inokulation

In der vorliegenden Arbeit konnten durch Expressionsanalysen 87 verschiedene Genfragmente gefunden, die im Ährengewebe der untersuchten Winterweizengenotypen nach der Inokulation mit *F. graminearum* differentiell exprimiert wurden. Im Folgenden wird eine Auswahl dieser Genfragmente näher diskutiert, bei denen es entweder basierend auf der Genfunktion oder durch eine Colokalisierung mit QTL für Ährenfusarioseresistenz Hinweise gibt, dass sie an der Abwehr von Weizen gegenüber *F. graminearum* beteiligt sein könnten. Dabei werden die TDFs in Gruppen, die einen möglichen Abwehrmechanismus der Weizenpflanzen gegenüber *F. graminearum* darstellen könnten, zusammengefasst diskutiert.

4.3.1. Basale Pathogenabwehr an der Zellwand oder im Apoplasten

Die basale Resistenz wird als eine rassenunspezifische Resistenz definiert, die den Krankheitsverlauf in Wirtspflanzen abschwächt (Hückelhoven 2007). Sie setzt eine Erkennung des Pathogens voraus und führt zu unspezifischen Abwehrmechanismen, die gegen eine Vielzahl von Pathogenen wirksam sein können, jedoch den Infektionsverlauf nicht vollständig stoppen. Es wird daher angenommen, dass es sich bei den QTL für Pathogenresistenz zum Teil um Gene handelt, die an der basalen Resistenz beteiligt sind (Poland et al. 2008). Da die basale Resistenz in ihren Mechanismen der Nicht-Wirtsresistenz ähnelt, die zu einer kompletten Resistenz gegenüber einem Pathogen führt, wird diskutiert, ob es sich bei der basalen Resistenz um eine durch das Pathogen umgangene und daher unvollständige Nicht-Wirtsresistenz handelt (Niks und Marcel 2009). Gene, die an der Ausprägung der basalen Resistenz beteiligt sind, könnten eine quantitative Resistenz gegenüber mehreren verschiedenen Pathogenen vermitteln und wären daher interessant für die Züchtung von Weizensorten mit einer breiten Krankheitsresistenz. Da im Weizen keine vollständige Resistenz gegenüber Ährenfusariosen bekannt ist, sind alle Genotypen im unterschiedlichen Maße anfällig. Die in dieser Arbeit untersuchten Weizengenotypen unterscheiden sich jedoch deutlich in der Schwere und der Geschwindigkeit des Krankheitsverlaufs. Es ist daher anzunehmen, dass sie im unterschiedlichen Maße basale Resistenzmechanismen ausprägen. Zu diesen Mechanismen zählt vor allem die Verstärkung der Zellwand und die Ausscheidung von antifungalen Substanzen in den Apoplasten (Hückelhoven et al. 2007). Im folgenden Abschnitt werden die differentiell exprimierte TDFs besprochen, die an solchen basalen Abwehrmechanismen beteiligt sein könnten.

WIRI-Gene

Eine Gruppe von Genen, die mit der Ausprägung von basaler Resistenz von Gräsern in Verbindung gebracht werden, sind die *WIRI*-Gene (Wheat Induced Resistance 1 Gene). Es wurde wiederholt gezeigt, dass deren Expression nach der Inokulation von Gräsern mit verschiedenen Pilzen sowie bei Befall mit Fraßinsekten ansteigt (Bull et al. 1992, Schweizer et al. 1998, Neu et al. 2003, Yuan et al. 2004). TDF_022, welches durch die cDNA-AFLP-Analyse identifiziert wurde, besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu einem *WIRI*-Gen. Die Funktion der *WIRI*-Gene ist noch weitgehend unbekannt. Aufgrund ihrer Struktur wird jedoch angenommen, dass es sich bei ihnen um kleine Transmembranproteine handelt, deren polare N-terminale Domäne zum Zytoplasma ausgerichtet ist, während eine unpolare C-terminale Domäne durch Prolin und Glycinreste mit der Zellwand interagiert (Bull et al. 1992). *WIRI*-

Gene könnten die Adhäsion des Plasmalemmas mit der Zellwand verbessern und somit zur Stabilität des Plasmalemmas während des Pathogenangriffs beitragen (Bull et al. 1992). Eine Loslösung des Plasmalemmas von der Zellwand während des Angriffs von *F. graminearum* wurde in elektronenmikroskopischen Aufnahmen in der anfälligen Sorte Agent gezeigt, während diese Symptome in der resistenten Sorte Arina seltener auftraten. Diese Schädigungen werden wahrscheinlich durch das Mycotoxin Deoxynivalenol ausgelöst (Kang und Buchenauer 1999). Im Weiteren besteht eine Ähnlichkeit von *WIR1*-Genen mit den prolin-, hydroxyprolin- und glycinreichen Zellwandproteinen, wenn sie auch nicht zu dieser Gruppe gezählt werden können (Bull et al. 1992). Prolinreiche Glycoproteine akkumulieren in der Zellwand der resistenten Sorte Arina drei Tage nach Inokulation, zum gleichen Zeitpunkt also, in dem die untersuchten *WIR1*-Gene hochreguliert werden (Kang und Buchenauer 2003).

WIR1-Gene wurden zum ersten Mal in der inkompatiblen Interaktion von Weizen mit *Blumeria graminis f. sp. hordei* beschrieben, einem Pathogen, durch das in Weizen eine induzierte Resistenzreaktion ausgelöst wird. Eine Hochregulierung von *WIR1* wurde jedoch auch in der kompatiblen Interaktion mit *B. graminis f. sp. tritici* nachgewiesen (Schweizer et al. 1989). Eine Überexpression von *WIR1* in Epidermiszellen des Weizens konnte die Resistenz gegenüber Mehltau nicht signifikant verbessern (Schweizer et al. 1999).

Auch in Gerste wurden *WIR1*-Homologe nachgewiesen. Diese werden während der Nichtwirt-Interaktion von Gerste mit *Puccinia triticina*, sowohl in einem Wildtyp der Gerste als auch in Mutanten, die ihre Nicht-Wirts Resistenz verloren haben, hochreguliert, wobei die Reaktion in Ersterer stärker ausfällt (Neu et al. 2003). Diese Ergebnisse festigen die Vermutung, dass *WIR1*-Gene in der basalen Abwehr und der Nicht-Wirtreaktion eine wichtige Rolle spielen (Neu et al. 2003).

In Reis führt die Überexpression des *WIR1*-Homologs *Rir1* (Rice Induced Resistance) zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem hemibiotrophen Parasiten *Magnaporthe grisea* (Schaffrath et al. 2000). Dieses Ergebnis ist besonders interessant, weil dieses Pathogen in seiner Lebensweise *F. graminearum* stärker ähnelt, als die obligat parasitären Mehltaupilze. Die Signaltransduktionswege zur Abwehr gegen nekrotrophe Pilze werden vorwiegend durch Ethylen und Jasmonat vermittelt (Glazebrook 2005). Es konnte zudem gezeigt werden, dass *Rir1* künstlich durch die Behandlung mit Ethaphon induziert werden kann, aber nicht durch Methyljasmonat oder Salicylsäure (Yuan et al. 2004) und somit wohl am Ende einer ethylenvermittelten Signaltransduktion steht. Die Hochregulation von Jasmonat und Ethylen Biosynthese- sowie Signaltransduktionsgenen während der Abwehr von *F. graminearum*

konnte für die resistente Sorte Sumai3 gezeigt werden (Li und Yen 2008). Die Frage, ob sich die Ethylen-Signaltransduktion positiv (Li und Yen 2008) oder negativ (Chen et al. 2009) auf die Fusariumresistenz auswirkt, ist noch nicht eindeutig geklärt.

Die Expression von TDF_022 wurde in den Winterweizengenotypen G16-92, Hussar, Dream, Lynx, SVP72017 und Capo untersucht. Da dieses Genfragment in den resistenten Genotypen G16-92 und Dream im Vergleich zu den jeweils anfälligen Genotypen Hussar und Lynx nach der Inokulation mit *F. graminearum* starke Expressionsunterschiede zeigte, wurden weitere *WIRI*-Gene sowohl auf Polymorphismen in der genomischen Sequenz als auch auf Expressionsunterschiede im Blütengewebe nach der Inokulation mit *F. graminearum* untersucht. Diese *WIRI*-Sequenzen stammen von einem Affimetrix Chip (61K), der von der Kooperationsgruppe der Universität Gießen verwendet wurde. Die Auswertung der Expressionsanalyse mit dem Microarray war zum Abgabezeitpunkt der Dissertation noch nicht vollständig abgeschlossen. Die Expressionsmuster dieser *WIRI*-Gene ähneln dem von TDF_022 stark (Abb.18-20). In G16-92, Hussar, Dream, SVP72017 und Capo ist die Expression der untersuchten *WIRI*-Gene deutlich zu den Zeitpunkten 72 und 96 hai, in SVP72017 bereits schon zu 48 hai induziert. In den resistenten Genotypen sind dabei alle *WIRI*-Gene stärker hochreguliert als in den anfälligen Populationseletern. Zum Zeitpunkt 48 hai sollte das Pathogen bereits Epidermiszellen infiziert haben und damit beginnen, das Wirtsgewebe zu kolonisieren. 72 und 96 hai sind erste Symptome an den Spelzen sichtbar und der Pilz versucht in die Rachis zu gelangen, um sich weiter in der Ähre auszubreiten (Kang und Buchenauer 2000). Während dieser Infektionsstadien sind somit Teile des Wirtsgewebes bereits zerstört, was zu starken Stressreaktionen führen muss. Zudem ist es sehr wahrscheinlich, dass dies die Zeitpunkte sind, zu denen die Abwehrreaktion gegen das Eindringen des Pilzes in die Rachilla stattfinden. Da sich die Eltern der Kartierungspopulationen stark in der Ausbreitungsresistenz unterscheiden, wäre eine Rolle der *WIRI*-Gene in der Ausbreitungsresistenz denkbar.

In einem weiteren, unabhängigen Versuch konnten die beschriebenen Expressionsmuster der *WIRI*-Gene in den Genotypen G16-92, Hussar, Dream und Lynx weitgehend bestätigt werden, obwohl Unterschiede in der Zusammensetzung des beprobten Pflanzenmaterials bestanden (Proben des zweiten Versuchs enthalten die Ovarien und Antheren, Organe, die bei der Probenahme im ersten Versuch entfernt wurden). Die Induktion der *WIRI*-Genexpression 72 und 96 Stunden nach der Inokulation mit *F. graminearum* fiel im Vergleich zu Kontrollproben in allen untersuchten Genotypen stärker aus als im ersten Versuch. Jedoch waren alle

untersuchten *WIRI*-Gene in den resistenten Genotypen 72 und 96 sind wesentlich stärker hochreguliert als in den anfälligen Genotypen (Diethelm et al., eingereicht).

Die beschriebenen differentiell exprimierten *WIRI*-Gene konnten anhand von Sequenzpolymorphismen in die QTL-Karten der Populationen Dream/Lynx und G16-92/Hussar rückkartiert werden. Im Vergleich mit den übrigen 42 TDFs aus dieser Arbeit, von denen eine genomische Sequenz vorliegt und von denen in nur vier Polymorphismen zwischen den Eltern der Kartierungspopulationen enthalten, sind die untersuchten *WIRI*-Gene stark polymorph.

TDF_022 und Ta.97.1.S1_at, das als *WIR1b* annotiert ist, wurden in der Population G16-92 eine Region auf Chromosom 5D kartiert, in der in dieser Population kein QTL für FHB-Resistenz detektiert wurde. In der gleichen Region von Chromosom 5D beschreiben Holzapfel et al. (2008) und Jia et al. (2006) einen QTL für FHB Resistenz in den Populationen Solitär/Travix sowie Wangshuibai/Alondra-S. Die Gen-Fragmente Ta.97.2.S1.x_at und Ta.22732_x_at, die beide als *WIR1a* annotiert sind, kartieren in das QTL-Intervall für Ährenfusarioseresistenz der Population Dream/Lynx auf dem kurzen Arm von Chromosom 7B. Dieser QTL erklärt in der Population 21% der phänotypischen Variation der FHB-Resistenz (Schmolke et al. 2005, Häberle et al. 2007).

Lipid Transfer Protein

In der Expression von TDF_020 (putatives Lipid Transfer Protein) bestehen extreme Unterschiede zwischen den untersuchten anfälligen und resistenten Genotypen. Lipid Transfer Proteine sind kleine, ubiquitär in Pflanzen vorkommende Proteine, die in den Apoplasten ausgeschieden werden (Yaets and Rose 2008). Die genaue Rolle, die LTPs in der Pflanze spielen, ist noch nicht vollständig geklärt. LTPs werden zu den PR-Proteinen (PR-14) gezählt (Van Loon and Van Strien 1999), da sie häufig in Wirt-Parasit-Interaktionen von Seiten der Pflanze hochreguliert werden und für einige Vertreter dieser Genfamilie eine direkte antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden konnte, so z.B. bei LTPs von der Zwiebel (Cammune et al. 1995) und der Sonnenblume (Regente 2000). LTPs werden auch nach abiotischem Stress hochreguliert, wie z.B. nach Kälte- und Salzstress (Kader 1996).

Zusätzlich zu den Ergebnissen für TDF_020 in der vorliegenden Arbeit wurden LTPs in der asiatischen Resistenzquelle Sumai3 (Hill-Ambroz et al. 2006) und in der anfälligen Sorte Remus (Steiner et al. 2009) nach der Inokulation mit *F. graminearum* hochreguliert. Neuere Untersuchungen an LTPs, die aus Weizen kloniert wurden, zeigten, dass einige Vertreter dieser

Genfamilie eine direkte Wirkung gegen *F. graminearum* besitzen. Sie sind dabei in der Lage, die Sporenkeimung und auch das Pilzwachstum *in vitro* zu hemmen und die Plasmamembranen der dünnwandigen Fusarium-Konidien stark zu schädigen (Sun et al. 2008). Das LTP *LTP3F1* wurde aus einer cDNA-Bank des Sommerweizen-Genotyps Sumai3, die zuvor mit *F. graminearum* inokuliert wurde, kloniert und auf seine antifungale Wirkung getestet. Dieses Protein zeigt eine breite *in vitro*-Aktivität gegenüber sieben pflanzenpathogenen Pilzen, u.a. die nekrotrophen Pilze *Alternaria sp.* und *Botrytis cinerea*. Versuche zur Überexpression von *LTP3F1* in Tabak erhöhte dessen Resistenz gegenüber *Bipolaris oryzae*, *Cylindroclavium scoparium* und *Alternaria sp.*. Über die Wirkung dieses LTP gegenüber den Erregern der Ährenfusariose gibt die Studie jedoch keine Auskunft (Kirubakaran et al., 2008).

Einige Vertreter der LTP-Familie sind am Transport oder der Signaltransduktion der Phytohormone Jasmonat und Salicylsäure beteiligt und beeinflussen auf diese Weise die Resistenz von Pflanzen gegenüber verschiedenen Pathogenen (Maldonado et al. 2002, Roy-Barman 2006, Girault 2008).

Die Ergebnisse der genannten Studien zeigen, dass zumindest einige Angehörige der LTP-Familie eine graduelle, quantitative und breite Resistenz gegenüber biotrophen und auch nekrotrophen Pathogenen vermitteln können.

In Gerste werden LTPs nach der Infektion mit den Erregern der Ährenfusariose stark hochreguliert (Petti et al. 2010). Da sich *LTP1* aus Gerste, welches in Pilz-befallenen Körnern in hohen Konzentrationen gebildet wird, sich sehr negativ auf die Schaumqualität des Bieres auswirkt, stellt die Hochregulierung der LTPs ein großes Problem beim Befall von Braugerste mit Pilzen, vor allem mit Fusarien, dar (Hipelli und Elstner 2002). Bis jetzt sind jedoch noch keine Berichte über eine negative Beeinflussung der Qualitätseigenschaften von Weizen durch LTPs in Fusarium-infizierten Körnern bekannt.

Mit Hilfe von nullitetrasomen Linien konnte TDF_020 auf Chromosom 4A kartiert werden, einem Chromosom, auf dem in keiner der untersuchten Populationen ein QTL für Ährenfusarioseresistenz gefunden wurde. Da TDF_020 nach der Inokulation mit *F. graminearum* in den resistenten Weizengenotypen G16-92, SVP72017, Dream und Capo hochreguliert wird, und in den anfälligen Sorten Hussar und selbst mit der quantitativen Real-time PCR kaum detektierbar ist, ist anzunehmen, dass sich der Polymorphismus im regulatorischen Bereich befindet und daher nicht unbedingt mit dem LTP colokalisieren muss.

Es wäre es denkbar, dass dieses LTP zu einem Pool an antifungalen apoplastischen Peptiden gehört, wie z.B. auch die Thionine, die bereits in der Zellwand der resistenten Sorte Arina nach *Fusarium*-Inokulation nachgewiesen werden konnten (Kang und Buchenauer 2003). Diese apoplastischen Peptide stellen eine erste Hürde für Pilze dar und könnten dadurch eine breitgefächerte, unspezifische Resistenz vermitteln.

Zellwandverstärkung

F. culmorum befällt die Wirtszellen meist durch das mechanische Durchbrechen der Zellwände mit Hilfe eines Apressoriums ab ca. 36 Stunden nach der Inokulation (Kang und Buchenauer 2000). Eine mögliche Abwehrstrategie, um das Pathogen am Eindringen in das Gewebe und an der Ausbreitung zu hindern, stellt somit die Verstärkung der Zellwand und die Einlagerung von Abwehrproteinen in die Zellwand dar. In den cDNA-AFLP-Profilen der sechs untersuchten Weizengenotypen könnten 6 der 33 Genfragmente, die eine Ähnlichkeit mit Genen bekannter Funktion besitzen, an einer solchen Abwehr beteiligt sein. Neu gebildetes Zellwandmaterial wird entlang des Zytoskeletts der Zellen transportiert. Da die meisten TDFs, die mit dem Aufbau des Zytoskeletts in Verbindung stehen, sowohl in anfälligen, als auch in resistenten Genotypen hochreguliert werden, scheint es sich um eine allgemeine und unspezifische Reaktion auf den Pathogenangriff zu handeln. Wichtig ist zudem, dass diese Genfragmente zwischen 8 hai und 32 hai hochreguliert werden, den frühen Zeitpunkten also, in denen der Pilz noch nicht in das Wirtsgewebe eingedrungen ist.

Das Zytoskelett selbst besteht aus einem Gerüst aus Aktinfilamenten und Mikrotubuli. Während der Zellwandsynthese richten sich die Zellulosesynthasekomplexe entlang der kortikalen Mikrotubuli innerhalb des Plasmalemmas aus, so dass die neu gebildeten Zellulosefibrillen zum Zellwandaufbau parallel zu den Mikrotubuli verlaufen (Peredez et al. 2006). Eine Hochregulierung von beteiligten Genen könnte somit auf eine Verstärkung der Zellwandsynthese hindeuten. Beta Tubulin 5 (TDF_132), das in SVP72017 und Capo nach der Inokulation mit *F. graminearum* hochreguliert wird, ist ein struktureller Bestandteil der Mikrotubuli. In G16-92 und auch in Capo werden schon ab 8 hai, einem Zeitpunkt zu dem die *Fusarium*-Konidien gerade auskeimen (Kang und Buchenauer 1999), zwei TDFs mit Ähnlichkeit mit LUE1-Genen hochreguliert (TDF_023, TDF_064). Mit Lue-1 wird ein Halbzwerger-Phänotyp von *A. thaliana* bezeichnet, der auf eine Mutation eines Katanin p60 Proteins zurückzuführen ist. Dieses Protein ist für eine Gibberellin-gesteuerte Ausrichtung der Zellulosefibrillen beim Zellwandaufbau notwendig (Bouquin et al. 2002). Katanine sind dabei für das Schneiden der Mikrotubuli, für deren Transport und für die Einhaltung ihres parallelen

Verlaufs wichtig (Baas et al. 2005, Loyd und Chen 2008). COBRA-like-Proteine (TDF_009), die in der Plasmamembran verankert sind, scheinen ebenfalls essentiell für den Aufbau einer stabilen Zellwand zu sein. Es wird angenommen, dass sie eine Rolle in der Verteilung von Lignin und Zellulose in der Zellwand spielen und damit die Stabilität der Zellwand erhöhen (Sindhoo et al. 2002).

Das Aktin-Zytoskelett ist u.a. am Transport von Zellwandbestandteilen beteiligt. Dabei kommt dem Phospholipid Phosphatidylinositol eine Schlüsselrolle zu, da es an der Aktivierung von Aktin-assoziierten Proteinen beteiligt ist und so die Adhäsion der Aktinfibrillen an das Plasmalemma, den Transmembrantransport durch Ionenkanäle sowie den Vesikeltransport steuert (Mao und Yin 2007). 1-Phosphatidyl-Inositol-4-Phosphate-5-Kinasen (TDF_003) sind an der Synthese von Phosphatidylinositol maßgeblich beteiligt, weswegen ihre verstärkte Expression auf Veränderungen im Aktinzytoskelett hinweist (Mao und Yin 2007). Die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts für die Bildung von Zellwandappositionen konnte bei *A. thaliana* gezeigt werden. Dort reagieren Epidermiszellen auf den mechanischen Druck durch ein Apressorium mit der ringförmigen Anordnung von Aktinfilamenten um die Druckstelle, entlang denen Golgi-Vesikel und ER-Membranstrukturen akkumulieren. In diesen Zellkomponenten wird Zellwandmaterial, vor allem Callose, gebildet, das als Papille abgelagert werden kann (Hardham 2007). Die Bildung von Papillen und die Ablagerung von neu synthetisiertem Zellwandmaterial konnte zwei bis drei Tage nach der Inokulation mit *F. graminearum* auch in den resistenten Weizensorten Frontana und Arina beobachtet werden (Kang und Buchenauer 2000c). Diese Reaktionen gehören zu den basalen Abwehrmechanismen von Pflanzen gegenüber Pathogenen, die sowohl in resistenten wie auch in anfälligen Genotypen ablaufen (Hückelhoven 2007). Die Hochregulation von Aktin assoziierten Proteinen und in stärkerem Ausmaß von Mikrotubuli assoziierten Proteinen wurde nach der Inokulation mit *F. graminearum* von mehreren Arbeitsgruppen berichtet (Kruger et al. 2002, Hill-Ambroz et al. 2006, Bernardo et al. 2006). Für die Abwehr von Weizen gegenüber *F. graminearum* könnte die verstärkte Expression dieser Gene eine große Bedeutung haben. Jedoch sind die beschriebenen Zytoskelett-assoziierten Gene für den Einsatz in der Züchtung resistenter Weizenpflanzen wenig geeignet, da Veränderungen an dieser Stelle in grundlegende Mechanismen der Zellen eingreifen würden und es daher wenig Unterschiede in den Allelen geben wird. Die bestehenden Unterschiede zwischen den Genotypen werden eher in der vorangehenden Druck und Elicitorrezeption oder in der Signaltransduktion zu suchen sein, die dann zur Aktivierung der beschriebenen Gene führt.

4.3.2. Signaltransduktion

Gene, die an der Signaltransduktion und an der Steuerung der Genexpression beteiligt sind, sind für weitere Untersuchungen besonders interessant. Die Resistenz einer Pflanze gegenüber einem Pathogen beruht auf der korrekten Aktivierung und Koordination von Signaltransduktionswegen, die zur Produktion von Abwehrmechanismen führen. Es wird daher angenommen, dass QTLs für Krankheitsresistenzen in Pflanzen unter anderem auf Sequenzpolymorphismen in Genen der Signaltransduktion und Regulation der Genexpression beruhen (Poland et al. 2008).

Mit TDF_076 konnte in cDNA-AFLPs von Capo ein Genfragment mit einer starken Sequenzähnlichkeit zu den *NPR1*-Genen (non producer of PR-1) aus Gerste und Reis identifiziert werden. Für Weizen steht bis jetzt noch keine vollständige, öffentlich zugängliche Sequenz von *NPR1*-Genen zur Verfügung. NPR1 ist ein Schlüsselregulator innerhalb der SA-vermittelten Systemic Acquired Resistance (SAR) (Pietse und Van Loon 2004). Über die Validierung der Genexpression mittels quantitativer Real-time PCR mit cDNA von SVP72017, Capo, G16-92 und Hussar konnte in den verschiedenen Genotypen eine äußerst unterschiedliche Regulation dieses *NPR1*-ähnlichen Gens nach der Inokulation mit *F. graminearum* festgestellt werden. In SVP72017 und Capo wird TDF_076 zu allen Zeitpunkten leicht stärker exprimiert als in der Kontrolle, wobei die Expression in SVP72017 bei 48 hai ca. 3-fach induziert wird. Zum Zeitpunkt 48 hai sollte das Pathogen bereits mit der mechanischen Penetration in die Epidermiszellen der Spelzenepidermis eingedrungen sein (Kang und Buchenauer 2000). Die Hochregulierung kann auf die verstärkte Abwehr zu diesem Zeitpunkt hindeuten. Die Expressionsunterschiede von maximal 3-facher Hochregulierung erscheinen gering, sind aber vergleichbar mit den Werten, die in *A. thaliana* bei maximaler Induktion der SAR gezeigt wurden (Pietse und Van Loon 2004). Bei NPR1 handelt es sich um ein regulatorisches Protein, das durch Veränderungen im Redox-Status der Zellen in seinen aktiven Zustand versetzt wird, weniger durch die vermehrte Expression (Pietse und Van Loon 2004). In G16-92 und Hussar ist die Regulation von TDF_076 gegenläufig, d.h., dass in der anfälligen Sorte Hussar das *NPR1*-ähnliche Gen zu allen untersuchten Zeitpunkten nach der Inokulation mit *F. graminearum* ähnlich wie in SVP72017 und Capo hochreguliert wird, in G16-92 hingegen jedoch zu allen untersuchten Zeitpunkten herunter reguliert wird. In der Literatur werden die Ergebnisse zum Einfluss der SAR auf die Resistenz verschiedener Weizengentypen als unterschiedlich beschrieben. Bernardo et al. (2006) berichten von einer negativen Regulation von *NPR1* in der resistenten Sorte Ning7840 zu späteren Zeitpunkten

nach der Inokulation mit *F. graminearum*. Eine Behandlung mit Salicylsäure (SA) konnte in der anfälligen Sorte Y1193-6 im Gegensatz zur Behandlung mit Methyljasmonat und Etaphon die Resistenz gegenüber *F. graminearum* nicht steigern (Li und Yen, 2008). Einen wichtigen Hinweis auf die Förderung der Resistenz von Weizen gegenüber diesem Pathogen durch vermehrte SAR-Signaltransduktion lieferten hingegen Markander et al. (2006). Ihnen gelang es durch Überexpression von *AtNPR1* aus *A. thaliana* in der anfälligen Sorte Bobwhite die Expression von PR-Proteinen stark zu induzieren und die Resistenz gegenüber *F. graminearum* fast auf das Niveau der hochresistenten Sorte Sumai3 zu heben. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten zum einen dadurch erklärt werden, dass durch Überexpression die natürlichen Gegebenheiten in der Pflanze nicht wiedergegeben werden können, zum anderen ist es durchaus denkbar, dass unterschiedliche Weizengenotypen, je nach genetischem Hintergrund, unterschiedlich auf SA reagieren. Desmond et al. (2006) fanden heraus, dass die Behandlung mit Benzothiadiazol (BTH), einem Induktor der SAR, in der Sorte Sunco keine verstärkte Produktion von PR-Protein und keine Erhöhung der Resistenz gegenüber dem Erreger der Kronenfäule, *F. pseudograminearum*, bewirkte, während in der Sorte Kennedy sowohl die PR-Proteinproduktion als auch die Resistenz deutlich gesteigert werden konnte.

NPR1 wirkt sich fördernd auf die SAR aus und ist zudem maßgeblich an der Kommunikation zwischen den Signaltransduktionswegen beteiligt. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Resistenz gegenüber nekrotrophen Parasiten, wie *F. graminearum*, v.a. durch die Phytohormone Jasmonat (JA) und Ethylen (Et) gefördert wird, während SA Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen vermittelt (Glazebrook 2005). Aktives, d.h. monomeres, NPR1 wirkt hemmend auf die JA-Synthese, weil es die Transkription von JA-Synthesegenen hemmt. Auch wirkt es hemmend auf den Abbau der JAZ-Proteine, den Inhibitoren der JA-Signaltransduktion, wodurch es zur verminderten Transkription von JA-Response-Genen kommt. Durch diesen Mechanismus wird die JA-Signaltransduktion durch die antagonistisch wirkende SA-vermittelte Signaltransduktion beim Angriff eines biotrophen Erregers gemindert (Beckers und Spoel 2006). Die negative Regulation von *NPR1* im resistenten Zuchtstamm G16-92 könnte sich somit durchaus positiv auf die JA-Signaltransduktion und die durch dieses Phytohormon vermittelte Resistenzmechanismen auswirken. Die Förderung der Resistenz durch vorangehende Behandlung mit Methyljasmonat in anfälligen Weizen wurde gezeigt (Li und Yen, 2008). Auch gibt es Hinweise darauf, dass in der resistenten Sorte Dream nach der *F. graminearum*-Inokulation vermehrt JA- und Et-Biosynthese und Signaltransduktions-Gene exprimiert werden (Sven Gottwald, Universität Gießen, persönliche Mitteilung)

Durch die Sequenzierung eines 1400 Bp großen Abschnitts des untersuchten *NPRI*-ähnlichen Gens in den Sorten SVP72017, Capo, Sngh3559, Inspiration, Renan, Recital, G16-92, History und Rubens konnten drei Insertions/Deletions-Polymorphismen identifiziert werden. Zwei der Polymorphismen liegen im Intron-Bereich des Gens und haben somit wahrscheinlich keine Auswirkungen auf das entstehende Protein. Der dritte Polymorphismus (5Bp) liegt zwar innerhalb des codierenden Bereichs, jedoch am Ende des Gens, so dass die daraus resultierenden Veränderungen in der Aminosäureabfolge nur den hintersten Bereich des entstehenden Proteins betreffen. Die Auswirkungen auf die Funktionalität des Gens können mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden nicht abgeschätzt werden. Sie könnten allerdings durch weitere Studien geklärt werden, z.B. durch die Computersimulation einer möglichen, durch die Deletion ausgelösten Strukturveränderung des Proteins.

Anhand der Polymorphismen konnte TDF_076 in die bestehenden genetischen Karten der Population History/Rubens (Holzapfel et al. 2008) und Sngh3559/SVP72107 (Groth, nicht publiziert) rückkartiert werden, wobei weder History noch Rubens dieselben Allele wie SVP72017 und Sngh3559 besitzt. In beiden Fällen kartierte TDF_076 jedoch auf Chromosom 2AL. In der Population Sngh3559/SVP72017 colokalisiert dieses *NPRI*-ähnliche Gen mit einem QTL für Fusariumresistenz, der, je nach Umwelt, zwischen 2% und 14 % der phänotypischen Varianz erklärt. Das Resistenz-Allel wird hierbei von SVP72017 vererbt.

Die Untersuchung eines umfangreichen Winterweizensortiments mit Markern für die drei INDEL-Polymorphismen zeigte, dass in diesem Genpool mindestens vier verschiedene Varianten dieses Gen-Abschnittes vorhanden sind. Interessanterweise ist die Sequenz der anfälligen Sorte Recital auf diesem Genabschnitt identisch mit der von Sngh3559. In der Population Renan (res.)/Recital (anf.) befindet sich ebenfalls ein QTL für Fusariumresistenz im gleichen Abschnitt von Chromosom 2AL (Gervais et al. 2003). Falls es sich bei TDF_076 um das dem QTL zugrunde liegende Gen handeln sollte, könnten Sngh3559 und Recital eine besondere Anfälligkeitsvariante tragen, während SVP72017 eine Variante besitzt, die erhöhte Resistenz gegenüber *F. graminearum* vermittelt.

Die verschiedenen Genvarianten haben keinen Einfluss auf die Expression von TDF_076 in den verschiedenen Weizengenotypen. Die DNA-Sequenzen von G16-92 und SVP72017 sind in diesem Abschnitt des *NPRI*-ähnlichen Gens identisch, während Capo und Hussar wiederum andere Kombinationen der INDEL-Polymorphismen besitzen.

Um weitere Polymorphismen innerhalb des *NPRI*-ähnlichen Proteins auf Chromosom 2AL zu finden, ist die vollständige Sequenz des Gens verschiedener Weizengenotypen erforderlich. Aufgrund des hexaploiden Weizengenoms kann davon ausgegangen werden, dass im Weizengenom mindestens drei homologe *NPRI*-Gene vorhanden sind. Da in Reis sowohl das *NPRI*-Gen (Acc.-Nr. NM_001050898.1) als auch das sehr ähnliche *NHI*-Gen (Acc.-Nr. NM_001048821.1) bekannt ist, wäre es denkbar, dass auch Weizen weitere *NPRI*-ähnliche Gene besitzt. Eine funktionale Mutation eines *NPRI*-Gens könnte sich daher partiell auf die Resistenz von Weizen gegenüber verschiedenen Pathogenen auswirken.

4.3.3. Chemische Abwehr

DON-Toleranz

Nekrotrophe Pilze wie *F. graminearum* ernähren sich von totem Wirtsgewebe. Die von nekrotrophen Pilzen gebildeten Mycotoxine sind häufig wichtige Virulenzfaktoren, die in den Stoffwechsel der Wirtszellen eingreifen und durch Auslösen des Zelltods Nahrung für das Pathogen bereitstellen (Glazebrook 2005). Eine sehr wirksame Abwehr ist daher die Entgiftung der Mycotoxine, und klonierte Resistenzgene gegen nekrotrophe Pilze kodieren aus diesem Grund meist für spezifische Entgiftungsenzyme (Johal. et al. 2002, Brandwagt et al. 2002, Sindhoo et al. 2008). Bei *F. graminearum* und *F. culmorum* wurde gezeigt, dass DON ein wichtiger Virulenzfaktor für die Ausbreitung des Pilzes innerhalb der Ähre darstellt (Jansen et al. 2005). Bei der Infektion von Weizenähren mit *F. graminearum*-Pilzen, in denen die DON-Synthese unterbunden ist, bilden auch anfällige Weizensorten dicke Zellwandablagerungen im Rachisnodium, die das Pathogen daran hindern, die Rachis zu besiedeln und von dort aus weitere Ährchen zu befallen (Jansen et al. 2005). Nur durch DON ist der Pilz also in der Lage, die Typ 2-Resistenz-Reaktion der Wirtsähren außer Kraft zu setzen.

Der Haupt-QTL für die Typ 2-Resistenz auf Chromosom 3BS (*FHB1*) aus asiatischen Sommerweizen colokalisiert mit einem QTL für DON-Entgiftung (Lemmens et al. 2005). Es wird daher stark angenommen, dass Weizensorten mit guter Typ 2-Resistenz über Mechanismen zur DON-Detoxifikation verfügen. In Weizen konnte die Entgiftung von DON durch Glycosylierung zu DON-3-Glycosid nachgewiesen werden (Berthiller et al. 2005). Poppenberger et al. (2003) isolierten eine UDP-Glycosyltransferase (*DOGTI*) aus *A. thaliana*, die in vitro und in vivo DON in DON-3-Glycosid umwandeln kann. *FHB1* auf Chromosom 3BS konnte bereits feinkartiert werden, und die Klonierung von *FHB1* wird zurzeit durch einen Map based Cloning-Ansatz umgesetzt (Liu et al. 2006). Eine UDP-Glycosyltransferase ist bei

den zu testenden Kandidatengenenen im nicht mehr rekombinanten Bereich jedoch nicht enthalten, so dass es sich bei dem den QTL zu Grunde liegenden Gen nicht um eine Glycosyltransferase handeln kann (J. Anderson, persönliche Mitteilung).

In der vorliegenden Arbeit konnten durch die cDNA-AFLP-Analysen von SVP72107 nach der Inokulation mit *F. graminearum* zwei UDP-Glycosyltransferasen (TDF_040 und TDF_048) als hochreguliert identifiziert werden. TDF_048 besitzt auf seiner Länge von 430 bp eine hohe Sequenzhomologie (E-value: e-130) mit der UDP-Glycosyltransferase *TaUGT3*, die nach DON-Behandlung in der resistenten Sommerweizensorte Wangshuibai hochreguliert wird und bereits kloniert und sequenziert wurde (Lulin et al. 2009). *TaUGT3* besitzt eine hohe Übereinstimmung auf Aminosäureebene mit *DOG1* aus *A. thaliana*, die in der Lage ist, DON zu DON 3-Glycosid zu konjugieren (Poppenberger et al. 2003, Lulin et al. 2009). Die Transformation von *A. thaliana* mit *TaUGT3* führt zu einer erhöhten Toleranz einiger transgener Linien gegenüber DON. Von *TaUGT3* gibt es im Weizen drei orthologe Kopien auf den Chromosom 3AS, 3BS und 3DS (Lulin et al. 2009). Die Familie der Glycosyltransferasen ist eine der größten Genfamilien der Pflanzen (Bowles et al. 2005), innerhalb derer große Bereiche konserviert sind. Daher kann leider nicht bewiesen werden, dass es sich bei TDF_048 tatsächlich um ein Protein mit ähnlichen Eigenschaften wie *TaUGT3* handelt. Da Glycosyltransferasen an allen Prozessen in der Pflanzenzelle beteiligt sind, bei denen eine Glycosylgruppe übertragen wird, wie z.B. der Glycosylierung von Flavonoiden, Phenylpropanoiden, Cumarinen sowie der Phytohormone Indoleessigsäure und Salicylsäure und der Synthese von Zellwandmaterial (Bowles et al. 2005), ist die genaue Bestimmung der Funktion einer einzelnen Glycosyltransferase sehr schwierig. Für eine Testung ihrer Substratspezifität müsste zuerst das gesamte Gen kloniert und in Hefe überexprimiert werden, um eine eventuelle in vitro Konjugation von DON messen zu können. Falls dies nachgewiesen werden sollte, könnte die Wirkung der Glycosyltransferase auf die Ährenfusarioseresistenz durch Überexpression in einer anfälligen Weizensorte getestet werden.

Die Verifikation der Ergebnisse der Expressionsanalyse mit cDNA-AFLP durch quantitative Real-time PCR zeigte, dass TDF_048 sowohl in SVP72017 als auch in Capo 72 hai und 96 hai im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hochreguliert wird. In SVP72017 ist die Hochregulierung jedoch zum Zeitpunkt 96 hai stärker. In infizierten Pflanzenzellen kann DON frühestens nach 48 hai nachgewiesen werden und seine Konzentration nimmt im weiteren Verlauf der Infektion zu (Kang und Buchenauer 1999). In SVP72017 und Capo wird die Expression der Glycosyltransferase also zu Zeitpunkten verstärkt, in denen bereits DON im

Gewebe vorhanden ist. Da TDF_048 in beiden Genotypen hochreguliert wird, handelt es sich nicht um eine genotypspezifische Abwehrreaktion. Die Sequenzierung des genomischen PCR-Produkts ergab keine DNA-Sequenz-Unterschiede zwischen den Genotypen (SVP72017, Capo, Sngh3559, Inspiration, History, Rubens), so dass eine Kartierung der Glycosyltransferasen bis jetzt noch nicht durchgeführt werden konnte.

Neben der DON-Entgiftung könnten auch Veränderungen in den Angriffszielen von DON innerhalb der Weizenzellen zu erhöhter DON-Toleranz führen.

Packa et al. (1991) zeigten, dass die Mitose von Weizenwurzelzellen durch die Applikation von DON gehemmt wird. In DON-behandelten Zellen kam es vermehrt zu Störungen der Ausrichtung der Chromosomen in der Äquatorialebene und daher zur Bildung von Tochterzellen mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen und zum Verlust von genetischem Material während der Zellteilung. Die Autoren nehmen daher an, dass DON den Aufbau des Spindelapparates stark beeinträchtigt. TDF_001, das Sequenzhomologien zu einem Spindel- und Kinetochor-assoziierten Protein aufweist, ist in cDNA-AFLP-Profilen von Dream bereits acht Stunden nach der Inokulation mit *F. graminearum* hochreguliert. Kinetochore sind Proteinsysteme, die den Kontakt der Mikrotubuli des Spindelapparats mit dem Zentromer der Chromosomen herstellen und regeln und somit eine zentrale Rolle bei der Zellteilung spielen (Santaguida and Mussaccio 2009). Es wäre denkbar, dass die erhöhte Expression eines Kinetochor-assoziierten Proteins der toxischen Wirkung von DON auf die Zellteilung entgegenwirken könnte

Die toxische Wirkung von DON ist zu großen Teilen auf seine Hemmung der Proteinbiosynthese zurückzuführen (Rocha et al. 2005). In *F. culmorum*-infiziertem Weizen lässt sich DON besonders an den Ribosomen im Endoplasmatischem Retikulum nachweisen (Kang und Buchenauer 1999), an denen die Proteinbiosynthese abläuft. Es wird angenommen, dass das Angriffsziel von DON in Weizen, ähnlich wie in Hefe, das ribosomale Protein L3 (*RPL3*) ist. Nach Klonierung und Sequenzierung aller *RPL3* Gene in Weizensorten mit unterschiedlicher Ährenfusarioseresistenz konnten jedoch keine unterschiedlichen Allele gefunden werden (Lucyshyn et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden in SVP72017 und in G16-92 TDFs mit jeweils starker Sequenzhomologie mit einem ribosomalen Protein 117 und dem 40S ribosomalen Protein S9 nach der Inokulation mit *F. graminearum* hochreguliert. Diese ribosomalen Proteine wurden bis jetzt jedoch noch nicht im Zusammenhang mit DON-Toxizität erwähnt, daher handelt es sich hier um neue Ergebnisse.

Cytochrom P450

TDF_102 besitzt eine Sequenzähnlichkeit mit dem Cytochrom P450 Protein CYP709H1 aus Mais. Es wird in Capo zu allen untersuchten Zeitpunkten nach der Inokulation mit *F. graminearum* hochreguliert und in SVP72017 ab 24 Stunden nach der Inokulation herunter reguliert. Die Genotypen zeigen somit eine deutlich gegensätzliche Regulation von TDF_102 nach der Inokulation mit *F. graminearum*. Das Genfragment kartiert in der Population History/Rubens in das Intervall eines QTL für Fusariumresistenz auf Chromosom 2BS, das von History vererbt wird, jedoch nur eine geringe Verbesserung der Resistenz bewirkt (Holzapfel 2009). Cytochrom P450 Proteine stellen die größte Genfamilie in Pflanzen dar. *A. thaliana* besitzt mindestens 286 verschiedene Cytochrom P450 Proteine, die an den verschiedensten biochemischen Prozessen beteiligt sind, wie an der Synthese von Phytohormonen und an der Oxidierung von Fettsäuren sowie an allen Synthesewegen des Sekundärmetabolismus, aus dem Lignin, Pigmente und zahlreiche Abwehrstoffe hervorgehen (Werck-Reichhart und Feyereisen 2000). Wegen der großen Bandbreite der von Cytochrom P450 Proteinen katalysierten Reaktionen ist es unmöglich, auf die konkrete Funktion von TDF_102 zu schließen, insbesondere deshalb, weil zwischen den Mitgliedern von Unterfamilien nur eine geringe Übereinstimmung in der Aminosäureabfolge besteht. Cytochrom P450 Proteine wurden in zahlreichen Expressionsstudien in Weizen nach der Inokulation mit *F. graminearum* als differentiell exprimiert beschrieben (Bernardo et al. 2006, Hill-Ambroz et al. 2006, Kong et al. 2007, Steiner et al. 2009).

4.3.4. TDFs mit unbekannter Funktion

Die Hälfte der in der vorliegenden Arbeit nach der Inokulation mit *F. graminearum* differentiell exprimierten TDFs haben keine Ähnlichkeit zu Genen mit bekannter Funktion. Von diesen konnten TDF_032 und TDF_103 in bestehende QTL-Karten rückkartiert werden. TDF_103 ist ein repetitives Element, das aus einem 11 Mal wiederholten, 48 Bp langen Abschnitt besteht. In den cDNA-AFLPs von SVP72017 erscheint die Bande 72 und 96 Stunden nach der Inokulation mit *F. graminearum*. Zu diesen Zeitpunkten sollte der Pilz bereits in das Spelzengewebe eingedrungen sein und es, auch durch Einsatz von DON, bereits stark schädigen (Kang und Buchenauer 1999). Unter normalen Bedingungen sind repetitive Elemente meist methyliert (Yan et al. 2008) und werden daher nicht transkribiert. Jedoch wurde die Demethylierung von repetitiven Elementen innerhalb von Stressreaktionen wiederholt gezeigt (Lish 2009). In den Populationen Solitär/Travix (Holzapfel et al. 2008) und Sng3559/SVP72017 (Groth et al. nicht publiziert) konnte TDF_103 auf Chromosom 4BS

kartiert werden, wo in keiner der beiden Populationen ein QTL für Ährenfusarioseresistenz nachgewiesen werden konnte.

TDF_032 ist in SVP72017 zu den frühen Zeitpunkten nach der Inokulation mit *F. graminearum* stark hochreguliert. Es könnte sich daher bei diesem TDF um ein Fragment eines Gens handeln, das eine Rolle in der frühen Abwehr von SVP72017 gegenüber *F. graminearum* spielt. TDF_032 konnte in der genetischen Karte der Population History/Rubens (Holzapfel et al. 2008) auf Chromosom 5A kartiert werden. Dort kartiert es 11 cM unterhalb des Mikrosatelliten *xgwm639*. In dieser Position fanden Gervais et al. (2003) einen QTL für die Resistenz gegenüber *F. culmorum*, der je nach Umwelt zwischen 14% und 19,2% der phänotypischen Varianz erklärt. In den vorläufigen QTL-Analysen der Populationen Inspiration/SVP72017 und Sng3559/SVP72017 konnten jedoch an derselben Stelle auf dem Chromosom keine entsprechenden QTL auf Chromosom 5A gefunden werden.

4.4. Ausblick

Durch den in der vorliegenden Arbeit gewählten Ansatz der Expressionsanalyse konnten 78 Gene identifiziert werden, die nach der Inokulation mit *F. graminearum* in Winterweizen differentiell reguliert werden. Von diesen colokalisieren vier mit QTL für Ährenfusarioseresistenz: zwei *WIR1*-Gene mit einem QTL auf 7BS, ein *NPRI*-ähnliches Gen auf Chromosom 2AL und ein Cytochrom P450 auf Chromosom 2BS. Ihre Colokalisierung mit QTL für Ährenfusarioseresistenz und die Unterschiede in der Expression im Ährengewebe des Weizens nach der Inokulation mit *F. graminearum* machen diese Gene zu Kandidatengenen für Fusariumresistenz.

Die Colokalisierung eines Gens mit einem QTL ist noch kein Beweis dafür, dass diese auch wirklich mit der Ausprägung eines Merkmals in Verbindung stehen, da diese Regionen mehrere tausend Gene umfassen können.

Um die spezifische Wirkung dieser Kandidatengene auf die Resistenz von Weizen gegenüber *F. graminearum* testen zu können, können gentechnische Verfahren eingesetzt werden. Dazu bieten sich beim Weizen die Methoden an, welche die Genexpression bestimmter Gene oder Genfamilien durch den Einsatz von „small interfering RNA“ (siRNA) hemmen. Dabei nutzt man die Anti-Virus-Abwehr der pflanzlichen Zellen aus, die doppelsträngige RNA als fremd erkennt, diese kurze Stücke zerschneidet und alle RNAs mit ähnlicher Sequenz abbaut, und somit auch eigene mRNA, wenn sie Sequenzhomologie zu den kurzen RNA-Fragmenten

besitzt (Sidamed und Wilkie 2010). Auf diese Weise lässt sich die Expression einzelner Gene oder auch ganzer Genfamilien bis zu 90% vermindern. Im hexaploiden Weizen kann auf diese Weise die Expression der Kopien eines Gens auf den homologen Chromosomen gehemmt werden. Eine Methode zur Anwendung von siRNA ist die stabile Transformation von Weizen mit einem kurzen Fragment des zu untersuchenden Kandidatengens in Form von doppelsträngiger RNA. Stabil transformierte Pflanzen können die verminderte Genexpression an weitere Generationen weitervererben. Daher würde sich diese Methode für die Hemmung der Expression der *NPR1*-Gene anbieten, da die transgenen Linien nicht nur auf ihre Resistenz gegenüber Ährenfusariosen, sondern auch gegenüber anderen Pathogenen des Weizens getestet werden können. Auf diese Weise könnte der Einfluss der SAR in der Interaktion von Weizen mit seinen wichtigsten Pathogenen geklärt werden. Eine Methode zur transienten Transformation von Pflanzen ist das Virus-Induced Gene Silencing (VIGS), bei der ein kurzes Fragment des Kandidatengens als doppelsträngige RNA mit einem Virus als Vektor in die Pflanzenzelle eingeschleust wird. VIGS ist schneller und kostengünstiger in der Durchführung als eine stabile Transformation (Pakuyastha und Dasgupta 2009). Mit dieser Methode könnte beispielsweise die Wirkung einer Expressionshemmung der *WIR1*-Genfamilie auf die Ährenfusarioseresistenz von Weizen getestet werden.

Ein anderer gentechnischer Ansatz zur Erforschung der Funktion eines Kandidatengens in der Ährenfusarioseresistenz ist deren Überexpression in anfälligen Weizenpflanzen. Dabei werden die Pflanzen mit einem Konstrukt aus dem vollständigen Kandidatengen und einem speziellen Promotor stabil transformiert. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Wirkung eines bestimmten Allels dieses Gens, z.B. des Allels von Dream eines der *WIR1*-Gene auf Chromosom 7BS, getestet werden könnte. Für diese Methode muss jedoch zuvor die vollständige Sequenz des Kandidatengens gewonnen werden. Von Markandar et al. (2006) wurde bereits eine positive Wirkung der *NPR1*-induzierten SAR auf die Resistenz der Weizensorte Bobwhite durch die Überexpression von *AtNPR1* aus *A. thaliana* gezeigt.

Ein anderer Ansatz zur Erforschung von Genfunktionen ist die Untersuchung von Mutanten. Durch eine Behandlung der Winterweizensorte Dream mit der mutagenen Chemikalie Ethylmethan-Sulfonat wurde an der TU-München eine TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes)-Population erstellt (Schmolke, 2006). Diese Population könnte auf Mutationen in Kandidatengenen aus der vorliegenden Arbeit, insbesondere der *WIR1*-Gene auf 7BS, untersucht werden. Falls sich die Ährenfusarioseresistenz von Genotypen mit mutierten

Kandidatengen von der des Wildtyps unterscheidet, wäre dies ein starkes Indiz für die Beteiligung des Gens an der Resistenz.

Die markergestützte Selektion bietet Züchtern die Möglichkeit gezielt erwünschte Merkmale, wie z.B. Pathogenresistenzen, in ihr Zuchtmaterial zu übertragen. Zur Entwicklung von Marken für quantitative Merkmale werden QTL-Analysen zur Identifizierung von Genomabschnitten durchgeführt, die an der Ausprägung der Resistenz beteiligt sind. Meist werden zur Selektion der Genotypen, die den gewünschten Genomabschnitt besitzen, gekoppelte anonyme Marker wie z.B. Microsatelliten verwendet. Der Nachteil von gekoppelten Markern besteht darin, dass es bei ungenügender Kopplung zu Rekombinationen zwischen Marker und Zielmerkmal kommen kann und somit nicht mehr auf das Merkmal selektiert wird (Collard und Mackill 2008). Um eng gekoppelte Marker zu identifizieren, wird daher oft eine Feinkartierung des QTL durch die Analyse einer großen Nachkommenpopulation, in der entsprechend viele Rekombinationen vorkommen, durchgeführt. Die Probleme mit ungenügender Kopplung können mit der Anwendung von „perfekten“ Markern vollständig umgangen werden. Dabei liegt der Marker direkt im Zielgen und wurde von einem funktionalen Polymorphismus innerhalb dieses Gens abgeleitet, so dass er immer mit dem gewünschten Merkmal verbunden ist. In der vorliegenden Arbeit wurden Genfragmente identifiziert, die innerhalb von zuvor kartierten QTL-Intervallen für Ährenfusarioseresistenz liegen. Um aus ihnen einen „perfekten“ Marker ableiten zu können, muss zuvor durch funktionelle Analysen gezeigt werden, dass es sich bei ihnen tatsächlich um die Gene handelt, die an der Resistenzausprägung grundlegend beteiligt sind. Auch sollte das Gen, idealerweise vollständig und inklusive des Promotorbereichs, in einer größeren Anzahl von Sorten resequenziert werden, um verschiedene Allele des Gens zu kennen und so den Polymorphismus zu finden, durch den das Resistenzallel sicher von allen anderen unterschieden werden kann. Ein idealer Marker sollte nicht nur perfekt gekoppelt, sondern auch diagnostisch sein, d.h., dass durch ihn das Resistenzallel sicher von allen anderen Allelen in allen Sorten unterschieden werden kann. Da es für die *WIRI*-Gene, die auf das Chromosom 7BS kartieren, keinen Beweis gibt, dass es sich bei ihnen um die dem QTL zugrunde liegenden Gene handelt, ist die Anwendung von flankierenden Microsatellitenmarkern weiterhin die beste Methode, um auf diesen QTL zu selektieren. Eine mögliche Verwendung des QTL auf Chromosom 7BS für die markergestützte Selektion wurde bereits von Schmolke et al. (2005) und Häberele et al. (2007) ausgiebig diskutiert. Dieser QTL besitzt mit 21 % Verbesserung der phänotypischen Variation einen vergleichbar großen Effekt auf die Ährenfusarioseresistenz

(Schmolke et al. 2005). Auch wurde seine Wirkung im genetischen Hintergrund der hochanfälligen Sorte Lynx bestätigt (Haeberle et al. 2007). Damit ist der QTL auf Chromosom 7BS der am besten validierte QTL für Ährenfusarioseresistenz im europäischen Winterweizenmaterial und einer von den QTL, auf die eine markergestützte Selektion am Erfolg versprechendsten ist. Dies würde für die Gene gelten, die diesem QTL zugrunde liegen.

Der QTL für Ährenfusarioseresistenz auf Chromosom 2AL in Population Sng3559/SVP72017 hat einen Einfluss von 2% bis 14% auf die phänotypische Varianz der Ährenfusarioseresistenz. (J. Groth, nicht publiziert). Das mit diesem QTL colokalisierende *NPRI*-ähnliche Gen kartiert direkt am Peak der LOD-Kurve und ist somit, bis jetzt, der mit dem QTL am engsten koppelnde Marker.

Der QTL für Ährenfusarioseresistenz auf Chromosom 2BS, in dessen Intervall das Cytochrom P450 TDF_102 kartiert, erklärt lediglich 2,1% und 8% der phänotypischen Variation (Holzapfel 2008). Aufgrund seines geringen Einflusses auf die Ährenfusarioseresistenz ist er für die markergestützte Selektion wenig geeignet. Aus dem gleichen Grund wären funktionelle Analysen zur Wirkung von TDF_102 schwierig durchzuführen.

Die bisher beschriebenen QTL für Ährenfusarioseresistenz aus den europäischen Winterweizenpopulationen haben meist nur einen mittleren bis kleinen Einfluß auf die Resistenz. Zudem ist der Einfluss eines QTL auf die Ährenfusarioseresistenz je nach genetischem Hintergrund variabel (Bürstmayr et al. 2009, Holzapfel et al. 2009). Es wird daher diskutiert, ob die markergestützte Selektion auf diese einzelnen QTL lohnend für die Züchtung ist, da es sich um eine teure Technik handelt. Sehr günstig für die Resistenzzüchtung wäre es hingegen, wenn Marker für Gene identifiziert werden, die Resistenz gegenüber einem größeren Spektrum an Pathogenen verbessert und somit zu einer allgemein robusteren Pflanze führt. Vor kurzem ist das Gen *Lr34* (ein ABC-Transporter) aus Weizen kloniert worden, das eine quantitative Resistenz gegenüber drei verschiedenen Pathogenen vermittelt (Krattinger et al. 2009). Ein solches Resistenzgen ist für den Einsatz in der markergestützten Selektion sehr gut geeignet. Hinweise darauf, ob QTL für Ährenfusarioseresistenz mit QTL für andere Krankheiten des Weizens überlappen, könnten Metaanalysen verschiedener QTL-Studien liefern.

Gute Kandidaten für Gene, die eine Resistenz gegenüber mehreren Pathogenen vermitteln, könnten beispielsweise die *WIRI*-Gene und *NPRI* sein. In der vorliegenden Arbeit konnten jeweils zwei *WIRI*-Gene in Bereiche von Chromosom 5DS und 7BS kartiert werden, in denen

auch QTL für die Resistenz gegenüber *Septoria nodorum* gefunden wurden, einem Pathogen, welches ebenfalls die Ähren des Weizens befällt und einen nekrotrophen Lebensstil besitzt (Schnurbusch et al. 2003). Zudem scheinen die *WIRI*-Gene an einer basalen Abwehr beteiligt zu sein, die gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen abläuft. Auch in der Region von Chromosom 2AL, wo das *NPRI*-ähnliche TDF_076 kartiert, wurde ein QTL für die Resistenz gegenüber *Septoria nodorum* identifiziert (Schnurbusch et al. 2003). Funktionelle Studien, die die Wirkung dieser Gene auf die Resistenz gegenüber *F. graminearum* und *Septoria nodorum* untersuchen, würden Aufschluss über die Wirkung dieser Gene geben. Studien mit *A. thaliana* zeigten, dass *NPRI* die Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen beeinflusst (Piertse und Van Loon 2004). Jedoch ist die Verwendung von Schlüsselregulator-Genen, wie *NPRI* in der Pflanzenzüchtung kritisch zu sehen. In *A. thaliana* wurden zahlreiche Versuche mit Knockout-Mutanten von Schlüsselregulatorgenen der verschiedenen Signaltransduktionswege durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Mutanten, die eine verbesserte Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen besaßen, häufig eine verringerte Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen zeigten und umgekehrt, da die Signaltransduktionswege zum Teil antagonistisch wirken (Glazebrook 2005). Für eine gute Gesundheit der Weizenpflanzen auf dem Feld ist jedoch eine intakte Abwehr gegenüber biotrophen und nekrotrophen Pathogenen, sowie gegen Insekten und abiotischen Stressfaktoren nötig. Eine Verschiebung der Abwehr zugunsten der Resistenz gegenüber Pathogenen mit einem bestimmten Lebensstil ist daher nicht sinnvoll. Vor der Verwendung verschiedener *NPRI*-Allele in der Weizenzüchtung müsste die Wirkung auf die Resistenz gegenüber anderen Pathogenen geprüft werden, z.B. durch die Genotypisierung und Phänotypisierung eines großen Weizensortiments.

5. Zusammenfassung

Die Resistenz des Weizens gegenüber den Erregern der Ährenfusariose, *F. graminearum* und *F. culmorum*, ist weltweit ein wichtiges Zuchtziel. In vorangegangenen Studien konnten in europäischen Winterweizen bereits QTL für die Ährenfusarioseresistenz kartiert werden. Über die Reaktion von anfälligen und resistenten Winterweizensorten auf die Infektion mit Erregern der Ährenfusariose auf Genexpressionsebene war jedoch noch nichts bekannt. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der ersten Expressionsstudie vorgestellt, die mit europäischem Winterweizen nach der Infektion mit *F. graminearum* durchgeführt wurde.

Die Expressionsanalysen wurden mit den Eltern von drei für das Merkmal Ährenfusarioseresistenz spaltenden Kartierungspopulationen (Dream/Lynx, G16-92/Hussar und SVP72017/Capo) durchgeführt. Ähren dieser sechs Genotypen wurden mit Hilfe einer Einzelblüteninokulationsmethode mit Makrokonidien von *F. graminearum* infiziert und zu insgesamt sieben Zeitpunkten innerhalb der ersten vier Tage nach der Inokulation untersucht. Unter Anwendung der cDNA-AFLP-Technik konnten 72 unterschiedliche cDNA-Fragmente (TDFs) identifiziert werden, die nach der Infektion mit *F. graminearum* im Vergleich zu wasserbehandelten Kontrollen ein unterschiedliches Expressionsmuster zeigten. Diese cDNA-Fragmente wurden, falls Sequenzpolymorphismen zwischen den Eltern der Kartierungspopulationen gefunden werden konnten, in die genetischen Karten integriert, um zu prüfen, ob eine Colokalisation mit Resistenz-QTL auftrat.

Eine Gruppe von vier Wheat Induced Resistance (*WIRI*)-Genen, die mit der Stabilisierung der Plasmamembran assoziiert werden, sind nach der Infektion mit *F. graminearum* in den resistenten Genotypen wesentlich stärker induziert als in den jeweils anfälligen Eltern der Kartierungspopulationen. Zwei der *WIRI*-Gene konnten aufgrund von Sequenzpolymorphismen in ein QTL-Intervall auf Chromosom 7BS rückkartiert werden. Aufgrund ihrer differentiellen Expression und Lage im QTL-Bereich sind diese Gene interessante Kandidaten für weitere, funktionelle Analysen. Ein Genfragment mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zu *NPRI*-Genen von Reis und Gerste wird nach der Inokulation mit *F. graminearum* differentiell exprimiert. NPR1 ist ein Schlüsselregulator der „Systemic Acquired Resistance“ (SAR) und beeinflusst zudem die Jasmonat-vermittelte Abwehrreaktion. Aufgrund von Insertions-Deletions-Polymorphismen konnte dieses *NPRI*-ähnliches Gen in der Population Sng3559/SVP72017 auf Chromosom 2AL kartiert werden. In dieser Region wurde durch vorläufige QTL-Analysen ein QTL für Ährenfusarioseresistenz, der von SVP72017

vererbt wird, identifiziert. Für die Bestätigung der Ergebnisse müssen jedoch noch weitere phänotypische Daten des Ährenfusariosebefalls miteinbezogen werden.

Weitere interessante Gene, die nach der Infektion mit *F. graminearum* hochreguliert wurden, sind eine UDP-Glycosyltransferase, die eine Rolle bei der Entgiftung von Fusariumtoxinen spielen könnte, sowie ein putatives Lipid Transfer Protein (LTP), das in den resistenten Genotypen hochreguliert und in den hochanfälligen Genotypen nicht exprimiert wurde. Vertretern der LTP-Genfamilie wurde bereits in anderen Studien eine direkte antifungale Wirkung gegenüber *F. graminearum* nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, Kandidatengene für die Ährenfusarioseresistenz aus europäischem Winterweizen zu gewinnen, die nach der Inokulation mit *F. graminearum* differentiell reguliert werden, und die eine Funktion in möglichen Abwehrmechanismen besitzen könnten und zum Teil mit QTL für Ährenfusarioseresistenz colokalisieren.

6. Summary

The breeding of wheat genotypes with a good resistance against Fusarium Head Blight (FHB) is a main goal worldwide. In previous studies QTL for FHB resistance have been identified in European winter wheat genotypes. The aim of this project was to get new and extended information about genes which are involved in the defense of European winter wheat genotypes against *F.graminearum*, the main pathogen causing FHB. Therefore gene expression studies on the basis of the parents of the European winter wheat populations Dream/Lynx, G16-92/Hussar and SVP72107/Capo were carried out. Ears of the six genotypes were inoculated with macroconidia suspension of *F. graminearum* and sampled seven times during the first four days after inoculation. By conducting cDNA-AFLP analysis 72 transcript derived fragments (TDFs) were identified as differentially expressed in Fusarium inoculated samples compared to water treated control samples. These cDNA fragments were screened for polymorphisms between the parents of the mapping populations. When polymorphisms were found, the TDFs were integrated into genetic maps.

Four Wheat Induced Resistance (WIR1) genes, which are associated with the stabilization of the plasma membrane during pathogen attack, were induced to a greater extent in resistant compared to susceptible genotypes after *F. graminearum* inoculation. Two of these *WIR1* genes map into the interval of a QTL for FHB resistance on chromosome 7BS in the Dream/Lynx population. A TDF with high sequence similarity to *NPR1* genes of rice and barley was differentially expressed in wheat spikes after inoculation with *F. graminearum*. *NPR1* is the key regulator of the Systemic Acquired Resistance and influences jasmonate mediated signal transduction. The *NPR1*-like gene could be mapped in the interval of a QTL for FHB resistance on chromosome 2AL. The donor of this QTL is SVP72017.

Further interesting genes that are differentially expressed after inoculation with *F. graminearum* are a UDP-Glycosyltransferase, which might play a role in DON detoxification and a putative Lipid Transfer Protein (LTP). In other studies, members of the LTP gene family were shown to have a direct antifungal effect on the growth of *F. graminearum*.

In this study we were able to identify candidate genes for FHB resistance in European winter wheat which are differentially expressed after inoculation with *F. graminearum*, have a putative function in defense pathways and colocalize with QTL for FHB resistance.

7. Literaturverzeichnis

- Anderson JA, Ogihara Y, Sorrells ME, Tanksley SD (1992) Development of a chromosomal arm map for wheat based on RFLP markers. *Theor Appl Genet* 83: 1035-1043
- Anderson JA, Stack RW, Liu S, Waldron BL, Fjeld AD, Coyne C, Moreno-Sevilla B, Fetch JM, Song QJ, Cregan PB, Froberg RC (2001) DNA markers for *Fusarium* head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theor Appl Genet* 102: 1164-1168
- Ansari KI, Walter S, Brennan JM, Lemmens M, Kessans S, McGahern A, Egan D, Doohan FM (2007) Retrotransposon and gene activation in wheat in response to mycotoxigenic and non-mycotoxigenic –associated *Fusarium* stress. *Theor Appl Genet* 114: 927-937
- Arnér ESJ, Holmgren A (2001) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Europ J of Biochemistry* 267 0: 6102-6109
- Baas PW, Karabay A, Qiang L (2005) Microtubules cut and run. *Trends Cell Biol* 15 (10): 518-524
- Bachem CWB, van der Hoeven RS, de Bruijn RS, Vreugdenhil P, Zabeau M, Visser RGF (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 9 (5): 745-753
- Beckers GJM, Spoel SH (2006) Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biol* 8 (1): 1-10
- Behn A, Hartl L, Schweizer G, Wenzel G, Baumer M (2004) QTL mapping for resistance against non-parasitic leaf spots in a spring barley doubled haploid population. *Theor Appl Genet* 108: 1229-1235
- Berrocal-Lobo M, Molina A (2008) Arabidopsis defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends in Plant Science* 13 (3): 145-150
- Bernardo A, Bai G, Guo P, Xiao K, Guenzi AC, Ayoubi P. (2007) *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between *Fusarium* head blight-resistant and susceptible wheat cultivars. *Funct Integr Genomics* 7: 69-77

- Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R, Lemmens M, Adam G, Krska R (2005) Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agri Food Chem* 53: 3421-3425
- Berthiller F, Schuhmacher R, Adam G, Krska R (2009) Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Anal Bioanal Chem* 395: 1243-1252
- Bohlmann H, Clausen S, Behnke S, Giese H, Hiller C, Reimann-Philipp U, Schrader G, Barkholt V, Apel K (1988) Leaf-specific thionins of barley - a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. *EMBO J*. 7(6): 1559-1565
- Bouquin T, Mattsson O, Næsted H, Fister R, Mundy J (2002) The *A. thaliana* lue1 mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *J of Cell Sci* 116 (6): 791-801
- Bowles D, Isayenkova J, Lim E-K, Poppenberger B (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin in Plant Biol* 8: 254-263
- Brandwagt BF, Kneppers FJA, Nijkamp HJJ, Hille J (2000) Overexpression of the tomato Asc-1 gene mediates high insensitivity to AAL toxins and Fumonisin_{B1} in tomato hairy roots and confers resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersii* in *Nicotiana umbratica* plants. *Mol Plant Microbe Interact* 15 (1): 35-42
- Buerstmayr H, Steiner B, Lemmens M, Ruckenbauer P (2000) Resistance to Fusarium head blight in winter wheat: Heritability and trait associations. *Crop Sci* 40: 1012-1018
- Buerstmayr H, Ban T, Anderson JA (2009) QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* 128: 1-26
- Bujold I, Paulitz TC (2001) Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Gibberella zeae*. *Plant Dis* 85: 977-984
- Bull J, Mauch F, Hertig C, Rebmann G, Dudler R (1992) Sequence and expression of a wheat gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense. *Mol Plant Microbe Interact* 5 (6): 516-519

- Cammune BD, Thevissen K, Hendrics M, Eggermont K, Goderis J, Proost P, Van Damme J, Osborn RW, Guerbelle F, Kader JC (1995) A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol* 109: 445-455
- Chapman NH, Burt C, Nicholson P (2009) The identification of candidate genes associated with *Pch2* eyespot resistance in wheat using cDNA-AFLP. *Theor Appl Genet* 118: 1045-1057
- Chen X, Steed A, Travella S, Keller B, Nicholson P (2009) *Fusarium graminearum* exploits ethylene signalling to colonize dicotyledonous and monocotyledonous plants. *New Phytol* 182: 975-983
- Cluthbert PA, Somers DJ, Thomas J, Cloutier S, Brulé-Babel A (2006) Fine mapping *FHB1*, a major gene controlling *Fusarium* head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theor Appl Genet* 112: 1465-1472
- Collard BYC, Mackill DJ (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil Trans R Soc B* 363: 557-572
- Desmond OJ, Manners JM, Stephens AE, Maclean DJ, Schenk PM, Gardiner DM, Munn AL, Kazan K (2008) The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defense responses in wheat. *Mol Plant Pathol* 9 (4): 435-445
- Desprez T, Amselm J, Caboche M, Hofte H (1998) Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *The Plant Journal* 14: 643-652
- Dill-Macky R, (2003) Inoculation methods and evaluation of *Fusarium* head blight resistance in wheat: In: Leonard KJ and Bushnell WR (eds.) *Fusarium head blight of wheat and barley*, The American Phytopathological Society, St. Paul: 184-210
- Draeger R, Gosman N, Steed A, Chandler E, Thomsett M, Srinivasachary, Schondelmaier J, Buerstmayr H, Lemmens M, Schmolke M, Mesterhazy A, Nicholson P (2007) Identification of QTLs for resistance to *Fusarium* head blight, DON accumulation and associated traits in the winter wheat variety Arina. *Theor Appl Genet* 115: 617-625

- Gervais L, Dedryver F, Morais JY, Bodusseau V, Negre S, Bilus M, Groos C, Trottet M (2003) Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in European winter wheat. *Theor Appl Genet* 106: 961-970
- Gilbert J, Fernando WGD (2004) Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae*. *Can J Plant Pathol* 43: 464-472
- Girault T, François J, Roginaux H, Pascal S, Delrot S, Coutos-Thévenot P, Gomès E (2008) Exogenous application of a lipid transfer protein-jasmonic acid complex induces protection of grapevine towards infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol Biochem* 46: 140-149.
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43: 205-227
- Golkari S, Gilbert J, Prashar S, Procunier JD (2007) Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: identification of organ specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnol J* 5: 38-49
- Golkari S, Gilbert J, Prashar S, Procunier JD (2009) QTL-specific microarray gene expression analysis of wheat resistance to *Fusarium* head blight in Sumai-3 and two susceptible NILs. *Genome* 52: 409-418
- Goswami RS, Xu JR, Trail F, Hilburn K, Kistler HC (2006) Genomic analysis of host-pathogen interaction between *Fusarium graminearum* and wheat during early stages of disease development. *Microbiology* 152: 1877-1890
- Haeberle J, Schmolke M, Schweizer G, Korzun V, Ebmeyer E, Zimmermann G, Hartl L (2007) Effects of two major *Fusarium* head blight resistance QTL verified in a winter wheat backcross population. *Crop Sci* 47: 1823-1831
- Haeberle J, Holzapfel J, Schweizer G, Hartl L (2009) A major QTL for resistance against *Fusarium* head blight in European winter wheat. *Theor Appl Genet* 119 (2): 225-332
- Handa H, Namiki N, Xu D, Ban T (2008) Dissecting of the FHB resistance QTL on the short arm of wheat chromosome 2D using a comparative genomic approach: from QTL to candidate gene. *Mol Breeding* 22: 71-84

- Hardham AR, Jones DA, Takemoto D (2007) Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Curr Op Plant Biol.* 10 (4): 342-348
- Hartl L, Mohler V, Zeller FJ, Hsam SLK, Schweizer G (1999) Identification of AFLP markers closely linked to the powdery mildew resistance genes *Pm1c* and *Pm4a* in common wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 42 (2): 322-329
- Hartweck LM (2006) Rice GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 is a Gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. *The Plant Cell* 18: 278-282
- Hill-Ambroz K, Webb CA, Matthews AR, Li W, Gill BS, Fellers JP (2006) Expression analysis and physical mapping of a cDNA library of Fusarium head blight infected wheat spikes. *Plant Genome* 1: 15-26
- Hippeli S, Elstner EF (2002) Are hydrophobins and/or non specific lipid transfer proteins (ns-LTPs) responsible for gushing in beer? New hypotheses on the chemical nature of gushing inducing factors. *Z. Naturforsch.* 57c: 1-8
- Holzapfel J, Voss H-H, Miedaner T, Korzun V, Haeberle J, Schweizer G, Mohler V, Zimmermann G, Hartl L (2008) Inheritance of resistance to Fusarium head blight in three European winter wheat populations. *Theor Appl Genet* 117 (7): 119-128
- Holzapfel J (2009) Kartierung von Resistenzloci gegen Ährenfusarium im europäischen Winterweizen unter Berücksichtigung des Kurzstrohgens *Rht-D1*. Dissertation, TU München
- Hückelhoven R (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* 45: 101-27
- Jansen C, von Wettstein D, Schäfer W, Kogel K-H, Felk A, Maier FJ (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (46): 16892-16897
- Jia G, Chen PD, Qin GJ, Bai GH, Wang SL, Zhou B, Zhang SH, Liu DJ (2005) QTLs for Fusarium head blight response in a wheat DH population of Wangshuibai/Alondra's'. *Euphytica* (146): 183-191

- Jia H, Cho S, Muehlbauer GJ (2009) Transcriptome analysis of a wheat near-isogenic line pair carrying *Fusarium* head blight-resistant and susceptible alleles. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 1366-1378
- Johal GS, Briggs SP (2002) Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. *Science* 258 (5084): 985-987
- Kang Z, Buchenauer H (1999) Immunocytochemical localization of *Fusarium* toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 55: 275-288
- Kang Z, Buchenauer H (2000a) Cytology and ultrastructure of the infection of wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Mycol Research* 104 (9): 1083-1093
- Kang Z, Buchenauer H (2000b) Ultrastructural and cytochemical studies on cellulose, xylan and pectin degradation in wheat spikes infected with *Fusarium culmorum*. *J. Phytopath* 148: 263-275
- Kang Z, Buchenauer H (2000c) Ultrastructural and immunocytological investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected with *Fusarium culmorum*. *Physiol Mol Plant Path* 57: 255-268
- Kang Z, Buchenauer H (2003) Immunocytochemical localization of cell-wall bound thionins and hydroxyproline-rich glycoproteins in *Fusarium culmorum*-infected wheat spikes. *J. Phytopath* 151: 120-129
- Kang Z, Zingen-Sell I, Buchenauer H (2005) Infection of wheat spikes by *Fusarium avenaceum* and alterations of cell wall components in the infected tissue. *Europ J Plant Pathol* 111 (1): 19-28
- Kader JC (1996) Lipid transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 47: 627-654
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA (2002) Large-Scale Survey of Cytosine Methylation of Retrotransposons and the Impact of Readout Transcription From Long Terminal Repeats on Expression of Adjacent Rice Genes. *Nature Genetics* 33: 102-106
- Kirubakaran SI, Begum SM, Ulaganathan K, Sakthivel N (2008) Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. *Plant Physiol Biochem* 46: 918-927

- Klahr AG, Wenzel G, Mohler V (2007) Effects of environment, disease progress, plant height and heading date on the detection of QTLs for resistance to *Fusarium* head blight in an European winter wheat cross. *Euphytica* 154: 17-28
- Kong L, Ohm HW, Anderson JM (2005) Induction of wheat defense and stress related genes in response to *Fusarium graminearum*. *Genome* 48: 29-40
- Kong L, Ohm HW, Anderson JM (2007) Expression analysis of defense-related genes in wheat in response to infection by *Fusarium graminearum*. *Genome* 50: 1038-1048
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B (2009) *Science* 323 (5919): 1360-1363
- Kruger WM, Pritsch C, Chao S, Muehlbauer GJ (2002) Functional and comparative bioinformatic analysis of expressed genes from wheat spikes infected with *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 15 (5): 445-455
- Li G, Yen Y (2008) Jasmonate and ethylene signaling pathways mediate *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Crop Sci* 48: 1888-1896
- Lemmens M, Scholz U, Berthiller F, Dall'Asta C, Koutnik A, Schuhmacher R, Adam G, Buerstmayr H, Mesterázy A, Krska R, Ruckebauer P (2005) The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 18 (12): 1318-1324
- Lisch D (2009) Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 43-66
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25 (4): 402-408
- Liu S, Zhang X, Pumphrey MO, Stack RW, Gill BS, Anderson JA (2006) Complex microcolinearity among wheat, rice, and barley revealed by fine mapping of the genomic region harboring a major QTL for resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Funct Integr Genomics* 6 (2): 83-89

- Lloyd C, Chan J (2008) The parallel lives of microtubules and cellulose fibrils. *Curr Opin Plant Biol.* 11(6): 641-646
- Lucyshyn D, Busch BL, Abomaali S, Steiner B, Chandler E, Sanjarian F, Mousavi A, Nicolson P, Buerstmayr H, Adam G (2007) Cloning and characterization of the ribosomal protein L3 (RPL3) gene family from *Triticum aestivum*. *Mol Genet Genomics* 277: 507-517
- Lulin M, Yi S, Aizhong C, Zengjun Q, Liping X, Peidu C, Dajun L, Xiu-e W (2010) Molecular cloning and characterization of an up-regulated UDP-glucosyltransferase gene induced by DON from *Triticum aestivum* L. cv. Wangshuibai. *Mol Biol Rep* 37 (2): 785-795
- Mao Y, Yin H (2007) Regulation of the actin cytoskeleton by phosphatidylinositol 4-phosphate 5 kinase. *Plugs Arch - Eur J Physiol* 455: 5-18
- Mackintosh C, Lewis J, Radmer LE, Shin S, Heinen SJ, Smith LA, Wyckoff MN, Dill-Macky R, Evans CK, Kravchenko S, Baldrige GD, Zeyen RJ, Muehlbauer GJ (2007) Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to *Fusarium* head blight. *Plant Cell Reports* 26 (4): 479-488
- Makandar R, Essig JS, Schapaugh MA, Trick HN, Shah J (2006) Genetically engineered resistance to fusarium head blight in wheat by expression of *A. thaliana NPR1*. *Mol Plant Microbe Interact* 19 (2): 123-129
- Mesterhazy A (1995) Types and components of resistance against *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding* 114: 377-386
- Miedaner T, Heinrich N, Schneider B, Oettler G, Rohde S, Rabenstein F (2004) Estimation of Deoxynivalenol (DON) content by symptom rating and exoantigen content for resistance selection in wheat and triticale. *Euphytica* 139 (2): 123-132
- Miller JD, Young JC, Sampson RD (1985) Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. *Phytopath Z* 113: 359-367
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lison P, Nemri A, Harberd NP, Jones JDG (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology* 18: 650-655

- Neu C, Keller B, Feuillet C (2003) Cytological and molecular analysis of the *Hordeum vulgare*-*Puccinia triticina* nonhost interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 16 (7): 626-633
- Nicks RE, Marcel TC (2009) Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? *New Phytologist* 182 (4): 817-828
- Packa D (1991) Cytogenetic changes in plant cells as influenced by mycotoxins. *Mycotoxin Research* 7: 150-155
- Paillard S, Schnurbusch T, Tiwari R, Messmer M, Winzeler M, Keller B, Schachermayr G (2004) QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in Swiss winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor and Appl Genet* 109: 323-332
- Parry DW, Jenkinson P, McLeod L (1995) Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathol* 44: 207-238
- Paul PA, Lipps PE, Hershman DE, McMullen MP, Draper MA, Madden LV (2007) A quantitative review of tebuconazole effect on fusarium head blight and deoxynivalenol content in wheat. *Phytopathology* 97: 211-220
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphey GP, Devos KM, Flintham JE, Beaks J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F, Sundhakar D, Christou P, Snape JW, Harbers NP (1999) Green revolution genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400 (6741): 256-261
- Petersen G, Seberg O, Yde M, Bertherlsen K (2006) Phylogenetic relationships of triticum and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B and D genomes of common wheat (*Triticum Aestivum*). *Mol Phylogent Evol* 39: 70-82
- Petti C, Khan M, Doohan F (2010) Lipid transfer proteins and protease inhibitors as key factors in the priming of barley responses to Fusarium head blight disease by biocontrol strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Funct Integr Genomics*. E-pub ahead of print.
- Pieterse CMJ, Van Loon LC (2004) *NPRI*: the spider in the web of induced resistance signaling Pathways. *Curr Opin Plant Biol* 7: 456-464
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ (2009) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci* 14 (1): 21-29

- Pommer G (1998) Fruchtfolgegestaltung. In: Die Landwirtschaft: Pflanzliche Erzeugung. S.88. BLV Verlagsgesellschaft München
- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glössl J, Luschnig C, Adam G (2003) Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *A. thaliana thaliana*. J Biol Chem 278 (48): 47905–47914
- Pritsch C, Muehlbauer GJ, Bushnell WR, Somers DA, Vance CP (2000) Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. Mol Plant Microbe Interact 13 (2): 159-169
- Purkayastha A, Dasgupta I (2009) Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. Plant Physiol Biochem 47: 967-76
- Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler. Meuer S, Wittwer C and Nakagawara K (eds) Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg, pp. 21-34
- Regente MC, de la Canal L (2000) Purification, characterisation and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. Physiol Plant 110 (2): 158-163
- Rocha O, Ansari K, Doohan FM (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. Food Add Contam 22 (4): 369-378
- Roudier F, Fernandez AG, Fujira M, Mimmelspach R, Borner GH, Schindelman G, Song S, Baskia TI, Dupel P, Westernneys GO, Bentey (2005) COBRA, an *A. thaliana* extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. Plant Cell 17 (6): 1749-1763
- Roy-Barman S, Sautter C, Chattoo BB (2006) Expression of the lipid transfer protein Ace-AMP1 in transgenic wheat enhances antifungal activity and defense responses. Transgenic Res 15: 435-446

- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ: 365-386
- Salamini F, Özkan H, Brandolini A, Schäfer-Pregl R, Martin W (2002) Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nat rev genet* 3: 429-441
- Santaguida S, Musacchio A (2009) The life and miracles of kinetochores. *EMBO J* 28: 2511-2531
- Schaffrath U, Mauch F, Freydl E, Schweizer P, Dudler R (2000) Constitutive expression of the defense-related *Rir1b* gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol Biol* 43: 59-66
- Schmolke M (2004) Molekulargenetische Charakterisierung und Lokalisierung von Resistenzgenloci gegen Ährenfusariosen bei Winterweizen. Dissertation, TU München
- Schmolke M, Zimmermann G, Buerstmayr H, Schweizer G, Miedaner T, Korzun V, Ebmeyer E, Hartl L (2005) Molecular mapping of Fusarium head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx. *Theor Appl Genet* 111: 747-756
- Schmolke M (2006) Etablierung der TILLING-Technik im hexaploiden Winterweizen. Tagungsband der 57. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 21-23. November 2006, Raumberg-Gumpenstein: 25-26
- Schmolke M, Zimmermann G, Schweizer G, Miedaner T, Korzun V, Ebmeyer E, Hartl L (2008) Molecular mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in a European winter wheat population. *Plant Breeding* 127 (5): 459-464
- Schroeder HW, Christensen JJ (1963) Factors affecting resistance of scab caused by *Gibberella zea*. *Phytopathology* 53: 831-838
- Schweizer P, Hunziker W, Mosinher E (1989) cDNA cloning, in vitro transcription and partial sequence analysis of mRNAs from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) with induced resistance to *Erysiphe graminis f.sp.tritici*. *Plant Mol Biol* 12: 643-654

- Schweizer P, Pokorny J, Abderhalden O, Dudler R (1999) A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 12 (8): 647-654
- Semagn KH, Skinnes H, Bjornstad A, Maroy AG, Tarkegne Y (2007) Quantitative trait loci controlling *Fusarium* head blight resistance and low deoxynivalenol content in hexaploid wheat population from 'Arina' and NK93604. *Crop Sci* 47: 294-303
- Shin S, Mackintosh CA, Lewis J, Heinen SJ, Radmer L, Dill-Macky R, Baldrige GD, Zeyen RJ, Muehlbauer GJ (2008) Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *J Exp Bot* 59: 2371–2378
- Sidahmed AME, Wilkie B (2010) Endogenous antiviral mechanisms of RNA interference: a comparative biology perspective. *Method Mol Biol* 623: 3-19
- Sindhu A, Langewisch T, Olek A, Mutani DS, McCann MC, Vermerris W, Carpita NC, Johal G (2007) Maize brittle stalk2 encodes a COBRA-like protein expressed in early organ development but required for tissue flexibility at maturity. *Plant Physiol* 145 (4): 1444-1459
- Sindhu A, Chintamanani S, Brandt AS, Zanis M, Scofield SR, Johal GS (2008) A guardian of grasses: Specific origin and conservation of a unique disease resistance gene in the grass lineage. *PNAS* 105 (5): 1762-1767
- Somers DJ, Fedak G, Savard M (2003) Molecular mapping of novel genes controlling *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol accumulation in spring wheat *Genome* 46: 555-564
- Siranidou E, Kang Z, Buchenauer H (2002) Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. *J. Phytopath* 150: 200-208
- Snijders CHA (1990) The inheritance of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat. *Euphytica* 50: 1-18.
- Srinivasachary, Gosman N, Steed A, Simmonds J, Leverington-Waite M, Wang Y, Snape J, Nicholson P (2008) Susceptibility to *Fusarium* head blight is associated with the RhtD1b semi-dwarfing allele in wheat. *Theor Appl Genet* 116 (8): 1145-1153

- Sun J-Y, Gaudet DA, Lu Z-X, Frick M, Puchalski B, Laroche A (2008) Characterization and antifungal properties of wheat nonspecific lipid transfer proteins. *Mol Plant Microbe Interact* 21 (3): 346-360
- Steiner B, Lemmens M, Griesser M, Scholz U, Schondelmaier J, Buerstmayr H (2004) Molecular mapping of resistance to *Fusarium* head blight in the spring wheat cultivar Frontana. *Theor Appl Genet* 109 (1): 215-224
- Steiner B, Kurz H, Lemmens M, Buerstmayr H (2009) Differential gene expression of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance effect *Fusarium graminearum* inoculation, *Theor Appl Genet* 118: 753-764
- Tiemann U, Dänicke S (2007) In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Add Contam* 24 (3): 306-314
- Utz HF, Melchinger AE (1996) PLABQTL: a computer program to map QTL. Release Version 1.1 Institute of Plant Breeding, Seed Science and Population Genetics, University of Hohenheim, Germany
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol and Mol Plant Pathol* 55 (2): 85-87
- Voss H-H, Holzapfel J, Hartl L, Korzum V, Rabenstein F, Ebmayer, Coester H, Kempf H, Miedaner T (2008) Effect of the Rht-D1 dwarfing locus on *Fusarium* head blight rating in three segregating populations of winter wheat. *Plant Breeding* 127: 333-339
- Walter S, Brennan JM, Arunachalam C, Ansari K, Hu X, Khan MR, Trognitz F, Trognitz B, Leonard G, Egan D, Doohan, FM (2008) Components of the gene network associated with genotype-dependent response of wheat to the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. *Funct Integr Genomics* 8: 421-427
- Wang X, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang C, Liu B, Qu Z, Zhao J, Han Q, Huang L, Chen X, Kang Z (2009) cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striiformis f. sp. Tritici*. *BMC Genomics* 10: 289

- Wang X, Liu W, Chen X, Tang C, Dong Y, Ma J, Huang X, Wei G, Han Q, Huang L, Kang Z (2010) Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. *BMC Plant Biology* 10: 9
- Werck-Reichhart D, Feyereisen (2000) Cytochromes P450: a success story *Genome Biology* 1 (6): reviews 3003.1–3003.9
- Yan H, Talbert PB, Lee H-R, Jett J, Henikoff S, Chen F, Jiang J (2008) Intergenic Locations of Rice Centromeric Chromatin. *PLOS Biology* 6 (11): 2563-2575
- Yeats TH, Rose J KC (2008) The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science* 17: 191–198
- Yuan H, Chen X, Zhu L, He G (2004) Isolation and characterization of a novel rice gene encoding a putative insect-inducible protein homologous to wheat WIR1. *J Plant Physiol* 161: 79-85
- Yuen GY, Schoneweis SD (2007) Strategies for managing Fusarium head blight and Deoxynivalenol accumulation in wheat. *International Journal of Food Microbiology* 119: 126-130
- Zhou W, Kolb FL, Riechers DE (2005) Identification of proteins induced or upregulated by Fusarium head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 8: 770-780
- Zhou W, Eudes F, Laroche A (2006) Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. *Proteomics* (6): 4599-4609

8. Anhang

8.1. Chemikalienverzeichnis

Enzyme

<i>EcoRI</i>	New England Biolabs, USA
Hot Start Taq-Polymerase	Thermo-Fisher, Großbritannien
<i>MseI</i>	New England Biolabs, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNAse	Roth, Karlsruhe
<i>Sse8387</i>	New England Biolabs, USA
<i>TaqI</i>	New England Biolabs, USA
Taq-Polymerase	Thermo-Fisher, Großbritannien
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, USA

Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Roth, Karlsruhe
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Annealing Puffer	Biotage, Schweden
APS	Merck, Darmstadt
ATP	Roth, Karlsruhe
Binding Puffer	Biotage, Schweden
Borsäure	MP Biomedicals, USA
Bromphenolblau	Pharmaia Biotech, Freiburg
BSA	Amersham, Braunschweig
Chloroform-Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma-Aldrich, Seelze
dNTPs	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	J.T. Baker, Niederlande
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Seelze

Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	ICN Biomedicals, Ohio
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Seelze
High Performance Buffer	Thermo-Fisher, Großbritannien
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Thermo-Fisher, Großbritannien
MOPS	Sigma-Aldrich, Seelze
PCR-Puffer	Thermo-Fisher, Großbritannien
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumbisulfit	Merck, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NaAc	J.T. Baker, Niederlande
NEB2 Puffer	New England Biolabs, USA
NEB4 Puffer	New England Biolabs, USA
NEB Puffer	New England Biolabs, USA
Pepton	Roth, Karlsruhe
SDS	Merck, Darmstadt
Soc-Medium	Qiagen, Hilden
Streptavidin-Sepharose	Amersham, Freiburg
TRIS	ICN Biomedicals, USA
TEMED	Merck, Darmstadt
Xylencyanol FF	Merck, Darmstadt
X-Gal	Roth, Karlsruhe

8.2. Basislösungen

DEPC-H₂O

0,1% DEPC

H₂O MilliQ

Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur, anschließend 2x autoklavieren

TE-Puffer

10 mM TRIS, pH 8

1 mM EDTA, pH 8

TE_{0,1}-Puffer

10 mM TRIS, pH 8

0,1 mM EDTA, pH 8

10 x TBE-Puffer

0,89 M TRIS, pH8

0,89 M Borsäure

0,5 M EDTA, pH 8

Lösungen für einzelne Arbeitsgänge**DNA-Isolation**Extraktionspuffer (Anderson et al. 1992)

100 mM TRIS

50 mM EDTA

500 mM Natriumchlorid

10% SDS

20 mM Natriumbisulfit (frisch zugegeben)

Waschlösung 1

76% Ethanol

0,2 M Natriumacetat-Trihydrat

Waschlösung 2

76% Ethanol

10 mM Ammoniumacetat

SNP-AnalysenDenaturierungslösungen

0,2 M Natriumhydroxid

Waschpuffer pH 7,6

10 mM TRIS

Formaldehyd Gelelektrophorese1,5 % Gel zur Bestimmung der RNA-Qualität (denaturierend)

1,35 g Agarose

55 ml DEPC-H₂O

18 ml 5 x RNA-Elektrophoresepuffer

17 ml Formaldehyd

5x RNA-Elektrophoresepuffer (alle Lösungen mit DEPC-H₂O angesetzt)

200 ml 0,5 M MOPS pH 7

8,3 ml 3 M Natriumacetat pH 5,2

5 ml 0,5 M EDTA pH 8

287 ml DEPC-H₂O

RNA-Beladungsfarbstoff

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol FF

30% Glycerin in DEPC-H₂O

RNA-Beladungspuffer

2 µl 5x Elektrophoresepuffer

3,5 µl Formaldehyd

10µl Formamid

0,1 µl Ethidiumbromid (Konzentration: 1/10 000)

0,5 µl RNA-Beladungsfarbstoff

Agarose-Gelelektrophorese0,8% Agarosegel (100 ml-Ansatz)

0,8 g Agarose

100 ml 1x TBE-Puffer

5µl Ethidiumbromid

2% Agarosegel (100ml-Ansatz)

2 g Agarose

100 ml 1x TBE-Puffer

5µl Ethidiumbromid

10x DNA Beladungsfarbstoff

30 ml Glycerin

50 ml 10x TBE

1 Spatelspitze Bromphenolblau

PAA-Gelelektrophorese

5% Polyacrylamidgel

85 ml 8,8 M Harnstofflösung

12,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 40%ig

60µl TEMED

260µl 10%ig APS

2,5 ml H₂O_{MilliQ}

Beladungsfarbstoff für PAA-Gelelektrophorese

500 ml Formamid

150 mg Bromphenolblau

150 mg Xylencyanol

10 ml 0,5 M EDTA

Klonierung

LB_{Amp}-Agarplatten

10 g/l Pepton

10 g/l Hefeextrakt

100 g/l Ampicillin-Stammlösung

15 g/ Agar

0,05 mM IPTG-Stammlösung

80 mg/l X-GAL Stammlösung

8.3. Abkürzungen

A Adenosin

ABA Abscissinsäure

AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CCD	Charged-coupled device
cDNA	Copy-DNA
cDNA-AFLP	Copy-DNA-Amplified Fragment Length Polymorphism
cM	centi Morgan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleotide (= Desoxynucleosid 5'-Triphosphat)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed Sequence Tag
ET	Ethylen
G	Guanin
GA	Gibberellinsäure
gDNA	genomische DNA
hai	hours after inoculation
INDEL	Insertion/Deletion
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MOPS	2-(N-Morpholiono)-Propansulfonsäure
NCBI	National Centre for Biology Information
NPR1	Non Expressor of PR1
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PR	pathogenesis related
QTL	Quantitative Trait Loci

RNA	Ribonuceic Acid
RNase	Ribunuclease
ROS	Reactive Oxygen Species
SA	Salicylsäure
SAR	Systemic Aquired Resistance
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
T	Thymin
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TDF	Transcript Derived Fragment
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyl-Ethyldiamin
TIGR	The Institute for Genomic Research (Craig Ventre Institute)
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
WIR	Wheat Induced Resistance
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

8.4. Liste der TDF-Sequenzen

>TDF_001

ctgcaggaggagctcgacgccatcccaaggccaagaaactagtgagagaagtccttgaagcaacagcagaagttgcagcatatgcttgcacaatgccacctggg
atgctgtaggatatcgttgcctactcctctggaacaaagctgtacatgagggggaggctaacattggagaaggfta

>TDF_003

ctgcaggatgctgatgatgcccaggtagagcaccagtcatacactcgtagaacgacttctgtcatcctccttgggatctgctccgccctcggcgcgatgtcacc
cccagctggatctgaaccctagctgtgccaggaagcaggagatccacttcccaaatccagcagccgacgaccgcaatcgcttccccttatgtgagcccaacga
ccacactgtctcgtcgttgcctttgaaccagaaccaatccttctgggtggttaa

>TDF_005

ctgcaggtaatagcagatcaatctccgtcactttgaggctcatattctgtccattacacgtatgagatgggtgtagtggaattgcttttcatcatgtcctatcactgtga
aggcatgcacttttgcatattctcgttgggttcaagtgccattacaacaagggcatgttctttctacttcgaaattgaatgctaactttttattgtaataaatatgtg
ttagaataggaggttagagcaaaagcctatcagtaaatcaatcgatcttctctatggtgtatacttgaagggtgcaatttaaacgttattccttcttacaatggacgg
gcgcaacaatgtgcgccttgttgcctctggatggtgcttcttaataataaagtggtcttccctcttctgctggtgcttctgtaattataatcgaagtggtcttccctc
ttgctgatctgatttctggtgaaaacagtagtgattttgacctgggtgtctgtgcttgcagacgaatgtttactacacatggtgtaa

>TDF_006

ctgcaggaggagcgtgcaaaggctagacagtgtgatgtggattccgggactactgaaaatcgaggctaaggatacaaatggcggagaggcagccgggcatgga
ggcggcctgaaatttcagcgggtgcctcccgcatttttaggggaaggtttatggggggagacttgtatgagatctcacattaggaaggaacaggtacagcgggtcata
gagtgccagggttaa

>TDF_008

ctgcaggagggtgggtgcacaggaggcaagtctgattgactctctcttgggaagcgacgacatcagctaccgaaagccgactctgagcttgatgaagtgggtg
tccagttctcaacagtttcattatgctgcttagcagcaccgtattattctccgtcattaggaggctctagatcaactttcatcagtggtggaaatggcctatttatca
ctggtggaactcaaaactgactcctatgtatcattggcgaatcacattattctgagatatctgattgctccaccagggttaa

>TDF_009

ctgcaggagagaccaacaacagttgacttctctggtgcgctaacggcatgcaggttgaaattgtgcaaaggaggagttcttagtcatgggtgcaagatcca
gtcaatgcagtgccatggttcagatcactgtggccgatccggaacgagcaacaggacagtgaaagcaccgaaaaacttcacctcaaggccccagggtccagggt
atacctgtggagcagcccagaagtaaaacctcccactaagttcatttcgctgatggaaggagaacaactcaagcgacgtgacttgggatgtgatgacatattc
acagtttgtgctaaagaggtcctgcttggcgtgactatcatcgtttacaatgaacgatagttgaccgccccaaatgttcatgtggctgccccaaatgacataacc
aacctgggagctgcgtcagaggtta

>TDF_010

ctgcaggatgactaggaccgacggcggagatgtcccctcagagcacattatgatcaaacgccccttgcgagaaggagctgctgaatcaccgacttctgctgctg
aagcacgagtcgctgtgctgatgacgatgatgggaagatttcatccaccagggttagtgcccgtgcttcatctcggcagaagcatgccttcgctgtgcatcagc
gcaacctcgtaa

>TDF_011

ctgcaggagtactgctcattactatgaggatgaggctgctcctacaggcacatgtgctgtatgtgtgttgggtggcgaagggtcattgattgcaaaactatctgctgcgaa
ctgtacaatctgagcatctaaagaagccagagaactgggcactagttagaaaagcaaaatcatctacattgctggcttttcttaccggtgtcccctgaatctattca
gcttgtgctgagcatgctgctgccaataacaaggtttcttgatgaacctctccgctccctttatctgcgagttttccgtgatgcccaagagaaggttctccgtatggg
actatactttgaaatgaaactgaggcaaggtctctctaaagtccgagggtgggagactgagaatgtcgaggagatcgtttgaagatctcacaactgcctctgct
tctggaaaacagaagaggattgctgtgattactcagggtgctgatccagtgttggccgaggatgggaagggttaa

>TDF_013

ctgcaggatcaaataccaccatttctactcgtaaagcaatcaggaccatcagctcgaactgggctctcgaatgtctgatctatttctgatatcagcccagagccaatt
gcagcagcatcactgggcaagtatacaagctcatctacactctggagagcttggcaatcaagttcagaggcctggaatggcaccttctgacacctagatgca
cttctattcaatatgattggaggacagctaaacgatttgctaaggcccgaagatttattgtagctgttaa

>TDF_015

ctgcaggatcggaggcgattgtgtccgtccaattcatgatgcttgcggcacaggcgaacagctgatacgggagggcgggggactcgtttcgggcttgtttgcgc
aggaggctgttgggtgctggttcggtgacgactcggggaggttatcgtcgtaa

>TDF_016

ctgcaggataatcaacctttgatccaatacgtatctgtttgcatgctcagctgattatcaatataaacatggcagataccatcagcatgaccaagaacgggaa
tcttggttgtgctttgatttgagaacaagcctcaaacctcctgcctaaacggcgatagctccctctaaagaagctagctgcggagggtggctccgcatagctagtag
caggctgaggctctgttcgttaa

>TDF_017

ctgcaggattagaatttcacaaaagttgcatcagcagttgtgctatgggagttgatataatctatggttaccgcaggaatcatatctgtgagaagctgaactgaagtatt
gtctctgtgctgaaattcatgatcgtcacaattggcattgtccattgccagtactgctaattgcttcacctgcggcttcttgagtcctcactctcattagcagcatcaaag
aagatgtccatcaagtcgtaa

>TDF_018

ctgcaggctgccgcggacttgatccagcgcacaacgcatggtggacgtggacattagagctgtttgcaataaggatctccaggctcggcatcatcaggacaaga
atctctgaaccaaaggagatgactatgtaatactgattccccattcccacacctttgccctcatgcttcaagcttcaagttgccccctgcaactgccatcacaagacat
gtccggaagacagcgtgctatcgcagccattaggtttatggaggatgcatgcggcaaggaaattagggattatcactactcccacgttaa

>TDF_019

ctgcaggcttgaacgggcaggcagctgggactctctcgggcctctgtattccatccaagcatgcgataaaccttctgaggaggaggtcgaagaggtaggggag
cgcgttgacgaaggggatgagggaagagcgggatcaggcacgccacgcacacatagcttcgtcggggaggaggaggaggagggatcgggagcgcggaggga
agcagtcagtcgtctggattttgaccggatcggcccgttaagaccggccttgagccaaaaggaggggacatgccccgttccgaccacggaataagtaaaata
acgttaa

>TDF_020

ctgcagggtactgtaacggtgctcctcgtatcgcacatataatagtagtactgcatctgtatggctcgggaatggtgagaagtcccagtcgaaacacgtcct
gcgtagccttccggcatcaattcgagttgcggtaa

>TDF_022

ctgcaggctctggtgcttccgacctaacgccctgctgtcccgtcagcgggtggtgctggtaaacctacaccggccgtcggctcctcgttaagtaccgctgctacc
caccggctggtggcaaccctaagtaagatgcaccggcccgcggcagaccccgcccccaaaaataatgcaaggatcgtatgatataatgtaactgaacaacgg
cctagatgcatatactatgatgcatgcacgcatgcctccgacgtgtctatgcgattattctattgcatgcatcacttatactcctacagtaattattgttctctac
tattacactctgaataaaactggatataatgtaa

>TDF_023

ctgcaggaccacctcaagcacgcgcgactacgcgctcagggcctctacgaactttccatgggatattgatgaagcactcaggcggaggtggaaaagcgtatct
atattccactcatagtttgaagcagaaaagtcactcatcagcataaatcttaggacggttaggtgactactgacgttaa

>TDF_024

ctgcaggcaaaaactaaattcagaagttctcataccacgaggtagccaggaaataaacctgagacatacagcggacagaatcacaggtaccaataattccat
gtgggcttattgcgagtaa

>TDF_027

ctgcaggctcttccaagttgggacaattccatcgaatcgacagtgatgacggatgagtcgagcgggaggttgcatagtggaacgacacctgc
ggcaacctgaacactcgggatgtgagggtcgtacttgaacagctcctggagcatcacgttaa

>TDF_029

ctgcaggccatcagaagtcagcagatgatgctcactcctatggatggcggccagataggtgtaccctcatcttactgtgtacaacattatggctttgttattcatcta
agcatggaaaaatagattatcaaatctactgtatattcatgttgatctcttacgggtcttggcaggagtaa

>TDF_030

ctgcagggcgaggactcgcagattgcagaacccccctgcaatgacgtccagatcgtcgtcgataacaccgggtagaacgagcgagacgggtgactgggagagat
ccagctcgagaatgcccaggaagcgtgctgccaggcggcgagcatggacggaccggaggttaa

>TDF_031

ctgcagggccccggaggttccgctgtagcaagtccgaatatcgttggctgctggcagccactcctaactgcgctaataaactgggtccgagaacctctacat
catttctgtgaaggtaatcaaggggcctgaacaggctcccttctgcctgaggttaa

>TDF_032

ctgcaggtcctccaacatcatcagcggctaaccctagccgctgcaactgttgggtgcagcgtcgccatggacaccggcggcgctgcacctacgactgttctc
cgactactccgcttgcctacgagcatccacctcctggatggactcttggc gatggagagctcaggattcatccccaactgaatccaccgtgctatcacgct
cagcttcgtgtttatggcggctgctggaagccagtgacaagtacagccactcttactcacctctatatatgtaggggttaa

>TDF_033

ctgcaggtcccatatctggcagcatatctcagagcccgaatcaaatattgctgattatcacgcatgaaaaaatctagcagttcacttcgtccgaatgccagaaag
agtacacatagatctggaagaatcaagactccaaccttactgtgtgatctctgaagcactagcaaaactgttgggttccatgggttaa

>TDF_034

ctgcaggtctcaccagcctagcttccatggcgacctgggatcggaacttgaagggcgcgctccataccagatcttctgtaaatagggtccgatgccgatctgttccg
ggcacgctgtccttctgtcctccttgcctgctgctgattgctggaaccactcctagttcggggccttgggttaa

>TDF_035

ctgcaggtcgaccaccgcaagcgcgtcggcgttctcgcgaagccggcctagccaagacggagtgatcaaggtccagcgttctaagccgacctccataga
gtttgtttatcgggttctgtttgtgattgatttctgtgtgagctggccataatggcttgcggctcgtcgggttaa

>TDF_036

ctgcaggggttactcaggactcatcaacgaatgcaaggccatgggttttgaagatgccttcccgcgttcgacagcactgggttactcaggactcatcaatt

>TDF_037

ctgcaggatgagatggcggatttgatggatgtgggtaatgagatccaggagactggcgaggagttagatattcctgatgatgtgaggaggacgagttggatgct
gagcttgaggcttggggatggaggttgagatggagcatgagatggcggtgcccgtccgggttcttgaagacgaagccgtgccagattcgtc gatgagccgc
cccagactgaggacaaggtgaagcaggttctggttaa

>MD038

ctgcaggatcaagacatgtgcctcaccgtgaaaccgcgcccgagattaccgtcatcgcccagcgacgcaagtgggcacgcgcttctgtctacgacctgccgcc
agcaggggtgacttcgccctgaaaactgcaatgccgacactggcgtctaggattgatcttctgttctctgtagcggtaaccaattc gatgtggttaa

>MD040

ctgcagggcaacgtgaccatcgcagccaaggctggagtcaagttggagatcccagcggagctgtgctggagaacaaggacatcgacggccccggagatcttg
agcgacgccgccgcttggcagttgcatcccagaacctccggctccttctggtgaggttaa

>MD041

ctgcaggacacaactctatccaagcacatggtacaaaacaagtgatctcaatccaaagtattgtattcaagataaccaggagaggaagagatggtggagaag
cgtgatctctttcgggctggaggaagaagtagcgtccaatcttccgataatattcctcagactatgagtgtctatgatcaggtctctgtgtgcttgcctattcctgcac
ataagggcaacatgacaggcttgcgatgaaagtaactggatcgagggtgcaagccactgacgcggctagtcacatagccgatgcgacgttaa

>TDF042

ctgcaggctcgaactttccgagtcgctaccccagattacaacaataattatgcaggaaccatcgtgttgcagaagaggctacggaggaggccgtgcagttgagatgc
cgacaaggagtagtgacgagtagcaactagcgggtgagcatgcaacaccaattggaaggtgatgtgcaagacgattcggcgaacgatccatgttaa

>TDF_043

ctgcagggtggatgatgattggttatggcgacgagaagatagattcacgtatatattgtactccaatctggagtcagaaactctgcatatgactgatgtactggt
ctatgtattgaaatcgtgctcttggcactttcgaagaataaacaggagtcgagfatgtatctattgcaatgattatccacggacatggcagtgaggacattacgtgg
cctgcccgtgctcccgtacgtaactaatatgtttgattgtgtgcacgcgttaa

>TDF_044

ctgcaggcgagcaaggccagggtgacgcggcgaccctgctgcacgcacgtgcaaacgcgcgctctggccgtcccagagcacgcatgccaggtgttc
gacgaaacgccagcgcgtgctagagagctagggtgatgctgtagttaa

>TDF_046

ctgcaggcgagaaaggacctacagccctggattgctcgatgacgaggaaggtcagaagatgtggagagcaaccagcgaatagttaa

>TDF_047

ctgcagggtatggaggttctctgctgcgatgctgggcttatggcaatccaagtgtgctgcatctggtaccagggtggcctccaggcctaatagaggccctg
ggcagtcgaactccatctggttatggcactgtgggttatgctggcaatgcaggctatggtgatggaatagctctctgctggtgggaatgcaccactagtcaggca
cctggtgcagctgcaggttatgaaaccagggtatggttatggtgatgagagatgcatcatatgaaatccttactggtgcagcctctgggtatggtgctg
ctggatggaagtgggaatgaaactctggatatccaatgcgtgactgatccttcacaaggcggaggattggtggtgcagcaatggagcttctgaggccaat
caaatatggcagcgggttatggtggtatgcagcctagggtgctcagtagaagaggccgtataatgttcatggtgtgaaccagtgcaattggcagcatatgtatttg
cagtattctggttctctcgtcttctgaagaccatccattctgccggttaa

>TDF_048

ctgcaggatcatgagctgtggcgcccaacccttatgaccatgcctctatfttgacacgctcctcgaactcgtctgcagccattcctcacttctggaagcttagctct
gctttgatcaccnaataaacggttctggagggttcaagtcccagctccagctcaacaagctgtgaggtgtagtgcaagcaggctgcctaagctgacaaagacca
ctgagcctggcttcattgaatcaagcattgcaagcactgtgcttcatcattgacgccttgttctcttgcggccatagttgtgtctcggtgacagaggcacattggt
ccgaccgccagaccttcttctgtctgctcaagattcaatgtacaatgtcctcagctcctggaagctgttaa

>TDF_049

ctgcaggattggagagcagtgccggctggccgctacaatgctaccagatcactctggtcaagactaaagcaactcctctcctgcccaagcactactcctct
aacctcattctccaaatctttccacgaaatttacaaggacacagatgatgcagatattgtatgtatgattttctaaaactgtttgacattggaaaattatttccacg
caggtgcacgtatgaattgtcctatgcagctgctgatttctcaccaccaatfacactaccactgaatcaggtaaaaaaacaagctcactaaactgaatgtagtgtg
caccaacataaactcgttaa

>TDF_050

ctgcaggatgctgcaaaagcatcaaggccagaattgcgacgaaccctaactgftgaactcaacgcatggtctttcaaacagtgaatcggtgatgaagggtga
atggatagcctggcttttccattctcatgggctgggtcctgatagtcagcatagcccgtcgaaaaacagagactgttgccctaaagtaaactgtgctctttgtcaaaa
gttatgtctttgtcttctgcttttgcatacaaaaagaggatattagttgctggattgaaaaatgtgtactatacttttggctttttatcgtaa

>TDF_051

ctgcaggctgtattattcgtacctgcctcaagcttgggtgtgtgtgtgcgctcgaagtcgctgtattgccaccaagaatcccactgtattcagagatggcatgc
atctccctgttcgttgcgtatcctctgtgtaacttctcagaacctaactgtaa

>TDF_064

ctgcaggaccacctcaagcacgctcgcgactacgcgctcggggcctctacgacacatccatcatcttctcgcggcgcctcgcgagatcaacaagcatctag
ctaatttagatgacctgacaaatgtttccgtgatgcttcgatgaatggatgaggcgaaaattgttggcttggcagctaccaactttccatgggatattgatgaagcac
tcaggcggaggtggaagcgtatctacattccactccaagtttgaagcagaaaatcactcatcagcataaacttagaacggctgaggtagctactgacgtaa

TDF_066

ctgcaggctgcccgacttgatccagcgcacaacgcatggtggacgtggacattagagctgttgaataaggatcctcaggtcggcatcatcaggacaaga
atctctgaaccaaaggagatgactatgtaatactgattccccattccacatctttgccctcatgttcaagctcctcaagttgccccctgcaacttaccatcacaagacat
gtccggaagacagcgtctatcgcagccattaggttatggaggatgcatgtggcaaggaaattaggattatcactactcccacgtaa

>TDF_075

ctgcaggctcgtagactgcgtacatgcagccgagcagatggacaccgacgaaccgatcctctcctggcataggttattgtgatcgaagcagtttttatctgcaag
cttttggcttctggcacgcacgattgcgagcaaggtatgatgatgttggaaactttgagacagttcggtagttagtagctgtctgcctcggacttggcgtctgg
cttcttggcgggtgggtgatgcagatgcaggggtatctcagatfttggctcctgatgctggcggtatcttctgtagttctatagccatcaagggttgagccatgtaa

>TDF_076

ctgcaggtaagcgggaagcagcagagcagcatggcggagcaagatgtgtagagcaggccagggcgaggcggctggctgactgacaacgggagtagga
ggattgctgatcggcgttctatagattggatggcattagtcgftaaacttctcctaacggatcaactgtgatacagaatttgaagccgtgacgatgtactata
ctgccgtaagttgctgtatgttctgctgctgccctctcctcatgtaaaattggaccaaacatagttttatcagttcagtttggctttcttggcgtgcttcg
gtaa

>TDF_085

ctgcagggtgtcccaacttagccatcacaagctctcacagtaacgaaggatattccttctagcgggaagccccgatcaggcttgaatcccgttacaagacatc
ctcgacaatgtaaaacaagtccagcaagaccgcccgatgcccacatcttgatgggagctgcacatatctcgttctcagggcaacaccggatgaacactacgtata
tctaaaaccatccctcaagttcctcaggtggcggcgaagtgctctgttcggaccaaacattagacaagcactggccccgggagttactcaggactcatcaatt

>TDF_086

ctgcaggcgtgtggtgcttggctgtgggtgtgtaggcttgcggcggcggcagctgggatccctgcactggagcgcgtcggcggctgctgcacgagaagtcca
tggcaaggttgaagccgtcgtaccgagatgctgtagtagctgggtgctgccgccggatggtgactcggccagcgttctggtgtcccccggagagggga
gcagaacagctggccgccgagtcgccggttcggcagctcccgtcccgccatgaaggagcaccgggtgcgagccccatctcccggcttgggtgccgcg
ggctcgttgatgctggacgtctggcctgcgccagctcgaagccccaccaccgggatccccggccatattgtgaaccgcagtagttctcgtgtgaaggt
ggccgcggcggcaccggcagcaaatcagcgaggaggaggaagagctcccggaaggtcgtcattgccggaagctctagtaa

>TDF_088

ctgcaggcctccgccaatggactgtcagtgagaagtcgatgtgcttctcgattcaaccctacatgaacgacgggacattgacgatctgcctgccaacctga
tftggcgtgctgatcaagccacgggcatggatggatgattttccatgccagcctgaagacaagagctgaaggcgccttgaaggagttctcagcagtcagg
gcaaggacgtaatacaagctgtcctggcctcagcaaggagacatagcggttcatgcgacggagaagagccgcgcctcaagatacggcgggattcttctcat
ccagtgtagcaagtgcttggccgattacggatctgctcaatgcatactgaaccctccagagctcagccttgacacctcagtcatactaccaaccagctttagtctg
catcaagacgctccttctcataaggacgcttggtttctaatgtctaaccatagttgcggtagaagttgacgtgcaccatggctggagctctctctctctctcccg
ctgccgccgccgccgctctgtggtcaggttaa

>TDF_089

ctgcaggccttggcgtcgtatcaagatgggtgccacaaaggccgactttgacagctgcgttgcattcatctaccagcgtgaagagattgtgacattgaaataga
gagaggatatagacattacgaatacaaggttaa

>TDF_090

ctgcaggctacggctccttgagttgacggctgcgcccctttaccatcagcgtcgtcaccgcgcctagttcatattctacagctgaaatattattgtaacagtcttctca
accattgtttatcaaaaaggttcagagttctattgggttaa

>TDF_091

ctgcagggtccaccgggtgatgagttctccctggcaccctgggtccagctttaaagcgcgaagaatgacgatgcatggacgaccttcaaggatgatgaacc
tgacaagtacgccagaagaatgtctagggtccagctgcatctcctcctcaagtcctaataatgtacctggataagtgtaggtggatgatcctccagaccaga
gactacttcttgatgactgtctagatacaaaaactatgcaagtacctgcgttgaggtgacaatgagaatgcactttctgttgcctgatttagcatttcttctcaca
aattatcctcagcagttatttttgggaatcatgtttggaaccattagttcgtggttcatcaaccgacctgaaagctcatcgcgttaa

>TDF_092

ctgcaggactaccggaccctcgaggatattacgcccttgagaaaagccgaccggctgcggctcatgattctatgtgccaccggggccagccgctcatataagcctt
agcacaatttggaaagcacgttaa

>TDF_093

ctgcaggatgctgatgatgccaggtagagcaccagctgtacacctgtagaacgacttgcctcctccttgggatctgctccgcccctgcgggcatgttcagc
cccagctgaaatctggaccctagctgtgccaggaagcaggagatctacttctcaaatccagcagctgacgaccgcaatcgcttccccttatatggggcccaacgac
cacactgttctcgtcgttaa

>TDF_095

ctgcagggcagccaagcggccatggtgcagctgacggcctgtggaggctgtcagggcactgtccaactacatgatgttctcctggtggatgccccgacatgct
accaggccttctcagaactggctgtacaagaaaacctgcaccaatctggacgacttgtgtaagaacgcctagttggttctcgaggcaacatcttaccgcgctcaag
agattgttcggaccagccatcaccgccgctgcttaa

>TDF_096

ctgcaggccttattcgtccttgaaggatcctcagcggacgtccgaaactggttgcctggctgggtcagctcgtgaaagtcggccatccattttggagccaca
tttgaaaaattgactgaattgatcctgcaagctaacaagattcggatgatgaagttgctctggaggctgtgaattctgtcagcgtattgtgatgtagcatgccccctg
aaggactcgggagttcttggcaccgcttaa

>TDF_097

ctgcagggcacaagataactcagacacctaatctcagcgaactagtaagatctaatactccaagcaggagattggaagaagcactctaactcattccacgt
aatgctcacacagcacaggtacagcctgtcagccttcaagggccaagtcaactgtgggatgaaggtcacaacgaagtgaaaggtgcttaa

>TDF_098

ctgcaggcctgctagccgtgtgggaacatcaaggtgacacctgtaatggccactggacaaggcatcgagggtgctcctgtcttcaacggagccgtgctgtttca
agggatctgtcagggactggaacttcgacgagatcgttattgggaactagagtagtaggggtgccagcagttatcccaggctggacattggactattatctggcagga
gttgatgtacattttctagatatacatctggatatctatgtactatattagatgcgctcaatcaagagcaaatattcaagagtactggttactacatagagaccgctcctg
gcttgtatataaattgccaatgtgtagttaa

>TDF_102

ctgcaggcttatcgggtagagagtagacattcaagtaattaccatacagtgagccatttccggaagaagggtgcacgggtgatgcagtcgtgggagctcgt
gtccagatcctgacttcccggcgacgagcatccttggcagtcgggacgggaccaaccaggaafttgaaggcggacctctgatgccctgctcctgaaccacct
ggccacagcgtatggcctccaagcagataccatagcgtccttggatcaccagcagtgtaggacagcggccagggtgactacgttaa

>TDF_103

ctgcaggacaccttcttctatcctgtctgaggcgatagaggacttctgcaatgcagagtcatttgcacgatttcttaagccctgaggacttctcaacgaagagtcatt
gcatcgatttcttaagccctgaggacttctcaacgaagagtcatttgcacgatttcttaaccccaaggacttctgcaatgcagagtcatttgcattgatttcttaacc
tcttctagtgtgttgcctccttcttaagggaacaaccactgcctctggtgggtcagctgcattcatgtccacgttaa

>TDF_104

ctgcaggatgtggtgcataacgagaagagggaaggcgcctatggcgaagaaggaggaccttgcggccattgcggagtcacaagtgagctcctccttccatatac
ggctaaaattcccctccccttgttctccgcgacgcgagctgtggcagttcccccttgggattctgcatctggaggtggatcccaatctcgtcttcttgatgctg
aatcccggcggcagtcctccctggatattgttaa

>TDF_105

ctgcaggatcttctaccgctgctgtgatctgcttcccctgaaacaggactgcttcccgttttcagtttcgacagatatagcgctactgcttctgcttcccctat
gcctccacgatgaaaatgctatctataacgcacttttcaaatgcaggaatctgggcaactgacggagcaaccagttccagtcgacatggtattgctgaggaatggtg
catatctagtcaatatccatgacagtggttaa

>TDF_107

ctgcaggatgctgcaaaagtcataagccagaattgcgacgaaccctaactgttgaactcaacgtcatggttcttcaaacagtgaccgggtgatgtaaggtgga
atggatagcctgtgttcttccattctcatgggctggtgccggagatcgacgcgtgccggagcatagcccgtcgaaaagcagagactgttgcctaaaagtaaactg
gctctctgtgcagaagttatgtcttcttcttggctttgtatcagaataaaaaaggagtattagttgctggattgaaaaatgtctactatatacttttggcttttatcgta
a

>TDF_108

ctgcaggatgaactccaacacatgctccaacatggccgcttgcagcaggaggtgatgggggtggagagggtggtgccgtggacgaccttccacgcca
cctctgcctcgaccacctgccaaaccggccccgttcaacgcttcgctagaacatctggatcttcttaccgccgcgcttctggcgggaagaagatctggtc
gcctccgcggaacgaccacggccacgctcctcggcatggtgatgaatggaggacgaggaaaggcgatactgagaaggtgctccccttttatagccaaacca
aggagatggagggttggcttgcgctctgaaaaaccttcaaatcctgctcgttaa

>TDF_110

ctgcaggcagcaaggccagggtgacgcgacgaccttgcgcacgcacgtgcaaacgcgcctctggccgtgccagagcacgcatgccaggtgttc
gacgaaacgccagcgtgctagagagctagggtgatgccgtagttaa

>TDF_111

ctgcaggctcgacttttccgagtcgctaccccagattacaacaataattatgcaggaaccatcgtgttgcagaagaggctacggaggaggccgtgcagttgagatgc
cgacaaggagtagtgacgagtagcaactagcgggtgagcatgcaacaccaattggaaggtgcatgtgcaagacgcattcggcgaaacgatccatgtaa

>TDF_112

ctgcaggctcggcagcaagcacatgaagactcatgagcaagatgactataactggaggcaaaagggaataacttttctttgatgtgcaatcagataacaaccaat
gcaagctttgtagtgatgcttatttagcagggaccactcagaccatactcggggctctctgttcatgtactagaaaaggatcgtgcatgtaa

>TDF_113

ctgcagggttattcgtccttgaaggatcctcagcggacgtccggaaactggttctcggcctgggttcagctcgtgaagtgcggccatccatfttgagccaca
ttgaaaaatgftactgaattgatcctgcaagctaacaagattcggatgatgaagttgctctggaggcttgaattctgtcagcgtattgtgatgtagcatgccccctg
aaggactgcgggagtcttccacgcttaa

>TDF_114

ctgcagggcaccaaatgttagagctgatttaggatatctggggcataaccgtcgacggaagcaattcctgcttcaaacgatacgcacatcctctagcgaatag
ttctggcggcatgaagctggttggcgcggagtaa

>TDF_117

cacctactagtcaggcacctggtgcagctgcaggttatgggaaccaggcctatggttatggtgatagaggagatgcatcatatgtaatcatggagggtatggtg
cttatggtgctggggagatggtgctggaatcctgctactggtgcagcctctgggtatggtgctgctggatggaagtgggaatggaactctggatccaaatg
gtgggctgatcctcacaaggcggaggatttgggtgagtcgaatggagcttctgaggccaatcaattatggcagcgggtatggtggtatgcagcctagggttgc
cagtagaagggtctgttaattgtcatggtgtgaaccagtgcatttgggcagcatatgtattattcagttattctgctcgtcttcctgaaggccatcattctgc
cggtaa

>TDF_118

ctgcaggtaggcgccgtagtagcatgccgagcgggacctcgtcccttcttaagctcgaacatctcttctccacaggctccagatcagcgggggaacaagcgt
taa

>TDF_121

ctgcagggacttcaagccgatattgtccccgaggagatggaggatcagctggagcagttcacctcgggtgatgcaggagaagttcctgtcaggccaagactcgg
gcacatggactacctcagatcgacaacgacgagatgctggacgaccactggtccaggaggccaactacgacgcggaggacaagtactcaacgaagattagg
acggtccacaatgtagtcggctgtagtaa

>TDF_122

ctgcagggatctggccggagtcgaggagctcagcagcaggggctaggaccagtcccccggtggaagggggcgtgtcaaggagactccttaatcgctg
cttgggttattcaggtataatcagctcttggtagtaa

>TDF_123

ctgcaggctcgtagactgctacatgcagcaccagctgcgaagcccacactgctgagaaaccagcaccggcaactgctgatgtagccaagcagattccagctg
cattccaggtagccggcggaacaactactaccgtgcagatggccagaacacgggcaactccttacggaccgtcctcaaccaaggttcatgctgctcctggcgg
gctcctcctgggctacttgttggcggaaagtatgtaa

>TDF_124

ctgcaggctcatcacagaaagaacgagagttcgccgtgacaatcaatagtcagccgttgctgctggagaggtggtgaggcactgagggttgacgaggtggcg
ctatgcgggggtgccgctgccagagctcagccattcaggtttgctggcgttgacaggacggaccatgcgcaagcgtcgtgccgttggagcagctccatgagttg
gtgtcagttgagcgggcaactaggtcaagcatgttaa

>TDF_126

ctgcaggtccaccctcatacttctgctgcccgccaccgacgaccagaagaggactacgagctcaaggaggcgaccccgctacgcccaagtctacgac
tgccgcgccgaggagcccgccaccgaggtgcccggcgttccactctctacgacgaccccgagtgattagccaaccaactactagctgcttctg
ttcatctctctgaagcaaacgaggttctgttactttgtacaatcagcagagcaaacacctgttagtcatctgattgtgtgataaatcagggttcagaatataatccg
acctgtagtagtgcagataaaatcgcagaatgaattctggctgcgagcaataatcagataaggagcgttgcgttaa

>TDF_132

ctgcaggtcagaggtgccacataccgccagtggggtcgtatgcatgctgacacaccacctcccagaactggaaccaatctggttccacactgcccacct
ggatgtgcaggatctcccgatcttctgctggcggcgtgctgacgaagcgcagtgaggagtgaggagtggtggcggcaggagagagtggtccccgtctcg
gggtgctgaggactgtgcttgtgtagttgtctgtgctgggttaa

>TDF_134

ctgcaggtgttctgatgctacatatgctagttctttgtaaacctgaaactgacatcaaatcaattcctctttagagtgctgctgtatctactagctggttctgttctt
acttctgttgactctgggttaa

>TDF_135

agtcctatggcaaggtgaagccgtcgtaccgagatgctgtagtagctgggtgctgccgcccgatggtgtactcggccagcgttctggttccgccggag
agggagcagaacagctggccgccagtcgccggttcggcagctcccgtcccgccatcgaaggagcaccgggtgcgagcccatatctcccgttctgtgc
ccgctggctctgtgatgctggacgtctggcctgcgccagctcgaagccccaccaccgggatccccggccatattgtggaaccgagtagttctgatgttg
aaggtggccgcgccgaccggcagcaaaatcagcaggagggaggaagagctccgcgaaggtcgtcattgccggaagctctagttaa

>TDF_136

ctgcaggcggcggcgtcgcagagataccatgcgaccagtgccggccgggatgcgccaggcgtgcaatgcgaggcccctactctgcaacagcttctg
caacatcttcccacctgtgcaactactgttctctcaatccgcttgtcattcccagtgcgcaaacctctgcagctcgcagccgctggatgcgcttctgc
cgctcaccacctctctgatgtggccggtagtgctgaagctatagtcgacgaataatggtctatattggttctgtctgtaaaatgccagcagctgaaccagaaatgg
aagcgtcaagcagaatttgaacgccttctgcaattggtgttattgaaataagttccaatacattccatgtagggcgtgagggccacgtcttcttctgtttatct
actagtagtaccagttacgtagctatgtggtcgtttgttaggggatcgtgtggccgaataattagttagttaa

>TDF_137

ctgcaggcccaatccgggagcgttcaagggaagggcgggtggtgactgaggacgacctgcagctctgtcccctctgatgggacatgtacatagcgtgcttacta
ctacatcatacgtacttgaattttgctggagttaa

>TDF_138

ctgcagagcgttacgtatcggatccagaattcgtgattgactcgtcatgcaggccacaaattgttagagctgattcaggatctggggcataaccgtcgacg
gaagcaattcctgcttctgcaacgatacgcacatccttagcagtagcttctggcggcgtgaagctggttggcacggagttaa

>TDF_165

```
ctgcaggatgagatggcggatttgatggatgtgggtaatgagatccaggagagcttggcggaggattatgatattcctgatgatgttgaggaggacgagttggatgct
gagcttgaggctttggggatggaggttgagatggagcatgagatggcgggtgccgtgccgggtttctgcaagacgaagctgtccagatttcgtgatgagccgcc
ccagactgaggacaaggtgaagcaggttctgtgtaa
```

>TDF_166

```
Ctgcaggaccatcttgttaccggcgtaggggtgtaatgcgcgccgcagtggtgagactaagaccgcaggggaaaccatactagccttgagactgtcacctcct
cgagtccagagtgtccagtgagagcacgaacaccatcctcaataaccctggcgatcaggtcaaggctgtccgggcttgacgttctctgagtcacatggcgaccc
gcgatgaatctcggcagcctcgcgtaatcggaaggaagtcagcttaa
```

8.5. Alignment der WIR1 Sequenzen

```
Ta.97.2.S1_x_at      CCTTGGAGCCACGGCCGTCACGACGCCGCCGCTCAGGCACCGGTGCTCTCGACCCTAA 357
Ta.97.1.S1_at       TCTTGGAGCC---GCCGTCCACGACGCCGCCACCTCAGGCACCGGTGCTCTCGACCCTAA 265
Ta.22732.1.S1_at   CGTCGGAGCC---GCCGCCACGACGCCGCTCTAGTAGGCACTG-----ACCCTAA 256
TDF_022_Hussar     -----CTGCAGGCTCTGGTGCTTTTCGACCCTAA 28
TDF_022_G16-92    -----
Ta.13.1.S1_at      CGTCTGCCTTGGAGCCGCCGCCGGCGACGCCACTGCAGGCTCTGGTGCTTTTCGACCCTAA 246
```

```
Ta.97.2.S1_x_at      CGTCCCTGCTGTTCGACGCCGGGCGGTGCCGGTCAACCCTACACCGGC---CGTGGGTG 414
Ta.97.1.S1_at       CGTCCCTGCTGTTCGACGCCGGGCGGTGCCGGTCAACCCTACACCGGC---CGTGGGTG 322
Ta.22732.1.S1_at   CCACCCTGCTTTCCCGTCGCCGC-----CTGGTAAACCCTACACCGGCCGGCCGTGGGTG 310
TDF_022_Hussar     CCGCCCTGCTGTCCCGTCGACGGGTGGTGTGGTAAACCCTACACCGGC---CGTCGGTG 85
TDF_022_G16-92    -----GC---CGTCGGTG 10
Ta.13.1.S1_at      CCGCCCTGCTGTCCCGTCGACGGGTGGTGTGGTAAACCCTACACCGGC---CGTCGGTG 303
                    **   ***  ****
```

```
Ta.97.2.S1_x_at      CCGCACAGTTTACGGATGT-----AGACCACCGGCGGGTGGCCANNCCCTAAT----- 462
Ta.97.1.S1_at       CCGCACAGTTTATGGATGT-----AAACCACCGGCGGGTAGCCAGCCC-TAAT----- 369
Ta.22732.1.S1_at   CCGTACAATTTACGGATGTCTCTGATGTACCACCGGCGGGTGGCCAGCCC-TAAT----- 363
TDF_022_Hussar     CCTCCGTAAGTACCGCTGC-----TACCCACCGGCTGGTGGCCAACCCTAAGTAAGA-- 137
TDF_022_G16-92    CCTCCCTAAGTACCGCTGC-----TACCCACCGGCTGGTGGCCAACCCTAAGTAAGAAG 64
Ta.13.1.S1_at      CCTCCCTAAGTACCGCTGC-----TACCCACCGGCTGGTGGCCAACCCTAAGTAAGAAG 357
**           **  *  **           *****  ***  ****  **  *  *
```

```

Ta.97.2.S1_x_at      CGTCCCTGCTGTTCCGACGCCGGGCGGTGCCGGTCAACCCTACACCGGC---CGTGGGTG 414
Ta.97.1.S1_at       CGTCCCTGCTGTTCCGACGCCGGGCGGTGCCGGTCAACCCTACACCGGC---CGTGGGTG 322
Ta.22732.1.S1_at    CCACCTGCTTTCCCGTCGCCGC-----CTGGTAAACCCTACACCGCGCGCGTGGGTG 310
TDF_022_Hussar      CCGCCCTGCTGTCCCGTCGACGGGTGGTGTGGTAAACCCTACACCGGC---CGTGGGTG 85
TDF_022_G16-92      -----GC---CGTGGGTG 10
Ta.13.1.S1_at       CCGCCCTGCTGTCCCGTCGACGGGTGGTGTGGTAAACCCTACACCGGC---CGTGGGTG 303
                    **   ***   ****

Ta.97.2.S1_x_at     CCGCACAGTTTACGGATGT-----AGACCACCGCGGGTGGCCANNCCCTAAT----- 462
Ta.97.1.S1_at       CCGCACAGTTTATGGATGT-----AAACCACCGCGGGTAGCCAGCCC-TAAT----- 369
Ta.22732.1.S1_at    CCGTACAATTTACGGATGTCTCTGATGTACCACCGCGGGTGGCCAGCCC-TAAT----- 363
TDF_022_Hussar      CCTCCGTAAGTACCGCTGC-----TACCACCGGCTGGTGGCCAACCCTAAGTAAGA-- 137
TDF_022_G16-92      CCTCCCTAAGTACCGCTGC-----TACCACCGGCTGGTGGCCAACCCTAAGTAAGAAG 64
Ta.13.1.S1_at       CCTCCCTAAGTACCGCTGC-----TACCACCGGCTGGTGGCCAACCCTAAGTAAGAAG 357
                    **   **   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Ta.97.2.S1_x_at     -----TACATCCGCGTGCANGCATGCCCATCTCCCANGACACAATGCATGCGAGGAINC 517
Ta.97.1.S1_at       -----TACATCCGCGCGCAGAC----CCCATCTCCCAG-ACACAATGCTTGCAGGATCC 419
Ta.22732.1.S1_at    -----TACACCGCGCACAGAC----CAATCTGTCAAACA-----ATGCAAGGATCG 407
TDF_022_Hussar      -----TGCACCCGCGCCGCGCAGACCCCGTCCCCAAAAAT-----AATGCAAGGATCG 187
TDF_022_G16-92      TAAGATGCACCCGCGCCGCGCAGACCCCGTCCCCAAAAAT-----AATGCAAGGATCG 119
Ta.13.1.S1_at       TAAGATGCACCCGCGCCGCGCAGANCCCGTCCCCAAAAAT-----AATGCAAGGATCG 412
                    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Ta.97.2.S1_x_at     ATCGATATAT--GTAATTGGTTAGCA---CAAGTTAATCTACTGT-CACGCACCANCCTT 571
Ta.97.1.S1_at       ATCGATATAT--GTAATTGGTTAGCA---CAAGTTAATCTACTGT-CACGCACCACC-TT 472
Ta.22732.1.S1_at    ATCGACATAT--GTAGCTGAACGGCGCAGCTAGATGCATGTACTATATATGCATGCCTC 465
TDF_022_Hussar      ATCGATATATATGTAACGAACACCGCCTAGATGCATATACTATATATGCATGC----- 240
TDF_022_G16-92      ATCGATATATATGTA-----TATACTATATGCATGC----- 150
Ta.13.1.S1_at       ATCGATATATATGTA-----TATACTATATGCATGC----- 443
                    *****   ***   *   *   *   *   *

Ta.97.2.S1_x_at     ATGTAICTGGT-AATANCGTCTCGTGTACTGTACTGTACTACCTAC---TTAAACTCNAATA 626
Ta.97.1.S1_at       ATGTACACGGT-AATACCGTCTCGTGTACTGTACTGTACTACCTAC---TTAAACNNNNNNNN 527
Ta.22732.1.S1_at    TTATACACGANCAATACCGTCTCGTGTACTGTACTACNGTACCTANGTACTTAGACTCGAATAA 525
TDF_022_Hussar      --ATGCACGCA-----TGCCTC-CGACGTGTCTATGCGAG---TTA---TTCTATTG 283
TDF_022_G16-92      --ATGCACGCA-----TGCCTC-CGACGTGTCTATGCGAG---TTA---TTCTATTG 193
Ta.13.1.S1_at       --ATGCACGCA-----TGCCTC-CGACGTGTCTATGCGANG---TTA---TTCTATTG 487
                    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Ta.97.2.S1_x_at     AATTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 686
Ta.97.1.S1_at       NNNTGGATTGTGTCATGTCTG----- 548
Ta.22732.1.S1_at    AACTGGATTATNGCGTCTGGATTTNNNTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 585
TDF_022_Hussar      CCATGCATCACCTTATACTCCTACACAG-TAATAATTGTTTCCCTCTACTATTACTACTCTG 342
TDF_022_G16-92      CCATGCATCACCTTATACTCMWAAAC----- 219
Ta.13.1.S1_at       CCATGCATCANCTTATACTCCTACACANGTAATATTGTTTCCCTGTACNATTTACTACTCTG 547
                    *

Ta.97.2.S1_x_at     NNNNNNNCNNNNNNNNNGANNNCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCN 746
Ta.97.1.S1_at       ----- 746
Ta.22732.1.S1_at    NNNNNNANTNNNGNCCGGAACCTGCGAGGCATGTATCGCTGGATAGTGAGTAAATTAAT 645
TDF_022_Hussar      AATAAACTGGATATATATGTTAA----- 366
TDF_022_G16-92      ----- 366
Ta.13.1.S1_at       AATAAACTGGNTATATATTGCTGCANAAAAAANNNNNNGGNNNGNCCGNACCAAT 607

Ta.97.2.S1_x_at     NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTAANNNNNNNTNN----- 791
Ta.97.1.S1_at       ----- 791
Ta.22732.1.S1_at    TGCGGTAAGCCAGGTACTATACTGAAGAGTACCTGAAAGCTCCAAGGGGGACTAAAAAA 705
TDF_022_Hussar      ----- 705
TDF_022_G16-92      ----- 705
Ta.13.1.S1_at       NCCTAAAAGGAGTCCN----- 623

Ta.97.2.S1_x_at     ----- 726
Ta.97.1.S1_at       ----- 726
Ta.22732.1.S1_at    AAAAAAACTCGAACCTCGG 726
TDF_022_Hussar      ----- 726
TDF_022_G16-92      ----- 726
Ta.13.1.S1_at       ----- 726

```

Danksagung

Vielen Dank an Prof. Dr. Wenzel für die Überlassung des Themas an der technischen Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Günther Schweizer für die Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Sehr herzlich danke ich Dr. Sabine Mikolajewski für ihre große Unterstützung bei der Einarbeitung in die Methoden der Expressionsanalyse sowie für die Einweisung und die tatkräftige Hilfe bei den Infektionsversuchen im Gewächshaus.

Für die ausgezeichnete technische Assistenz bei den molekularen Arbeiten danke ich Susanne Wüllner sehr herzlich. Weiterhin danke ich Susanne Wüllner, Alexandra Jestadt, Alfred Barth, Sabine Schmitt und Marianne Linseisen für ihre Hilfe bei den Arbeiten im Gewächshaus.

Dr. Lorenz Hartl, Dr. Joseph Holzapfel und Dr. Jennifer Groth danke ich sehr für die Überlassung der Markerdaten und der phänotypischen Daten der Kartierungspopulationen sowie für die interessanten Gespräche und Anregungen. Ein besonders großer Dank gebührt Dr. Jennifer Groth, die mich auch bei allen Fragen der Kartierung und QTL-Analysen sehr unterstützt hat.

Dr. Michael Schmolke danke ich sehr für das kritische Lesen dieser Arbeit und seine wertvollen Anregungen sowie dafür, dass er mir die phänotypischen Daten des Test-Sortenspektrums zur Verfügung gestellt hat.

Unseren Kooperationspartnern an der Universität Gießen, Prof. Dr. Wolfgang Friedt, Markus Rhiel, Dr. Carola Wagner und Dr. Sven Gottwald danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Marc Lemmens und Dr. Barbara Steiner vom IFA in Tulln danke ich für die Bereitstellung des *Fusarium*-Inokulums sowie für die Einweisung in die Einzelblüten-Inokulationsmethode herzlich.

Dank gilt auch Dr. Luitgardis Seigner und Dr. Astrid Bauer für die Bereitstellung des Thermocyclers für die qPCR und die ersten Einweisungen in diese Technik.

Für die wertvollen Gespräche und ihre große Hilfsbereitschaft danke ich meinen Bürokolleginnen Dr. Kerstin Krumnacker, Rebecca Seidenberger und Katja Droffenigg.

Weiterhin danke ich allen Kollegen in der Arbeitsgruppe Genomanalyse für die freundliche Aufnahme und die gute Arbeitsatmosphäre.

Besonders danke ich meinem Ehemann Aaron für seine große Unterstützung und Geduld während der Zeit, die ich für die Fertigstellung der Arbeit benötigt habe. Ich danke ihm und meinem Stiefvater Reiner von Geldern für die Durchsicht dieser Arbeit.

Diese Arbeit wurde von der DFG im Rahmen des Projekts „*Fusarium*-Resistenz von Winterweizen (*Triticum aestivum*): Entwicklung und Kartierung funktioneller genetischer Marker mit Hilfe eines integrativen Ansatzes von Expressions- und Kandidatengenanalyse auf der Basis einer validierten QTL-Karte“ finanziert.