

## Expressionsanalyse der Abwehrreaktion von Winterweizen gegenüber *Fusarium graminearum*

Manuela Diethelm<sup>1\*</sup>, Sabine Mikolajewski<sup>1</sup>, Carola Wagner<sup>2</sup>, Markus Rhiel<sup>2</sup>, Lorenz Hartl<sup>1</sup>, Wolfgang Friedt<sup>2</sup> und Günther Schweizer<sup>1</sup>

### Abstract

*Fusarium* head blight (FHB) in wheat, mainly caused by *Fusarium graminearum* is responsible for severe yield and quality losses. QTLs for FHB resistance have been identified in winter wheat populations but the underlying resistance genes are still largely unknown. The aim of this project funded by the DFG is to identify genes which are involved in the defence reaction of the chosen genotypes.

The parents of three winter wheat mapping populations were inoculated with *Fusarium graminearum*. The flower tissue was sampled during four days after inoculation and cDNA-AFLP analysis was conducted. About 100 differentially expressed TDFs (transcript derived fragments) were cloned and sequenced. TDFs which show polymorphisms were integrated into existing QTL-maps. Real-time PCR for the most interesting TDFs, like those of PR-Genes, Genes involved in stress signalling or which map in QTL-Regions for *Fusarium* head blight resistance was performed to validate the cDNA-AFLP results. A „WIR1“-Gen and a lipid transfer protein for example show highly elevated *Fusarium*-induced expression levels in resistant compared to susceptible genotypes. A differentially expressed putative Cytochrome P450 Monooxygenase maps into the interval of a QTL for FHB resistance.

### Keywords:

*Fusarium* Head Blight, Winter Wheat, Expression Analysis, cDNA-AFLP, Candidate Genes

### Einleitung

*Fusarium*-Taubährigkeit im Weizen wird vornehmlich von den Erregern *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* ausgelöst und führt zu starken Ertrags und Qualitätseinbußen, insbesondere durch eine hohe Mycotoxinbelastung des Erntegutes. Die Resistenz gegen *Fusarium* ist im Winterweizen quantitativ ausgeprägt. Es ist weder eine vollständige Resistenz gegenüber dem Eindringen des Pilzes in die Pflanze (Typ1-Resistenz) noch gegenüber dem Ausbreiten in der Ähre (Typ2-Resistenz) bekannt. Umfassende QTL-Kartierungen für *Fusarium*-Resistenz konnten bereits in mehreren Kartierungspopulationen durchgeführt werden, die hierfür verantwortlichen Gene sind jedoch weitestgehend unbekannt.

Ziel des vorliegenden DFG-Projektes ist die Aufklärung der für die Resistenzreaktion des Winterweizens verantwortlichen Gene mit Hilfe der Expressionsanalyse, sowie deren Rückkartierung in bestehende Chromosomenkarten auf der Basis von Sequenzpolymorphismen.

### Material und Methoden

Die Eltern der spaltenden Kartierungspopulationen Dream (res.) x Lynx (anf.), G16-92 (res.) x Hussar (anf.) und SVP2017 (res.) x Capo (anf.) wurden für die vorliegende Expressionsanalyse ausgewählt. In den ersten beiden Populationen waren QTLs für *Fusarium*-Resistenz auf den Chromosomen 1A und 2BL (G16-92 x Hussar) sowie 1B, 2BL, 6AL und 7BS (Dream x Lynx) kartiert worden (SCHMOLKE et al. 2004, 2005, 2008; HÄBERLE et al. 2007). Die Eltern der Population SVP2017 (res.) x Capo (anf.) wurde wegen der für Winterweizen guten Ausbreitungsresistenz von SVP2017 ausgewählt, jedoch liegt zu SVP x Capo noch keine Chromosomenkarte bzw. QTL-Kartierung vor.

Die induzierte Abwehrreaktion des Weizens wurde durch eine Inokulation während der Anthese durch das Eintropfen von 10 µl einer *Fusarium graminearum* Makrokonidien-Suspension (Stamm: IFA65, 500 Konidien/Blüte) in die Blüte provoziert. Lemma, Palea und Rachis inokulierter Blüten wurden anschließend während eines Zeitraums von vier Tagen beprobt. Aus dem Blütengewebe wurde RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die Proben den Zeitpunkten entsprechend einer cDNA-AFLP-Analyse unterzogen (Enzymsysteme: Pst/Mse, Sse/Mse; jeweils 30 Primerkombinationen). Verglichen wurde jeweils die mit *Fusarium*-inokulierten Probe im resistenten und im anfälligen Elter mit der Wasser behandelte Kontrollvariante.

AFLP-Banden, die dabei unterschiedliche Expressionsmuster zeigten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Diese cDNA-Fragmente, auch als TDF bezeichnet (transcript derived fragment), sind Kandidaten für mögliche Resistenzgene. Sie wurden auf genomischer Ebene in den Ausgangseltern resequenziert um Sequenzunterschiede für eine Markerentwicklung festzustellen. Polymorphe Genfragmente wurden in bestehende QTL-Karten rückkartiert. Die differentielle Expression ausgewählter TDFs wurde durch quantitative Real-time PCR über den Verlauf der 4 Beprobungstage hinweg bestätigt (siehe *Abbildung 2* und *3*). Zur Berechnung der relativen

<sup>1</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 2 und 6, D-85354 FREISING

<sup>2</sup> Justus-Liebig-Universität Giessen, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 GIESSEN

\* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Manuela DIETHELM, manuela.diethelm@lfl.bayern.de

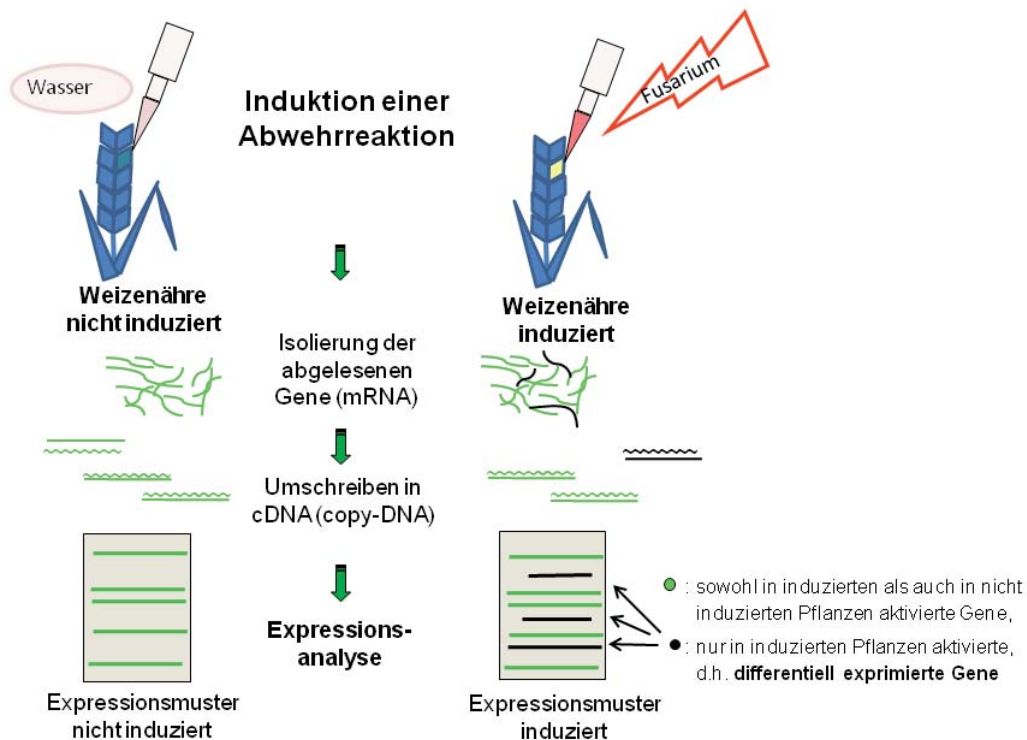


Abbildung 1: Übersicht über den Ansatz der Expressionsanalyse

Expression wurde die vergleichende delta delta Ct Methode angewendet. Als interner Standard diente ein konstitutiv exprimiertes Ubiquitin-Gen.

## Ergebnisse und Diskussion

Die differentielle Genexpression im Vergleich von *Fusarium*-induziert mit Wasserkontrolle unter Anwendung der cDNA-AFLP Technik führte zu ca. 100 differentiell exprimierten Genfragmenten. BLAST-Analysen in NCBI- und Tigr-Datenbanken ermöglichten einen Rückschluss auf die mögliche Funktion der gefundenen Gene über Sequenzvergleiche mit dort hinterlegten cDNA-Sequenzen. Hierbei konnte die Hälfte der differentiell exprimierten TDFs bekannten Genen mit bekannter Funktion zugeordnet werden, ein Drittel hat unbekannt Funktion. Der Rest zeigte Übereinstimmungen mit Sequenzen vom Pathogen *Fusarium graminearum*.

Ein differentiell exprimiertes TDF mit großer Ähnlichkeit zu einem bereits bekannten „WIR1“-Gen des Weizens (wheat induced resistance gene 1) konnte auf Chromosom 5D der G16-92 x Hussar Population rückkartiert werden. „WIR1“-Proteine sind kleine membrandurchspannende Proteine anhand deren Struktur angenommen wird, dass sie zur Verstärkung der Adhäsion der Zellmembran an die Zellwand und damit zur höheren Stabilität der Zellmembran bei Pathogenangriff beitragen (BULL et al. 1992). „WIR1“-Gene wurden auch in anderen Interaktionen von Weizen mit *Fusarium* als hochreguliert identifiziert. Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigen (Abbildung 2), dass dieses „WIR1“-Gen nach *Fusarium graminearum* Infektion zwar im anfälligen Elter Hussar, wie auch im resistenten Elter G16-92, hochreguliert wird, jedoch in letzterem wesentlich

höher. Insbesondere zu den späteren Zeitpunkten 72 und 96 Stunden nach Inokulation ist das Gen in G16-92 ca. 30 und 50 mal höher exprimiert als in nicht-infizierten Kontrollen. Diese Zeitpunkte sind besonders bedeutsam für die Resistenzreaktion der Pflanze, da hier der Pilz versucht in die Ährenspindel einzudringen, um sich dann in der Ähre auszubreiten. Da dieses „WIR1“-Gen in kein bislang bekanntes QTL-Intervall für *Fusarium*-Resistenz kartiert, aber trotzdem extreme Expressionsunterschiede zwischen anfälligen und resistenten Genotypen zeigt, wird angenommen, dass es am Ende einer Abwehrkaskade steht, die in anfälligen Weizenpflanzen weit weniger stark ausgelöst wird oder vom Pilz gar unterbunden wird.

Ein weiteres interessantes TDF mit starken Expressionsunterschieden nach *Fusarium*-Inokulation zeigt große Ähnlichkeit zu einem „Lipid Transfer Protein“. Für Proteine

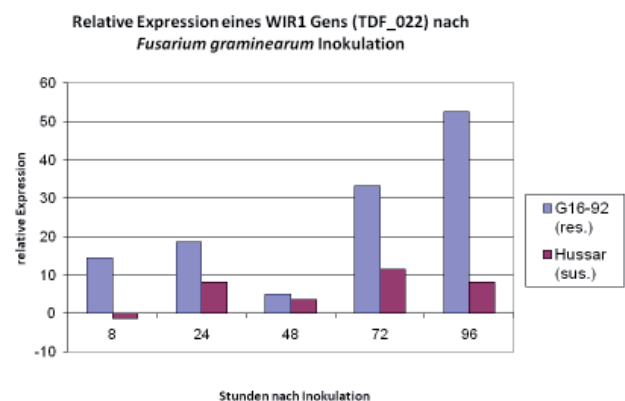


Abbildung 2: Differentielle Expression eines „WIR1“-Gens quantifiziert durch Real-time PCR nach *Fusarium*-Inokulation

aus der Familie der Lipid Transfer- Proteine wurde häufig eine Wirkung in der Abwehr gegenüber Pathogenen gezeigt. Einzelnen Proteinen wurde eine direkte Wirkung gegen Pilze, eine Rolle in der Verstärkung von mechanischen Barrieren oder eine Aufgabe in der Signaltransduktion während der Pathogenabwehr nachgewiesen. Real-time PCR zeigte, dass dieses TDF sowohl in nicht infizierten Kontrollproben, wie auch zu fast allen Zeitpunkten nach *Fusarium*-Inokulation nur im resistenten Elter G16-92 exprimiert wird. Nur 72 Stunden nach Inokulation war das Gen auch im anfälligen Hussar aktiv. In G16-92 wird dieses Gen besonders nach 72 und 96 Stunden stark hochreguliert. Über eine Kartierung mit Hilfe von Nullitetrasonen Linien von Chinese Spring konnte es physikalisch dem Chromosom 4A zugeordnet werden. Interessanterweise befinden sich auf diesem Chromosom auch ein QTL für *Fusarium*-Resistenz aus Winterweizen (z.B. von Arina).

Bemerkenswert ist ein weiteres TDF mit Ähnlichkeit zu einer „Cytochrom P450 Monooxygenase“. Es kartierte in ein 95% QTL-Vertrauensintervall für *Fusarium*-Resistenz auf Chromosom 2B der History x Rubens Population (Karte von HOLZAPFEL et al. 2008). Cytochrom P450-Monooxygenasen übernehmen weitgefächerte Aufgaben in der Zelle, unter anderem die Synthese von pflanzeigenen Abwehrstoffen und Entgiftung von toxischen Substanzen. In Ergebnissen der Real-time PCR viel auf, dass dieses TDF im resistenten Genotyp SVP nur nach acht Stunden stark exprimiert wird und zu den späteren Zeitpunkten nach unten reguliert wird. Im anfälligeren Capo hingegen wird das Gen zu allen Zeitpunkten leicht hochreguliert und erreicht das Maximum erst 72 Stunden nach Inokulation, also wesentlich später als in SVP.

Im Folgenden konnten zwei differentiell exprimierte Genfragmente mit unbekannter Funktion aus dem resistenten Genotyp SVP gefunden werden, sie kartierten in Genombereiche, in denen bereits bekannte QTL in der Literatur beschrieben wurden. Ein TDF, das in der cDNA-AFLP Analyse in sehr frühen Probenahmezeitpunkten erscheint, konnte auf Chromosom 5A in die Nähe des Microsatelliten xgwm 639 kartiert werden, wo sich in der Population Renan

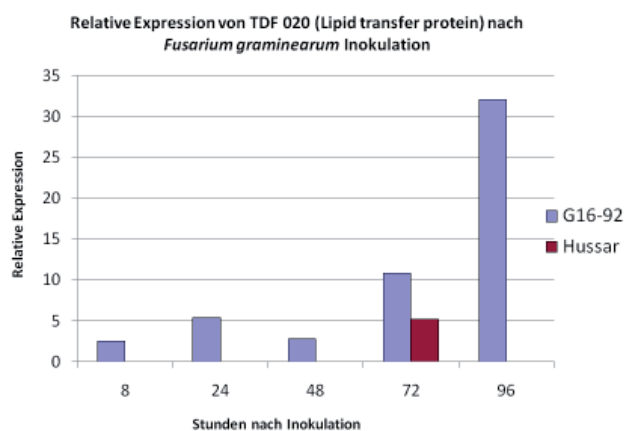


Abbildung 3: Differentielle Expression eines „Lipid transfer Proteins“ quantifiziert durch Real-time PCR nach *Fusarium*-Inokulation

x Recital (GERVAIS et al. 2003) ein QTL für *Fusarium*-Resistenz sowie für Wuchshöhe befindet. Ein weiteres TDF, das 72 und 96 Stunden nach Inokulation exprimiert wird, liegt in der unmittelbaren Nähe zum Microsatelliten xgwm 368 auf Chromosom 4B, auch hier wurde bereits ein QTL für *Fusarium*-Resistenz in Wangshuibai (JIA et al. 2005) beschrieben. Weitere Analysen stehen im laufenden DFG-Projekt noch an.

## Zusammenfassung

Zwischen anfälligen und resistenten Eltern von für *Fusarium*-Resistenz spaltenden Kartierungspopulationen konnten, trotz der quantitativen Ausprägung der Resistenz starke Unterschiede in der Genexpression bei den vorgestellten Kandidatengen gefunden werden. Die bislang analysierten TDFs stammen wie „WIR1“ und das „Lipid Transfer Protein“ aus Genfamilien, die deutlich in der Abwehr- und Stressantwort von Pflanzen involviert sind.

Auch konnten bereits einige der differentiell exprimierte Genfragmente in Genombereiche kartiert werden, in denen QTL für *Fusarium*-Resistenz nachgewiesen werden konnten. Weitere TDFs stehen noch zur eingehenden Analyse und Markerentwicklung an.

Die differentielle Genexpression in Kombination mit der cDNA-AFLP Analyse ist damit eine Methode, die es erlaubt potentielle Kandidatengene für die Resistenzzüchtung auffindig zu machen. Neuere Hochdurchsatz-Techniken können diesen Weg noch deutlich beschleunigen. Eine Verifikation mit Felddaten ist jedoch immer eine essentielle Vorgabe.

## Literatur

- BULL, J., F. MAUCH, C. HERTIG, G. REBMANN and R. DUDLER, 1992: Sequence and expression of a wheat gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 5: 516-519.
- GERVAIS, L., F. DEDRYER, J.-Y. MORLAIS, V. BODUSSEAU, S. NEGRE, M. BILOUS, C. GROOS and M. TROTET, 2002: Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in an european winter wheat. *Theor Appl Genet*. 106: 961-970.
- HÄBERLE, J., M. SCHMOLKE, G. SCHWEIZER, V. KORZUM, E. EBMEYER, G. ZIMMERMANN and L. HARTL, 2007: Effects of Two Major *Fusarium* Head Blight Resistance QTL Verified in a Winter Wheat Backcross Population, *Crop Science* 47: 1823-1831.
- HOLZAPFEL, S., H.-H. VOSS, T. MIEDANER, V. KORZUM, J. HÄBERLE, G. SCHWEIZER, V. MOHLER, G. ZIMMERMANN and L. HARTL, 2008: Inheritance of resistance to *Fusarium* head blight in three european winter wheat populations. *Theor Appl Genet*. 117, 1119-1128.
- JIA, G., P. CHEN, G. QIN, G. BAI, X. WANG, S. WAN, B. ZHOU, S. ZHANG and D. LIU, 2005: QTLs for *Fusarium* head blight response in a wheat DH population of Wangshuibai/Alondra's. *Euphytica* 146:183-191.
- SCHMOLKE, M., 2004: Molekulargenetische Charakterisierung und Lokalisierung von Resistenzgenloci gegen Ährenfusariosen in Winterweizen. Dissertation TU-München.

SCHMOLKE, M., G. ZIMMERMANN, H. BUERSTMAYR, G. SCHWEIZER, T. MIEDANER, V. KORZUN, E. EBMEYER and L. HARTL, 2005: Molecular mapping of *Fusarium* head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx. Theor Appl Genet, Vol.111: 747-756.

SCHMOLKE, M., G. ZIMMERMANN, G. SCHWEIZER, T. MIEDANER, V. KORZUN, E. EBMEYER and L. HARTL, 2008: Molecular mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in a european winter wheat population. Plant Breeding, 127, 459-464.