

# Transkriptom-Analyse der Gersten-*Rhynchosporium secalis* Interaktion

C. WAGNER

Die *Rhynchosporium*-Blattfleckenkrankheit der Gerste (*Hordeum vulgare* L.), verursacht durch das pertotrophe Pilzpathogen *Rhynchosporium secalis*, ist eine weltweit verbreitete Blattkrankheit insbesondere in humiden kühleren Klimaten Europas, Nordamerikas und Australiens. Das Pathogen ist charakterisiert durch eine Vielzahl an Isolatentypen mit unterschiedlicher Virulenz, wobei die Virulenzfaktoren, sogenannte „necrosis inducing proteins“ (NIPs, non-host-selective cell toxins) (WEVELSIEP et al. 1993, PRELL 2000), dominant vererbt werden. In der inkompatiblen Gersten-*R. secalis* Interaktion fungieren diese NIPs als rassen-spezifische Elicitoren, die über eine Signaltransduktionskaskade eine sekundäre Abwehrreaktion des Wirtes hervorrufen. Bei der Gerste wurden bisher 15 rassen-spezifische Resistenzgene (BJØRNSTAD et al. 2002, SCHWEIZER et al. 2004) und eine Vielzahl an QTL (BACKES et al. 1995, THOMAS et al. 1995, SPANER et al. 1998, GRØNNERØD et al. 2002, JENSEN et al. 2002, SAYED et al. 2004) beschrieben, aber weiterhin ist wenig bekannt über die involvierten Resistenzmechanismen und physiologischen Prozesse der Pathogenabwehr.

Ziel der laufenden Projektarbeiten ist die vergleichende Transkriptom-Analyse, um detailliertere Kenntnisse der zugrunde liegenden Resistenzmechanismen zu erhalten, sowie die Identifizierung resistenzrelevanter Kandidatengene der Gersten-*R. secalis* Interaktion. Über eine vergleichende Kartierung der vielversprechendsten Kandidatengene in eine genetische Karte der DH-Population der Kreuzung Igr1 (*rrs1*) x Triton (*Rrs1*) (135 Linien) mit zuvor identifizierten QTL der quantitativen *R. secalis* Resistenz, sollen funktionelle Selektionsmarker für eine verbesserte markergestützte Selektion

hinsichtlich *R. secalis* Resistenz der Gerste entwickelt werden.

## QTL-Analyse

Ausgangsmaterial für die QTL-Analyse der quantitativen *R. secalis* Resistenz ist eine spaltende DH-Population (135 Linien) der Kreuzung Igr1 (*rrs1*) x Triton (*Rrs1*). Die Phänotypisierung der Befallsstärke erfolgte im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen (16°C) in vier unabhängigen Experimenten an jeweils 4-5 Einzelpflanzen pro Genotyp. Die *R. secalis* Infektion erfolgte durch Sprühhinokulation (250.000 Sporen/ml) der Gerstenjungpflanzen im 3-Blatt-Stadium unter Verwendung eines aggressiven, gegenüber *Rrs1* virulenten Isolates 271. Die Phänotypisierung der Befallsstärke erfolgte 10-14 Tage nach der Inokulation nach dem Boniturschema (0 bis 4) von JACKSON & WEBSTER (1976). Grundlage für die QTL-Kartierung ist eine genetische Karte aus 223 SSR-, AFLP, RAPD- und STS-Markern berechnet mittels JoinMap 3.0 basierend auf der Kartierungsfunktion von Kosambi (1944) mit einem LOD >5.0 und einem Markerabstand von maximal 40 cM. Die QTL-Analyse wurde mittels Plab-QTL (UTZ & MELCHINGER 1996) unter Verwendung der „composite interval mapping“ (CIM) Funktion durchgeführt.

Zwei signifikante QTL der quantitativen *R. secalis* von Triton wurden auf den Chromosomen 2HS und 7HS kartiert mit einer erklärten phänotypischen Varianz von zusammen über 75%. Beide QTL liegen in Genomregionen von bereits zuvor beschriebenen Resistenzgenen (*Rrs*<sub>C18288</sub> auf Chromosom 2HS, sowie *Rrs2* auf Chromosom 7HS, SCHWEIZER et al. 2004 bzw. unveröff.).

## Transkriptom-Analyse

Das zugrunde liegende Material für die vergleichende Transkriptom-Analyse

über die Hybridisierung von Affymetrix GeneChip® Barley1 Genome Arrays ist RNA, extrahiert aus Blattmaterial der Sorten Igr1 und Triton 96 Stunden nach der künstlichen Inokulation (96hai) mittels des Einzelsporisolat 271 (s.o.) bzw. mittels Wasser (Kontrollvariante). Nach der Chip-Normalisierung erfolgte die Identifizierung differentiell exprimierter Gene über einen paarweisen Vergleich der Genexpressionen mittels verschiedener statistischer Verfahren unter Einhaltung eines Signifikanzniveaus von  $p > 0.05$ , einer mindestens 2-fachen Regulierung sowie einer Differenz der absoluten Expression von mindestens 20. Insgesamt konnten 30 differentiell exprimierte „Anfälligkeit-assoziierte“ Gene aus dem paarweisen Vergleich von Igr1 infizierter Variante zur Kontrollvariante, 73 „Resistenz-assoziierte“ aus dem Vergleich Triton infizierte Variante zur Kontrollvariante sowie 48 Gene, differentiell exprimiert zwischen Igr1 und Triton nach Inokulation abzüglich der differentiellen des paarweisen Vergleiches der Kontrollvarianten, identifiziert werden. Generelle Unterschiede der differentiellen Genexpression hinsichtlich der beteiligten Zellkomponenten, involvierter biologischer Prozesse und molekularer Funktionen erfolgte über die Klassifizierung in GO Slim („Gene Ontology“) Kategorien mittels der TAIR Internetplattform ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) ausgehend von annotierten *Arabidopsis thaliana* Loci über die HarvEST Barley Datenbank (<http://harvest.ucr.edu/Barley1.htm>). Während sich im Bereich der involvierten biologischen Prozesse keine wesentlichen Unterschiede zeigen, sind die molekularen Funktionen der „anfälligkeits-assoziierten“ Gene vermehrt Transporter-, Kinase-, Hydrolase-, Nukleotid-Bindungs- sowie Transkriptionsfaktoren-Aktivität während die „resistenz-assoziierten“ Gene verstärkt

**Autoren:** Dr. Carola WAGNER, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, IFZ, Justus-Liebig-Universität Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 GIESSEN



Transferase- und weitere Enzymaktivitäten, neben einer erhöhten Protein- und Rezeptorbindungsaktivität aufweisen.

Unter Berücksichtigung der Genexpression aller vier untersuchten Varianten (Igri und Triton jeweils als Infektions- bzw. Kontrollvariante) wurden solche Gene als relevant eingestuft, die in der Infektionsvariante spezifisch, d.h. auf ein abweichendes Expressionsniveau im Vergleich zu den anderen Varianten, reguliert werden. Auf diese Weise wurden 42 Resistenz- bzw. anfälligkeits-relevante Gene für die weitere Validierung mittels qRT-PCR und einer anschließenden Kartierung selektiert.

Um einen ersten Hinweis zu bekommen, auf welchem Chromosom die selektierten Kandidatengene lokalisiert sein könnten, wurde deren Expression in einem Affymetrix Microarray-Experiment basierend auf Weizen-Gersten Additionslinien untersucht (CHO et al. 2006, www.barleybase.org). Hierbei zeigte sich, dass bei der Hälfte der Gene bestimmte Additionslinien und somit Chromosomen der Gerste zu einer erhöhten Expression der selektierten Gene führen und somit notwendig für deren Expression zu sein scheinen.

Parallel hierzu wurden für die 42 ausgewählten Kandidatengene eine eQTL (expression quantitative trait loci) Analyse durchgeführt. Hierfür standen Expressionsdaten embryonalen Gewebes eines Affymetrix Microarray Experimentes basierend auf 150 DH-Linien der Kreuzung Steptoe x Morex zur Verfügung. Auffällig hierbei war, dass das Expressionsmuster von 15 dieser 42 ausgewählten Kandidatengene korreliert, d.h. das diese Gene, darunter PR(pathogen-related gene) 1, PR4, PR5, PR9, PR10, OxOLP, LRR, Rac- und hsp70-interagierende Gene, Glutathione S-Transferase, Zucker- und Ammonium-Transporter-, Pathogene-induzierte und abwehr-rele-

vante Gene, etc., in der Pathogenabwehr wahrscheinlich interagieren. Darüber hinaus zeigte sich für einige der Gene eine Übereinstimmung von, für die Genexpression relevantem Chromosom (Experiment Weizen-Gersten-Additionslinien) und der Genomregion des detektierten eQTL, was auf eine cis-Aktivität, d.h. einer direkten Wirkungsweise dieses Genes hinweist.

### Validierung und Kartierung resistenz-relevanter Kandidatengene

Zu den identifizierten resistenzrelevanten Kandidatengenen zählen die PR5, d.h. die Thaumatin-like Proteins (TLP), die bereits von STEINER-LANGE et al. (2003) sowie ZAREIE et al. (2002) als differentiell in der Gersten-*R. secalis* Interaktion beschrieben wurden. Für Gerste wurden bisher acht Isoformen der TLPs beschrieben (REISS & HORSTMANN 2001), wobei TLP3 blütenspezifisch exprimiert wird. Mittels RT-PCR sowie qRT-PCR basierend auf Blattmaterial von Igri und Triton sowie jeweils einer DH-Linie mit vergleichbaren Resistenzeigenschaften konnte 96 Stunden nach Inokulation mit dem Einzelsporisolat 271 und einem gegenüber *Rrs1* avirulentem Isolat 273/1 eine differentielle Expression der Isoformen TLP1, 5, 6 und 7 bestätigt werden. Die Kartierung der Gersten-TLPs in die vorliegende QTL-Karte ergab ein Cluster auf Chromosom 5HL sowie eine Kartierung auf Chromosom 3H und 4HS, wobei der Locus auf Chromosom 3H im Bereich des Selektionsmarkers cMWG680 des *R. secalis*-Resistenzgenkomplexes lokalisiert ist.

Weitere identifizierte Kandidatengene gilt es mittels qRT-PCR zu validieren und in die genetische Karte zu integrieren, um das Ziel, die Entwicklung funktioneller Marker für die Selektion hinsichtlich *Rhynchosporium*-Blattfleckenresistenz weiter zu verfolgen.

## Literatur

- BACKES, G., A. GRANER, B. FOROUGHI-WEHR, G. FISCHBECK, G. WENZEL and A. JAHOOOR, 1995: TAG 90:294-302.
- BJÖRNSTAD, A., A. BJÖRNSTAD, V. PATIL, A. TEKAUZ, A.G. MARØY, H. SKINNES, A. JENSEN, H. MAGNUS and J. MACKEY, 2002: Phytopathology 92:710-720.
- CHO, S., D.F. GARVIN and G.J. MUEHLBAUER, 2006: Genetics 172:1277-1285.
- GRONNEROD, S. A.G. MARØY, J. MACKEY, A. TEKAUZ, G.A. PENNER and A. BJÖRNSTAD, 2002: Euphytica 126:235-250.
- JACKSON, L.F. and R.K. WEBSTER, 1976: Phytopathology 66:719-725.
- JENSEN, J. G. BACKES, H. SKINNES and H. GIESE, 2002: Plant Breed. 121:124-128.
- KOSAMBI, D.D., 1944: Ann Eugen 12:172-175.
- PRELL, H.H., 1996: Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- REISS, E. and C. HORSTMANN, 2001: Physiol Mol Plant Pathol 58:183-188.
- SAYED, H. G. BACKES, H. KAYYAL, A. YAHYAOU, S. CECCARELLI, S. GRANDO, A. JAHOOOR and M. BAUM, 2004: Euphytica 135:225-228.
- SCHWEIZER, G., M. HERZ, S. MIKOLAJEWSKI, M. BRENNER, L. HARTL and M. BAUMER, 2004: Proceedings 9<sup>th</sup> International Barley Genetics Symposium, Brno, Czech Republic:258-265.
- SPANER, D. L.P. SHUGAR, T.M. CHOO, I. FALAK, K.G. BRIGGS, W.G. LEGGE, D.E. FALK, S.E. ULLRICH, N.A. TINKER, B.J. STEFFENSON and D.E. MATHER, 1998: Crop Sci. 38:843-850.
- STEINER-LANGE, S., A. FISCHER, A. BOETTCHER, I. ROUHARA, H. LIEDGENS, E. SCHMELZER and W. KNOGGE, 2003: MPMI 16:893-902.
- THOMAS, W.T.B., W. POWELL, R. WAUGH, K.J. CHALMERS, U.M. BARUA, P. JACK, V. LEA, B.P. FORSTER, J.S. SWANSTON, R.P. ELLIS, P.R. HANSON and R.C.M. LANCE 1995: TAG 91:1037-1047.
- UTZ, H.F. and A.E. MELCHINGER, 1996: J agri Genomics, Vol. 2.
- WEVELSIEP, L., E. RÜPPING and W. KNOGGE, 1993: Plant Physiol. 101:297-301.
- ZAREIE, R. D.L. MELANSON and P.J. MURPHY, 2002: MPMI 15:1031-1039.