

---

**Induktion der Resistenz gegenüber dem Weizenpathogen**  
***Fusarium graminearum***  
**durch gezielte Zellwandveränderungen in**  
***Brachypodium distachyon***

---

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften,  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Antje Blümke**

aus Rathenow

Lüneburg, im Mai 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. C. VOIGT  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. W. SCHÄFER  
Tag der Disputation: 05. Juli 2013

Hamburg, den 21. Juni 2013



Professor Dr. C. Lohr  
Vorsitzender des  
Fach-Promotionsausschusses Biologie

So remember to look up at the stars and not down at your feet.

Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist.

Be curious, and however difficult life may seem,

there is always something you can do, and succeed at.

It matters that you don't just give up.

Stephen Hawking

# INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Getreidepathogen <i>Fusarium graminearum</i> .....	1
1.1.1 Von <i>F. graminearum</i> produzierte Mykotoxine .....	1
1.1.2 Ausbreitung von <i>F. graminearum</i> in der Pflanzen .....	3
1.2 Modellorganismus <i>Brachypodium distachyon</i> .....	5
1.3 Aufbau der pflanzlichen Zellwand.....	7
1.3.1 Cellulose .....	9
1.3.2 Hemicellulosen .....	10
1.3.3 Pektine .....	11
1.3.4 Callose .....	12
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit .....	16
2. Material und Methoden .....	18
2.1 Chemikalien und Enzyme .....	18
2.2 Kits .....	18
2.3 Deoxyoligonukleotide und DNA-Vektoren .....	18
2.4 Medien, Puffer und Lösungen .....	20
2.5 Mikroorganismen und Kulturbedingung.....	21
2.6 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht .....	23
2.6.1 Pflanzeninokulation mit <i>F. graminearum</i> .....	23
2.6.2 Erzeugung transgener Pflanzen.....	25
2.7 Molekularbiologische Methoden .....	28
2.7.1 RNA-Präparation .....	28
2.7.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial .....	28
2.7.1.2 Probenvorbereitung für die quantitative <i>real time</i> PCR (qPCR).....	29
2.7.1.3 Quantitative <i>real time</i> PCR (qPCR) .....	29
2.7.2 DNA-Isolation.....	31
2.7.3 Restriktionsverdau genomischer DNA .....	31
2.7.4 Southern-Blot.....	32

2.8 Metabolitenanalyse .....	33
2.8.1 Bestimmung der Konzentration des Mykotoxins DON .....	33
2.8.2 Zellwandanalyse .....	34
2.8.2.1 Extraktion der alkoholunlöslichen Fraktion (AIR).....	34
2.8.2.2 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung durch Anionenaustausch-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) .....	35
2.8.3 Bestimmung der Callose-Konzentration .....	35
2.9 Mikroskopische Analysen .....	37
2.9.1 Kamera .....	37
2.9.2 Fluoreszenzbinokular .....	37
2.9.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM).....	37
2.10 Statistische Analysen.....	38
3. Ergebnisse .....	39
3.1 <i>F. graminearum</i> Infektion auf <i>B. distachyon</i> .....	39
3.1.1 <i>B. distachyon</i> kann von <i>F. graminearum</i> infiziert werden.....	39
3.1.2 <i>B. distachyon</i> zeigt unterschiedliche Resistenztypen nach Punktinokulation mit <i>F. graminearum</i> .....	40
3.1.3 Mykotoxinproduktion in <i>F. graminearum</i> inokulierten Ährchen .....	43
3.1.4 Induktion von Callose in <i>F. graminearum</i> infizierten <i>B. distachyon</i> .....	45
3.1.5 Differenzierte Zellwandveränderungen in <i>B. distachyon</i> durch <i>F. graminearum</i> Infektion.....	49
3.2 Behandlung von <i>B. distachyon</i> mit DON .....	51
3.2.1 Hohe DON Konzentrationen wirken nekrotisch .....	51
3.2.2 DON induzierte Zellwandveränderungen in niedriger Konzentration .....	52
3.2.3 Resistenzerhöhung durch Vorbehandlung mit DON .....	53
3.3 Integration der Callosesynthase AtGSL5 in <i>B. distachyon</i> .....	54
3.3.1 Erzeugung transgener <i>B. distachyon</i> Pflanzen.....	55
3.3.2 Bestätigung der Integration des Transgens .....	55
3.3.3 Integration von AtGSL5 in <i>B. distachyon</i> führt zur Erhöhung der Resistent gegenüber <i>F. graminearum</i> .....	57
3.3.4 Callosegehalt in <i>F. graminearum</i> -inokulierten Ährchen.....	58
3.4 Callosesynthasen in <i>B. distachyon</i> .....	60
3.4.1 Identifizierung von putativen Callosesynthsasen in <i>B. distachyon</i> .....	60
3.4.2 Expressionsstudien zu <i>BdGSL</i> .....	63
4. Diskussion .....	67
4.1 <i>F. graminearum</i> -Infektion in <i>B. distachyon</i> .....	67

4.1.1	<i>B. distachyon</i> besitzt keine Typ I-Resistenz gegenüber <i>F. graminearum</i> .....	67
4.1.2	Infektion definierter <i>F. graminearum</i> -Mutanten in <i>B. distachyon</i> verläuft vergleichbar zur Weizeninfektion .....	68
4.1.3	<i>F. graminearum</i> Infektion induziert spezifische Abwehrmechanismen während der Infektion .....	72
4.1.3.1	Induzierte Calloseablagerungen .....	72
4.1.3.2	Spezifische induzierte Zellwandveränderungen .....	74
4.2	Beteiligung von Callosesynthasen an der <i>F. graminearum</i> -Infektion in <i>B. distachyon</i> .....	79
4.3	Ausblick .....	81
5.	Zusammenfassung .....	83
6.	Abstract .....	85
7.	Literaturverzeichnis .....	87
8.	Anhang .....	104
8.1	Genexpression der Callosesynthasen aus <i>B. distachyon</i> nach Verwundung ....	104
8.2	Genexpression der Callosesynthasen aus <i>B. distachyon</i> nach Mehltauinfektion	106

## Abkürzungsverzeichnis

15-ADON	15-Acetyldeoxynivalenol
3-ADON	3-Acetyldeoxynivalenol
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AIR	alcohol insoluble residue, alkoholunlöslichen Bestandteile
ANOVA	Analysis of Variance, Varianzanalyse
<i>B. distachyon</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>
BBCH	Bundesanstalt, Bundessortenamt und chemischen Industrie
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaar(e)
<i>CaMV</i>	<i>cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	komplementäre DNA
CIM	Kallusinduktionsmedium
CLSM	Laserscanning-Mikroskopie
CSPD	Chemilumineszenzsubstrat für die alkalische Phosphatase
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DON	Deoxynivalenol
dpi	days post inoculation, Tage nach der Inokulation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
<i>F. graminearum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
Flg22	N-Terminus des Flagellins
GAX	Glucuronoarabinoxylane
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM	Keimungsmedium
GUS	$\beta$ -glucuronidase
HPAEC-PAD	High Performance Anion Exchange Chromatography mit Pulsed Amperometric Detection, Anionenaustausch-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion
hpi	hours post inoculation, Stunden nach der Inokulation
HR	Hypersensitive Reaktion
Kb	Kilobasen

L	Liter
LB	<i>Left border</i>
LSM	Laser Scanning Mikroskop
M	Molar
Min	Minute
MLG	<i>Mixed Linkage Glucan</i>
MS	Murashige-Skooge
NIV	Nivalenol
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster
PCR	Polymerasekettenreaktion
p-NPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat
ppb	Parts per billion, Teile pro Milliarde
ppm	Parts per million, Teile pro Million
qPCR	Quantitative <i>real time</i> PCR
RB	<i>Right border</i>
RM	Regenerationsmedium
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTR	RealTime ready
SAR	Systemisch erworbene Resistenz
SM	Selektionsmedium
SNA	<i>Synthetic Nutrient Poor Agar</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolett
w/v	Gewicht pro Volumen
XyG	Xyloglucan

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: <i>Fusarium Head Blight</i> in Weizen. ....	2
Abbildung 1-2: Modelnpflanze <i>B. distachyon</i> . ....	7
Abbildung 1-3: Aufbau der Zellwand. ....	9
Abbildung 1-4: Pflanzliche Callose und Callosesynthasen. ....	13
Abbildung 2-1: Beispiel des Punktesystems ( <i>Disease Score</i> ) zur Bewertung der Infektionsstärke von <i>F. graminearum</i> auf <i>B. distachyon</i> . ....	25
Abbildung 3-1: Darstellung eines <i>B. distachyon</i> -Ährchens 14 Tage nach einer erfolgreichen Sprühinokulation mit <i>F. graminearum</i> . ....	40
Abbildung 3-2: Infektionsverlauf in <i>F. graminearum</i> inokulierten <i>B. distachyon</i> Ährchen..	42
Abbildung 3-3: Mykotoxinakkumulation in <i>F. graminearum</i> inokulierten <i>B. distachyon</i> Ährchen. ....	44
Abbildung 3-4: Beispielhafte Calloseablagerungen in <i>F. graminearum</i> inokulierten <i>B. distachyon</i> -Ährchen zu verschiedenen Zeitpunkten. ....	46
Abbildung 3-5: Calloseablagerungen in <i>B. distachyon</i> -Ährchen nach der Inokulation mit verschiedenen <i>F. graminearum</i> Mutanten. ....	48
Abbildung 3-6: Frühe und späte Zusammensetzung nicht-celluloser Monosaccharide der Zellwand in <i>F. graminearum</i> inokulierten <i>B. distachyon</i> Ährchen. ....	50
Abbildung 3-7: Auswirkungen einer Inokulation mit DON auf <i>B. distachyon</i> Ährchen. ....	52
Abbildung 3-8: Auswirkung einer Vorbehandlung mit DON auf die <i>F. graminearum</i> Infektion. ....	54
Abbildung 3-9: Integrationsmuster der erfolgreich transformierten Pflanzenlinien. ....	56
Abbildung 3-10: Darstellung der reduzierten Infektion mit <i>F. graminearum</i> 14 dpi in transgenen 35S:: <i>AtGSL5-GFP</i> -Linien. ....	58
Abbildung 3-11: Überexpression von <i>AtGSL5</i> führt zu vermehrten Calloseablagerungen in der Rachilla der inokulierten Blüte 3 dpi mit <i>F. graminearum</i> wt-GFP. ....	59
Abbildung 3-12: Phylogenetischer Baum putativer Callosesynthasen <i>B. distachyon</i> (BdGSL) mit der jeweiligen Exonstruktur. ....	62

Abbildung 3-13: Phylogenetischer Baum putativer Callosesynthasen von <i>A. thaliana</i> (AtGSL), Reis (OsGSL) und <i>B. distachyon</i> (BdGSL).....	62
Abbildung 3-14: Calloseablagerungen und Expression der zwei putativen <i>AtGSL5</i> -Homologen <i>BdGSL2</i> und <i>BdGSL3</i> nach Verwundung. ....	64
Abbildung 3-15: Calloseablagerungen nach Inokulation mit dem Nichtwirtspathogen <i>G. cichoracearum</i> . ....	65

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1: Ungefähre Zusammensetzungen pflanzlicher Zellwände. ....	8
Tabelle 2-1: Verwendete Kits und deren Herkunft. ....	18
Tabelle 2-2: Verwendete Primer in 5'-3'-Orientierung, sowie Sonden des RealTime ready qPCR Assays ( <i>Roche</i> Diagnostics, Mannheim). ....	19
Tabelle 2-3: Verwendete Plasmide. ....	20
Tabelle 2-4: Antibiotika und die eingesetzte Konzentration. ....	20
Tabelle 2-5: Verwendete Bakterien- und Pilzstämmen ..... 21	21
Tabelle 2-6. Extinktion- und Emissionswerte der genutzten Fluoreszenzproteine am CSLM. ....	38
Tabelle 3-1: Übersicht über die identifizierten Callosesynthasen aus <i>B. distachyon</i> . ....	61

## 1. EINLEITUNG

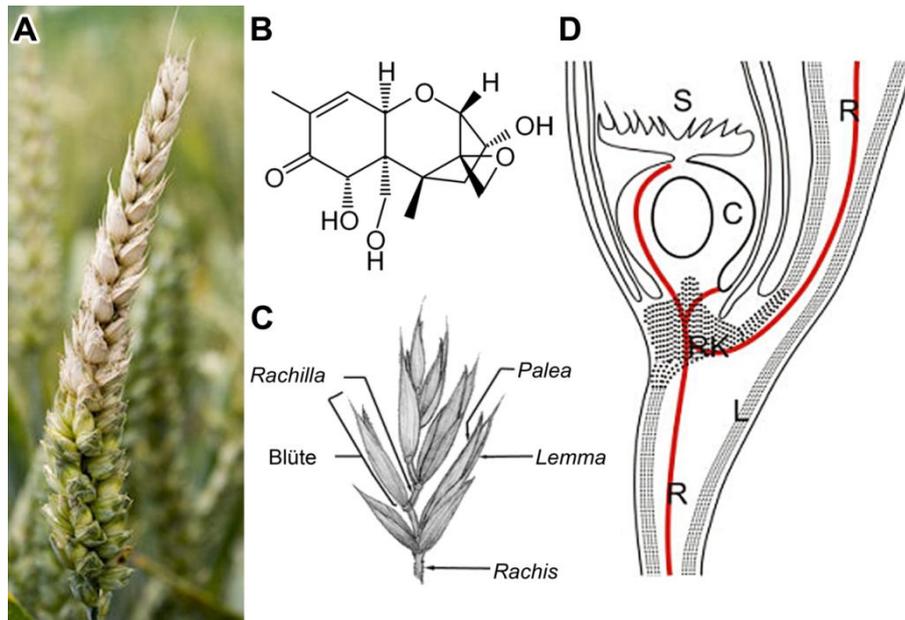
### 1.1 Das Getreidepathogen *Fusarium graminearum*

Der filamentöse Askomyzet *Fusarium graminearum* Schwabe (Teleomorph: *Gibberella zeae* [Schweinitz] Petch) ist der Hauptauslöser der Ährenbleiche (*Fusarium Head Blight*, FHB, vgl. Abbildung 1-1 A), die 1884 in England zum ersten Mal dokumentiert wurde. Bereits in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelte sich die Krankheit zur Bedrohung für den Anbau von Weizen- und Gerste (Stack, 2000). In den letzten Jahren kam es zu weltweiten Ausbrüchen, etwa in den USA, China, Australien und Europa (McMullen *et al.*, 1997; Goswami und Kistler, 2004. Madgwick *et al.*, 2011), Das vermehrte Auftreten und die wachsende Verbreitung des Pflanzenpathogens, lässt dieses zunehmend in den globalen Fokus rücken (Madgwick *et al.*, 2011; Chakraborty und Newton, 2011).

*F. graminearum* befällt vor allem kleinkörniges Getreide, wie Weizen, Gerste und Hafer, ist aber auch als Kolbenfäule auf Mais bekannt (McMullen *et al.*, 1997). Neben beträchtlichen Ernteeinbußen führt eine Infektion mit *F. graminearum* zu Qualitätsverlusten bei den Körnern, da diese nur unzureichend ausgebildet werden (Bechtel *et al.*, 1985; McMullen *et al.*, 1997). Zudem sind diese mit Mykotoxinen belastet, die sich negativ auf die menschliche und tierische Gesundheit auswirken können (D’Mello *et al.*, 1999).

#### 1.1.1 Von *F. graminearum* produzierte Mykotoxine

Zu den von *F. graminearum* produzierten Mykotoxinen zählen, neben dem als Östrogen wirkenden nichtsteroiden Zearalenon, die am häufigsten nachweisbaren Trichothecene (Nicholson, 2001). Sie gehören zu den trizyklischen Sesquiterpenoiden mit einem Epoxy-Ring (Abbildung 1-1 B), der für die Toxizität verantwortlich ist (Desjardins *et al.*, 1993). Anhand der unterschiedlichen Seitengruppen werden die Trichothecene in 4 Gruppen eingeteilt (A – D). Während die Typ A-Trichothecene auf Säugetiere wesentlich toxischer wirken als die eher phytotoxisch wirkenden Typ B-Trichothecene (Krska *et al.*, 2001; Foroud und Eudes, 2009), können die Typ B-Trichothecene häufiger in von



**Abbildung 1-1: *Fusarium Head Blight* in Weizen.**

(A) Weizenähre mit typischen Symptomen einer FHB-Infektion, die gekennzeichnet ist durch das Ausbleichen der Ähre. (B) Während einer FHB Infektion wird das Mykotoxin DON gebildet, das auf dem Grundgerüst der Trichothecene basiert und zusätzlich einen Epoxyring am C12 trägt. (C) Typischer Aufbau eines Ährchens. Die Rachis dient als zentrale Achse und verbindet die einzelnen Ährchen miteinander, während die Blüten durch die Rachilla getragen werden. In der Blüte umschließen Lemma und Palea die Karyopse. (D) Schematische Darstellung des Infektionsweges von *F. graminearum* (rote Linien) durch den Längsschnitt einer Weizenblüte. R: Rachis, L: Leitbündel, RK: Rachisknoten, C: Karyopse, S: Narbe (Stigma). Nach Ilgen (2010).

*F. graminearum* verunreinigten Proben nachgewiesen werden (Nicholson, 2001). *F. graminearum* produziert vor allem die Typ B-Trichothecene Nivalenol (NIV) und Deoxynivalenol (DON), sowie deren acetylierte Derivate 3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON) und 15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON) (Placinta *et al.*, 1999).

Die Toxizität von DON wird primär auf eine nicht-kompetitive Inhibierung der eukaryotischen Proteinsynthese zurückgeführt (Ueno, 1977; Rocha *et al.*, 2005). Aufgrund der lipophilen Eigenschaften können die niedermolekularen Trichothecene im Allgemeinen relativ gut durch die Zellmembran diffundieren und durch die Bindung an die ribosomale 60S-Untereinheit die Aktivität der Peptidyltransferase blockieren (Wannemacher *et al.*, 1997). Als vermutlich sekundäre Effekte der gestörten Proteinsynthese konnten im tierischen Organismus u. a. die Inhibierung der DNA und RNA-Synthese, sowie der Mitose beobachtet werden. Durch die Bindung an das Ribosom wird gleichzeitig eine ribotoxische Stressantwort (*ribotoxic stress response*) über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) aktiviert, die den programmierten Zelltod induziert (Rocha *et al.*, 2005; Pestka, 2008).

Eine DON Intoxikation kann sowohl akute als auch chronische Auswirkungen haben (D’Mello *et al.*, 1999). In landwirtschaftlichen Nutztieren, vor allem in Schweinen, die besonders empfindlich auf DON reagieren, konnte Futterverweigerung, Gastroenteritis und Erbrechen ab einer DON Konzentration von 50 bis 200 µg/kg (entsprechen 0,5 bis 2 ppm) beobachtet werden (Forsyth *et al.*, 1977; Trenholm *et al.*, 1984). Extrem hohe Dosen führen zu einer erhöhten Sterblichkeit. So liegt die letale Dosis (LD<sub>50</sub>) von DON in Mäusen bei einer oralen Aufnahme zwischen 46 und 70 mg/kg (Ueno, 1984; Pestka, 2008). Eine chronische Intoxikation kann zu verminderter Nahrungsaufnahmen und Gewichtsverlust führen. Zudem scheint DON immunsuppressiv durch eine Hemmung der Makrophagenaktivität zu wirken (Pestka und Smolinski, 2005). Aufgrund der toxischen Wirkung und der daraus resultierenden Gesundheitsgefahren bei einer Aufnahme von DON wurden sowohl Höchstmengen für Lebensmittel als auch Richtwerte für Futtermittel festgelegt (Verordnung (EG) Nr. 856/2005 der Kommission vom Juni 2006).

### **1.1.2 Ausbreitung von *F. graminearum* in der Pflanzen**

In der Regel gelangt *F. graminearum* über sexuell gebildete Askosporen oder asexuelle Makrokonidien auf die Wirtspflanze (Parry *et al.*, 1995, Gilbert und Fernando, 2004), wo die Sporen nach 6 bis 12 Stunden auskeimen (Xu und Nicholson, 2009, Brown *et al.*, 2010). Durch die exponierten Antheren zum Zeitpunkt der Anthese gelangen die Hyphen in die Blüte (Parry *et al.*, 1995). Der weitere Infektionsverlauf ist in Abbildung 1-1 schematisch dargestellt. Innerhalb der Blüte kolonisieren die Hyphen zunächst Lemma und Palea und dringen dann über den Fruchtknoten (Karyopse), als auch den Blütenboden in das pflanzliche Wirtsgewebe ein (Jansen *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2010). Durch inter- sowie intrazelluläres Wachstum erreicht *F. graminearum* schließlich die Rachilla. Die Rachis wird 5 Tage nach der Inokulation kolonisiert, von wo aus die Hyphen in die Leitbündel vordringen und sich in der Ähre weiter ausbreiten können (Jansen *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2010). Vermutlich führt der massive Befall der Leitbündel zu einem Abschneiden der Nährstoffzufuhr und schließlich zum Ausbleichen der Ähre über dem befallenen Ährchen (Miller *et al.*, 2004).

Obwohl Trichothecene für eine erfolgreiche Kolonisierung zu Beginn der Infektion nicht benötigt werden (Jansen *et al.*, 2005), sind sie vermutlich für die weitere Ausbreitung des

Pilzes und die Überwindung der pflanzlichen Abwehr erforderlich (Proctor *et al.*, 1995; Jansen *et al.*, 2005). Schon sehr geringe Konzentrationen von  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$  M können zu Nekrosen, Chlorosen und Welkesymptomen in anfälligen Pflanzen führen (Cutler, 1988). Durch die Deletion des ersten Enzyms der DON Synthese, der Trichodiensynthese TRI5, wird die Produktion des Toxins unterbunden (Hohn und Desjardins, 1992; Proctor *et al.*, 1995). Inokulationstests mit *F. graminearum* in Weizen haben gezeigt, dass  $\Delta tri5$ -Mutanten zwar noch das inokulierte Ährchen infizieren können, eine weitere Kolonisierung jedoch durch pflanzliche Zellwandverdickungen im Bereich des Rachisknoten unterbunden wird (Jansen *et al.*, 2005). Daher wird DON im Weizen als Virulenzfaktor angesehen (Desjardins *et al.*, 1993; Bai *et al.*, 2002).

Ein weiterer wichtiger und allgemeiner Virulenzfaktor von *F. graminearum* ist die sekretierte Lipase FGL1. Eine Deletion des Gens hat eine Verminderung der extrazellulären Lipaseaktivität, sowie im Weiteren eine reduzierte Virulenz in Weizen und Mais zur Folge. Im Detail verläuft eine Infektion im Weizen ähnlich dem  $\Delta tri5$  Knock-out, nach der anfänglichen Infektion des inokulierten Ährchens erfolgt keine weitere Ausbreitung in der Ähre (Voigt *et al.*, 2005).

Beteiligt an der Regulation von FGL1 auf Expressionsebene ist die MAP-Kinase GPMK1 (*Gibberella pathogenicity MAP kinase 1*) (Bluhm *et al.*, 2007; Salomon *et al.*, 2012). Neben der Induktion der lipolytischen Aktivität, reguliert GPMK1 zusätzlich die frühe Induktion von weiteren extrazellulären Endonuklaeasen, Xylanasen und Proteasen, die zu dem Abbau der pflanzlichen Zellwand während des Infektionsprozesses beitragen (Jenczmionka und Schäfer, 2005). Dementsprechend apathogen verläuft auch eine  $\Delta gpmk1$  Infektion. Die Antheren werden noch besiedelt, eine weitere Ausbreitung im Blütengewebe, z. B. auf Lemma oder Palea unterbleibt aber (Jenczmionka *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 2003).

Anhand der Infektionsverläufe können verschiedene Resistenztypen unterschieden werden. Bei einer Typ I-Resistenz wird bereits die Primärinfektion verhindert (Schroeder und Christensen, 1963). Dies wird sowohl auf morphologische, als auch physiologische Merkmale des Weizens zurückgeführt, etwa auf Blühzeitpunkt und -dauer oder den Ährenaufbau (Yoshida *et al.*, 2005; Walter *et al.*, 2010). Bei einer Typ II-Resistenz ist die Ausbreitung des Pilzes auf das bereits infizierte Ährchen beschränkt (Schroeder und

Christensen, 1963). Eine Kolonisierung weiteren Gewebes durch die Rachis wird verzögert oder unterbunden (Ribichich *et al.*, 2000). Dies kann an Pathogen-induzierten chemischen und physikalischen Barrieren, wie z. B. Zellwandauflagerungen (Kang und Buchenauer, 2000; Ribichich *et al.*, 2000), aber auch an anatomischen Eigenschaften resistenter Sorten liegen (Walter *et al.*, 2010). Neben den beiden Hauptresistenztypen wurden weitere Resistenztypen beschrieben (Bai und Shaner, 2004). So existiert eine Resistenz gegenüber einer Korninfektion (Mesterházy, 1995), eine Toleranz gegenüber FHB und deren Mykotoxinen (Mesterházy *et al.*, 1999), sowie die Resistenz gegenüber DON, z. B. durch Abbau des Toxins (Miller *et al.*, 1985; Miller und Arnison, 1986).

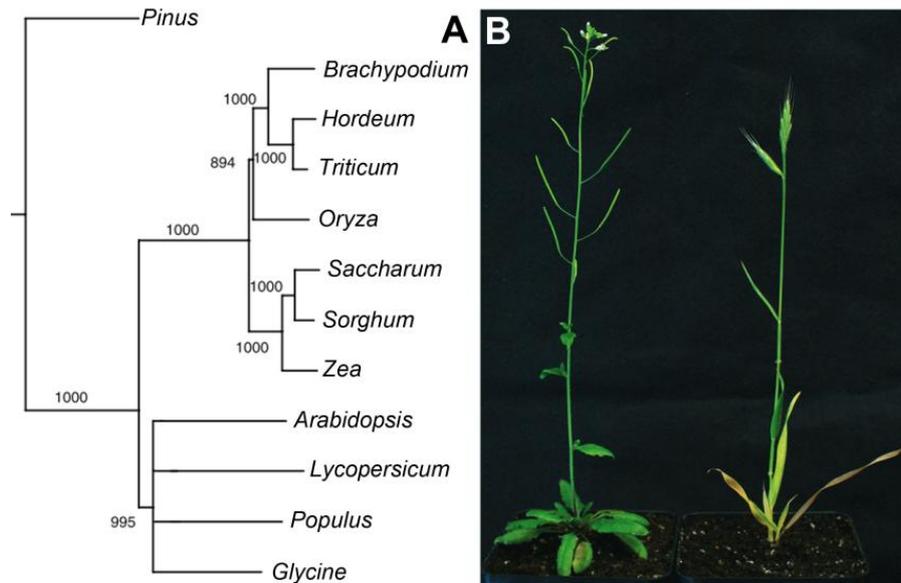
Obwohl eine hohe genetische Vielfalt in Bezug auf das Resistenzmerkmal in Weizen besteht, konnten bisher nur wenige Weizensorten mit einem hohen Resistenzniveau identifiziert werden (Bai und Shaner, 2004; Buerstmayr *et al.*, 2009). Viele der resistenteren Sorten zeigen zudem weitere agronomisch nicht akzeptable Eigenschaften, wie eine kurze Ähre und eine späte Reifung, wodurch sie für den kommerziellen Anbau nicht mehr interessant sind (Bai und Shaner, 2004). Neben der klassischen Züchtung (Mesterházy, 1995; Miedaner, 1997; Mesterházy *et al.*, 1999) wird zusätzlich mittels molekularbiologischer Methoden (Kaur *et al.*, 2008) nach Genen und Genombereichen gesucht, die an der Ausprägung der Resistenz beteiligt sind (Bai und Shaner, 2004; Buerstmayr *et al.*, 2009). Zur tiefergehenden Analyse eignet sich Weizen auf Grund des großen und sehr komplexen Genoms (Salamini *et al.*, 2002), das sich nur schwer transformieren lässt (Vogel und Bragg, 2009), allerdings nur bedingt.

## **1.2 Modellorganismus *Brachypodium distachyon***

Lange Zeit galt die Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* als idealer Modellorganismus für die Pflanzenforschung. Sie ist klein, hat eine kurze Generationszeit und kann unter Laborbedingung angezogen werden. Zudem besitzt sie ein relativ kleines, diploides Genom, das vollständig sequenziert vorliegt und einfach zu transformieren ist (Meinke *et al.*, 1998). Da *A. thaliana* aber zu den Dikotyledonen gehört, unterscheidet sie sich in einigen Bereichen grundlegend von den Monokotyledonen, zu denen auch die wirtschaftlich wichtigen Gräser wie Weizen, Mais und Reis gehören. So unterscheidet sich z. B. der Aufbau der Zellwände zwischen dikotylen und monokotylen Spezies dramatisch.

Dabei variieren sowohl die genutzten Polysaccharide, die das Grundgerüst und die Verknüpfungen dazwischen bilden, als auch die Menge an phenolischen Verbindungen, Pektinen und Proteinen, die in der monokotylen Zellwand vermehrt vorkommen (Carpita, 1996; Vogel, 2008). Daneben existieren weiter Aspekte, wie der Samenaufbau und die Wurzelarchitektur, die deutlich voneinander abweichen.

Daher hat sich in den letzten Jahren das einjährige Gras *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv, insbesondere aufgrund der nahen Verwandtschaft zu Weizen und Gerste als Modellpflanze für die Süßgräser durchgesetzt (vgl. Abbildung 1-2, Vogel *et al.*, 2006b; Brkljacic *et al.*, 2011) Dabei besitzt das selbstbestäubende Gras *B. distachyon* etwa die gleichen gewünschten Eigenschaften eines Modellorganismus wie *A. thaliana*. Es erreicht innerhalb einer kurzen Generationszeit von 8 bis 12 Wochen eine Wuchshöhe von nur 15 bis 20 cm (Vogel und Bragg, 2009), was für die Anzucht unter Laborbedingungen ideal ist. Genetische Studien werden durch eins der kleinsten Genome unter den Süßgräsern, mit 355 Millionen Basenpaaren (bp) verteilt auf 5 Chromosomen (Ozdemir *et al.*, 2008), die nur wenige repetitive oder methylierte DNA-Bereiche aufweisen, stark vereinfacht (Draper *et al.*, 2001). Das vollständig sequenzierte Genom ist frei zugänglich (Initiative, 2010) und erlaubt sowohl die Überexpression, als auch eine Deletion von Genen durch die Anwendung von verschiedenen Transformationssystemen. Dabei werden relativ hohe Transformationsraten von 5% für den biolistischen Beschuss mit einer Genkanone (Draper *et al.*, 2001; Christiansen *et al.*, 2005) und bis zu 86% bei *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation (Vogel *et al.*, 2006a; Vogel und Hill, 2008; Vain *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2009) durch die Nutzung von embryogenen Gewebe erreicht. Neben der so erzeugten T-DNA Kollektion stehen verschiedene Inzuchtlinien und Wildtyp-Ökotypen zur Verfügung (Vogel und Bragg, 2009; Thole *et al.*, 2010), die ein breites Spektrum an ökologischer, morphologischer und genomischer Diversitäten abdecken. Durch Kombination all dieser Faktoren und die enge Verwandtschaft zu den Getreiden werden genomische Studien sowohl auf funktioneller als auch auf struktureller Ebene ermöglicht.



**Abbildung 1-2: Modellpflanze *B. distachyon*.**

(A) Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft von *B. distachyon* nach Vogel (2006b). Erstellt anhand der 20 am stärksten exprimierten Gene, wobei die Astlänge proportional zu Sequenzabweichungen ist. (B) Vergleichende Darstellung der Modellpflanzen *A. thaliana* und *B. distachyon* (Garvin, 2007).

Für die Untersuchungen von Pflanzen-Pathogen-Interaktionen wurde *B. distachyon* bereits als Modellsystem beschrieben. So konnten Allwood *et al.* (2006) und Routledge *et al.* (2004) für die Infektion mit dem Reisbranderreger *Magnaporthe grisea* unterschiedlich ausgeprägte Resistenzvarianten in Ökotypen von *B. distachyon* identifizieren. Dabei reichte das Spektrum von Ökotypen, die Resistenzen gegen alle untersuchten *M. grisea* Stämme zeigten, bis zu sehr suszeptiblen Pflanzen mit unterschiedlich ausgeprägten Krankheitssymptomen. Eine Suszeptibilität wurde vor kurzem auch für *Fusarium culmorum* und *F. graminearum* beschrieben (Peraldi *et al.*, 2011).

### 1.3 Aufbau der pflanzlichen Zellwand

Die erste Barriere der pflanzlichen Abwehr, auf die potentielle Pathogene treffen, ist die präformierte Zellwand, die den Protoplasten umgibt. Während der Zellteilung wird zunächst die Mittellamelle zwischen den Tochterzellen an der Zellplatte gebildet. An die hauptsächlich aus Pektinen bestehende Mittellamelle wird noch während der Zellteilung die Primärwand angelagert, die während des Zellwachstums weiter modifiziert wird

(Heredia *et al.*, 1995; Zhong und Ye, 2007; Evert, 2009). Zellen, die eine hohe Teilungsaktivität haben, sowie ausdifferenzierte Zellen, die an Stoffwechselprozessen, wie der Photosynthese, Sekretion und Speicherung beteiligt sind, bilden ausschließlich Primärwände (Evert, 2009). Zellen die besonders der Stabilität dienen, wie im Xylem oder Sclerenchym, bilden nach Beendigung des Streckungswachstums zusätzlich Sekundärwände zwischen der Primärwand und der Plasmamembran (Zhong und Ye, 2007; Vogel, 2008). Dabei werden vermehrt Cellulosefibrillen und Hemicellulosen mit wenigen Seitenketten eingelagert, was zu einer kompakteren und steiferen Zellwand führt (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012). Zusätzlich wird die Zellwand durch das Einlagern von bis zu 20% Lignin dehydriert, wodurch sie fast unangreifbar für einen enzymatischen Verdau wird (Vogel, 2008; Doblin *et al.*, 2010). Eine Lignifizierung sowohl der Sekundär-, als auch der Primärwand wird häufig nach einer Verwundung oder als Pathogenantwort beobachtet (Müse *et al.*, 1997; Moura *et al.*, 2010). Dabei scheint eine Verbindung mit der Hypersensitiven Reaktion (HR) zu bestehen, die durch einen lokalen Zelltod an der Infektionsstelle gekennzeichnet ist (Moerschbacher *et al.*, 1990; Cohn *et al.*, 2001; Moura *et al.*, 2010).

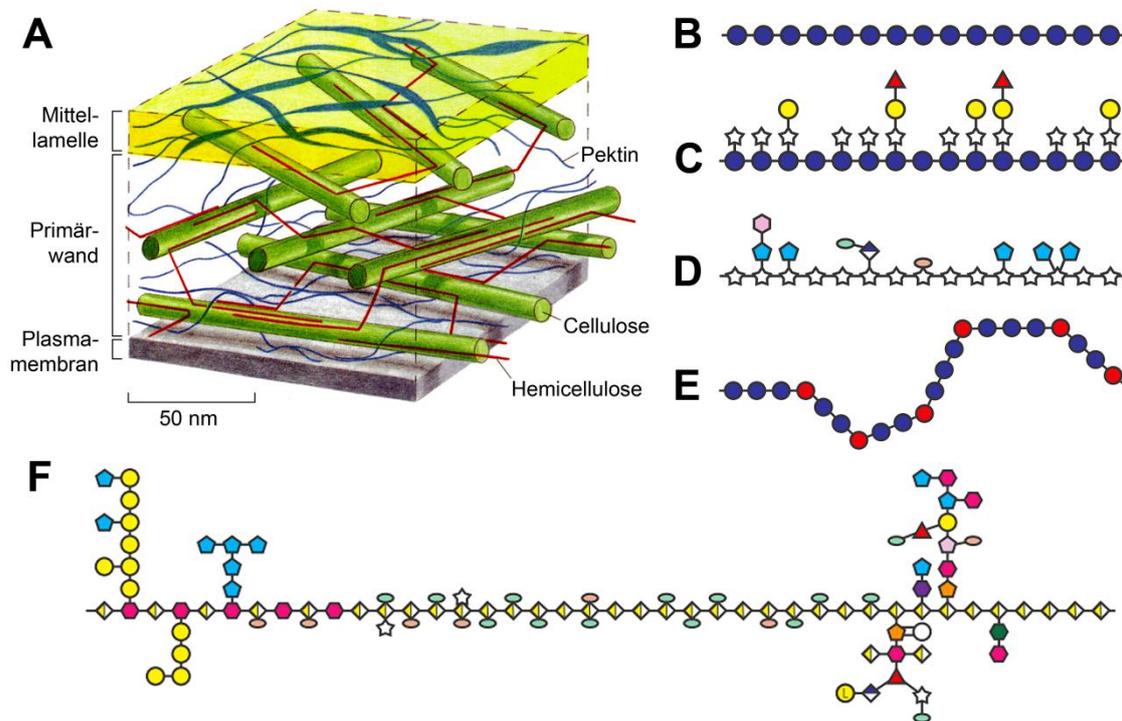
Eine Übersicht der einzelnen Zellwandkomponenten gibt Tabelle 1-1.

**Tabelle 1-1: Ungefähre Zusammensetzungen pflanzlicher Zellwände.**

Die Komponenten der Zellwände variieren zwischen Spezies und Gewebetypen. Unterschieden wird zwischen Dikotyledonen und Gräser, sowie zwischen Primär und Sekundärwand. Angaben in % Trockenmasse. XyG: Xyloglucane, MLG:  $\beta$ -(1,3;1,4)-Glucane. Modifiziert nach Scheller (2010) und Vogel (2008).

Polysaccharid	Dikotyledonen		Gräser	
	Primärwand	Sekundärwand	Primärwand	Sekundärwand
Cellulose	15 – 30	45 – 50	20 – 30	35 – 45
Hemicellulosen				
Xylane	5	20 – 30	20 – 40	40 – 50
XyG	20 – 25	gering	1–5	gering
MLG	keine	keine	2 – 30	gering
Pektine	20 – 35	0,1	5	0,1

Da stoffwechselaktive Zellen nur von einer Primärwand umgeben sind, soll im Folgenden die Beschaffenheit dieser beschrieben werden.



**Abbildung 1-3: Aufbau der Zellwand.**

(A) Vereinfachtes Modell der Primärwand. Zwischen der Plasmamembran und der Mittellamelle liegt die primäre Zellwand. Eingebettet in einer Matrix aus Pektinen liegen die Cellulosefibrillen, die durch Hemicellulosen verknüpft sind. (Nach Scheller und Ulvskov (2010)) (B - F) Grundstrukturen der Zellwandpolysaccharide. (Nach Burton und Fincher (2012)) (B) Cellulose besteht aus unverzweigten  $\beta$ -(1,4)-glykosidisch verknüpften D-Glucosemonomeren (blaue Kreise). (C) Dieses Grundgerüst wird bei Xyloglucanen durch regelmäßig angeordnete Verzweigungen von Xylosen (Sterne) ergänzt, daran gebunden finden sich Galactosen (gelbe Kreise) und Fucosen (Dreiecke). (D) Dagegen sind Heteroxylane aus  $\beta$ -(1,4)-glykosidisch verknüpften Xylosemonomeren aufgebaut, mit Verzweigungen aus Arabinose (hellblaue Fünfecke) und Glucuronsäure (Rauten) aufweisen. (E) Die Polysaccharidkette der *mixed linkage glucans* erhält durch zusätzliche  $\beta$ -(1,3)-glykosidisch verknüpften D-Glucosen (rote Kreise) eine unregelmäßige Struktur. (F) Das Grundgerüst der Pektine besteht hauptsächlich aus  $\alpha$ -(1,4)-glykosidisch verknüpften Galacturonsäuren mit vielfältigen Seitenketten und diversen Methyl- und Acetylgruppen (Ellipsen).

### 1.3.1 Cellulose

Die Primärwand besteht hauptsächlich aus kristallinen Cellulosefibrillen, die sich aus unverzweigten  $\beta$ -(1,4)-glykosidisch verknüpften Glucosemonomeren, aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen, zusammenlagern (Abbildung 1-3 B; Burton *et al.*, 2010). Gebildet wird Cellulose durch rosettenartig

angeordnete und an der Plasmamembran verankerte Multienzymkomplexe (Delmer, 1987; Doblin *et al.*, 2002). Die Cellulosefibrillen sind wiederum eingebettet und über Wasserstoffbrückenbindungen in einer Matrix aus Hemicellulosen, Pektinen und Glykoproteinen vernetzt (vgl. Abbildung 1-3 A; Carpita und Gibeaut, 1993; Carpita, 1996).

### 1.3.2 Hemicellulosen

Definiert werden Hemicellulosen, als nicht zu den Cellulosen und Pektinen gehörende  $\beta$ -(1,4)-glykosidisch verknüpfte Polysaccharide mit einem Grundgerüst aus Glucose-, Mannose- oder Xylosemonomeren, die im Gegensatz zu den Cellulosen auch Verzweigungen der Ketten aufweisen (Scheller und Ulvskov, 2010). Sie zeigen eine hohe Variabilität und können sich je nach Zelltyp, Entwicklungsstadium und Pflanzengruppe unterscheiden (Evert, 2009). Grundsätzlich werden zwei Typen von Zellwänden unterschieden (Carpita und Gibeaut, 1993).

Zellwände des Typ I finden sich bei den Dikotyledonen und bei etwa der Hälfte der Monokotyledonen, den nicht Commelinoiden. Bei diesen erfolgt die Vernetzung der Cellulosen vorwiegend über Xyloglucane (XyG). Die Matrix ist zudem reich an Pektinen und Strukturproteinen, es finden sich aber nur wenige Heteroxylane und Heteromannane (Vogel, 2008; Burton *et al.*, 2010). Wie in Abbildung 1-3 C dargestellt sind XyG, wie die Cellulosen, aus linearen Ketten von  $\beta$ -(1,4)-glykosidisch verknüpften Glucosemonomeren aufgebaut, besitzen aber regelmäßige, repetitiv angeordnete Seitenketten aus Xylose. Spezies-abhängig finden sich auch Galactose, Arabinose, und seltener Fucose an diesen Seitenketten (Carpita und Gibeaut, 1993; Cosgrove, 2005; Vogel, 2008).

Bei den Typ II-Zellwänden, die bei commelinoiden Monokotyledonen vorkommen, zu denen auch die Ordnung der Poales und somit die Gräser gehören, findet die Vernetzung dagegen hauptsächlich über Heteroxylane (Abbildung 1-3 D), wie den Glucuronoarabinoxylanen (GAX), statt und es finden sich nur geringe Mengen an Pektinen und Strukturproteinen (Carpita, 1996; Henry und Harris, 1997; Vogel, 2008; Burton *et al.*, 2010). Die häufig vorkommenden GAX bestehen aus einem  $\beta$ -(1,4)-glykosidisch verknüpften Xylose-Grundgerüst, mit unregelmäßig angeordneten Seitenketten aus Arabinose und Glucuronsäure (Wilkie, 1979; Vogel, 2008; Scheller und Ulvskov, 2010).

In Gräsern finden sich auch relativ viele phenolische Verbindungen, die über Esterbindungen die GAX miteinander verbinden (Iiyama *et al.*, 1993; Scalbert *et al.*, 1985; Carpita, 1996). So können von den Hydroxyzimtsäuren, Ferulasäure und *p*-Coumarinsäure jeweils bis zu 4% in den Zellwänden nachgewiesen werden (Hatfield *et al.*, 1999; Vogel, 2008). Eine weitere Besonderheit der Typ II-Zellwände ist das Vorkommen von sogenannten Mischverbindungen (*mixed linkage glucan*, MLG; Abbildung 1-3 E). Die Konzentration dieser  $\beta$ -(1,3;1,4)-glykosidisch verknüpften D-Glucane korreliert stark mit dem Zellwachstum (Buckeridge *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000; Vogel, 2008), weshalb man von einer Beteiligung an der Zellexpansion in sich schnell entwickelnden Gewebe, wie im Keimling, ausgeht (Hoson und Nevins, 1989; Chen *et al.*, 1999; Burton und Fincher, 2012). Daneben scheinen MGL eine sekundäre Möglichkeit zu bieten Glucose zu speichern. So finden sich im stärkehaltigem Endosperm von Gerstekörnern bis zu 4%, in dem von *B. distachyon* sogar 42% MLG (Guillon *et al.*, 2011; Burton und Fincher, 2012).

Im Gegensatz zu den Cellulosen, die direkt an der Plasmamembran synthetisiert werden, werden Hemicellulosen, wie auch die Pektine, über Glykosyltransferasen im Golgi synthetisiert. Anschließend werden sie in Vesikel, die mit der Plasmamembran verschmelzen, transportiert (Cosgrove, 2005; Scheller und Ulvskov, 2010).

### 1.3.3 Pektine

Die Pektine bilden die heterogenste Klasse der Zellwandpolysaccharide (Levy und Staehelin, 1992; Willats *et al.*, 2001). Sie machen etwa 30 bis 50 Prozent des Trockengewichts der dikotyledonen, aber nur 2 bis 10 Prozent der monokotyledonen Zellwände aus. Teilweise sind sie in Gräsern nur in Spuren nachweisbar (Carpita, 1996; Evert, 2009; Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012). Aufgebaut sind die Pektine aus  $\alpha$ -(1,4)-glykosidisch verknüpften D-Galacturonsäuremonomeren, mit teilweise veresterten Seitengruppen (Abbildung 1-3 F; Carpita, 1996; Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012). Aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften können sie Wasser binden und bilden eine gelartige Matrix in der die Cellulosen und Hemicellulosen eingebettet sind (Carpita und Gibeaut, 1993; Willats *et al.*, 2001).

Interessanterweise scheinen Pektinfragmente u. a. in der Pathogenantwort ein Rolle zu spielen (Scheller und Ulvskov, 2010). Um die pflanzliche Zellwand zu durchbrechen,

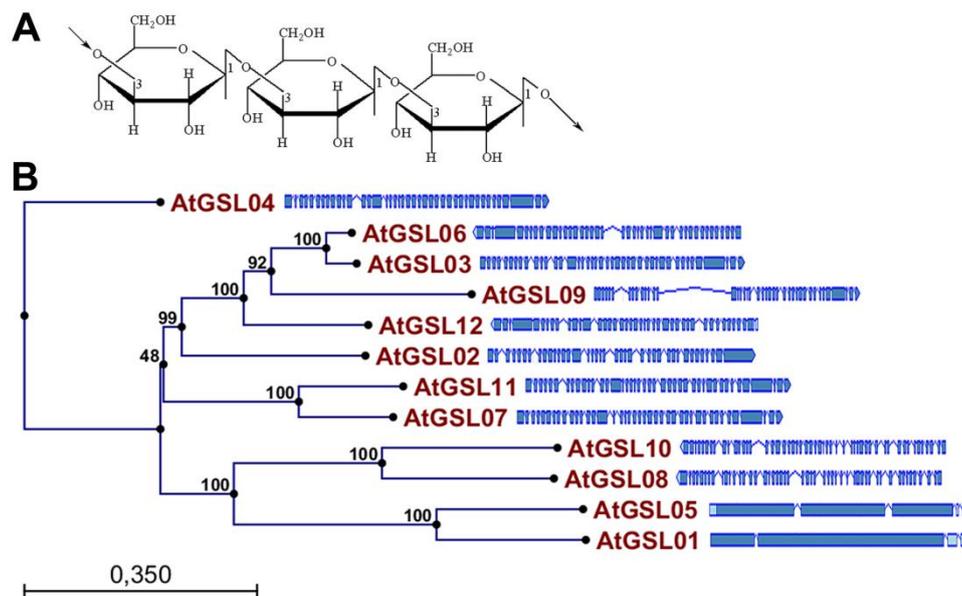
sekretieren pathogene Pilze Zellwand-abbauende Enzyme, wie Polygalacturonasen, die in der Lage sind Pektine zu depolymerisieren (Annis und Goodwin, 1997). Durch den Abbau des Pektins wird die Zellwandstruktur geschwächt, wodurch Cellulosen und Hemicellulosen durch weitere sekretierte Hydrolasen angreifbar werden (D'Ovidio *et al.*, 2004). Die als Abbauprodukt von Pektin entstehenden Oligogalacturonide (Cervone *et al.*, 1989) induzieren die Phosphorylierung von membranständigen Kinasen, die die weiteren Abwehrmechanismen einleiten (Ferrari *et al.*, 2013). Dabei scheint sich der Signaltransduktionsweg weitestgehend mit dem von *flg22*, dem N-Terminus des bakteriellen Flagellins, zu überlappen, wodurch es bspw. zur Akkumulation von Phytoalexinen, der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), sowie der Ablagerung von Callose kommt (Denoux *et al.*, 2008; Ferrari *et al.*, 2013).

#### **1.3.4 Callose**

Callose ist ein Polysaccharid aus linearen  $\beta$ -(1,3)-glykosidisch verknüpften Glucosemonomeren (Abbildung 1-4 A), bei dem teilweise auch einige  $\beta$ -(1,6)-Verzweigungen nachgewiesen werden konnten (Aspinall und Kessler, 1957; Bacic *et al.*, 2009). Das Polysaccharid lagert sich zu parallelen Ketten zusammen, die eine Tripelhelix bilden (Stone, 2001). Wie Cellulose wird Callose direkt an der Plasmamembran synthetisiert und in die Zellwand eingelagert (Aspinall und Kessler, 1957; Aist, 1976). Callosesynthasen sind vermutlich Membran-gebundene Multi-Enzymkomplexe mit mehreren Untereinheiten, die Uridindiphosphat-Glucose (UDP-Glucose) als Substrat nutzen (Verma und Hong, 2001; Brownfield *et al.*, 2009).

In *A. thaliana* wurden 12 putative Callosesynthasen (CalS oder *glucan synthase-like*, GSL) identifiziert (Richmond und Somerville, 2000; Hong *et al.*, 2001a). Anhand der phylogenetischen Verwandtschaft (Abbildung 1-4 B) konnte die AtGSL-Familie in 4 Untergruppen eingeteilt werden, wobei Mitglieder einer Untergruppe zum Teil redundante Funktionen übernehmen können, wie z. B. AtGSL1 und AtGSL5 während der Pollenentwicklung (Enns *et al.*, 2005; Chen und Kim, 2009). Wie in Abbildung 1-4 B auch dargestellt, zeigen die Callosesynthasen, bis auf *AtGSL1* und *AtGSL5*, eine auffällige Genstruktur mit 40 bis 50 Exons (Doblin *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001a). Im Durchschnitt codieren die Gene etwa 2000 Aminosäuren und gehören damit zu den größten bekannten

Polypeptiden in den Pflanzen (Verma und Hong, 2001). Verankert werden sie über 13 bis 19 Transmembrandomänen, die in einem N- und einem C-terminalen Cluster angeordnet sind und eine zentrale hydrophile Region begrenzen. Diese cytoplasmatische Region beinhaltet die katalytische Domäne, die wiederum in eine Bindedomäne für UDP-Glucose sowie eine Glycosyltransferase-Domäne unterteilt wird (Cui *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001a; Østergaard *et al.*, 2002; Brownfield *et al.*, 2009). Das Substrat UDP-Glucose wird vermutlich aus dem Cytoplasma von einer Sucrosesynthase zur Verfügung gestellt, deren Anlagerung an die Plasmamembran über Phosphorylierung reguliert wird (Amor *et al.*, 1995; Subbaiah und Sachs, 2001). Die Bindung von UDP-Glucose an die Callosesynthase wird über eine assoziierte UDP-Glucosetransferase (UGT) vermittelt (Hong *et al.*, 2001b; Verma, 2001). So konnten Hong (2001b;) im *Yeast Two-Hybrid*-System eine Interaktion von AtGSL6 mit UGT1 beobachten. Zusätzlich interagierte UGT1 mit Rop1, einem Rho-ähnlichen GTP-bindenden Protein, dass eventuell über UGT1 die Aktivität der Callosesynthasen reguliert. Bereits aus der Hefe ist bekannt, dass die  $\beta$ -(1,3)-Glucansynthase FKS durch die GTPase Rho1 reguliert wird (Mazur und Baginsky, 1996; Qadota *et al.*, 1996).



#### Abbildung 1-4: Pflanzliche Callose und Callosesynthasen.

(A) Callose besteht aus  $\beta$ -(1,3)-glykosidisch verknüpften Glucosemonomeren. Aus Chen und Kim (2009) (B) Phylogenetische Verwandtschaft der GSL Familie aus *A. thaliana*, sowie deren jeweilige Exon-Struktur. Die Proteinsequenzen wurden mit einem ClustalW Alignment erstellt und der Baum mittels des *Neighbor Joining* Algorithmus konstruiert. Maßstab: Mutationen pro Position.

Während der normalen Entwicklung der Pflanze wird Callose zu unterschiedlichen Zeitpunkten gebildet. In somatischen Zellen wird Callose während der Cytokinese an der entstehenden Zellplatte angehäuft und agiert vermutlich als eine Art Grundgerüst, in dem andere Zellwandpolysaccharide eingelagert werden können. Im Laufe der Zellteilung wird die Callose durch spezifische  $\beta$ -(1,3)-Glucanasen abgebaut und durch Cellulose ersetzt (Samuels *et al.*, 1995; Verma, 2001; Thiele *et al.*, 2009).

Auch in den Fortpflanzungsgeweben findet sich Callose. So umgibt eine Callooseschicht die Pollenmutterzellen, bis die Ausbildung der äußeren Wand des Pollenkorns, die Exine, abgeschlossen ist (Tucker *et al.*, 2001). Auch der Pollenschlauch ist während der Keimung und des Wachstums mit Callose ummantelt und bildet zusammen mit Cellulose den Großteil der Polysaccharide der inneren Pollenwand (Meikle *et al.*, 1991; Ferguson *et al.*, 1998; Bacic *et al.*, 2009).

Desweiteren ist Callose an der Regulation von Plasmakanälen, den Plasmodesmen, beteiligt. Die Zell-Zell-Verbindungen sind von einer Plasmamembran umgeben, von der aus Callose in den Apoplasten eingelagert werden kann. Dies führt zu einer Verengung über die der Molekülfluss durch den Plasmodesmus gesteuert wird (Stone, 2001; Levy und Epel, 2009).

Als eine Art Barriere wird Callose innerhalb weniger Minuten als Reaktion auf abiotischen und biotischen Stress gebildet (Hughes und Gunning, 1980; Nakashima *et al.*, 2003; Stone und Clarke, 1992). Pflanzen reagieren auf eine Reihe von Metallionen in phytotoxischen Konzentrationen mit der Bildung von Callose (Stass und Horst, 2009). Dabei sind die genauen Auslöser noch nicht geklärt. Es wird angenommen, dass die Ionen, besonders Polykationen wie  $Al^{3+}$  oder  $Mn^{2+}$ , die Integrität der Plasmamembran stören (Kauss *et al.*, 1990). Zusätzlich wird dabei häufig  $Ca^{2+}$ , das auf die meisten Calloosesynthesen stimulierend wirkt, aus der Vakuole oder den Mitochondrien freigesetzt, (Köhle *et al.*, 1985; Kauss und Jeblick, 1986b). Ein ähnlicher Mechanismus wird für Calloseablagerungen nach einer Verwundung oder als Pathogenantwort postuliert. An beiden Ereignissen ist in *A. thaliana* AtGSL5 (auch CalS12 oder PMR4, *powdery mildew resistant 4*, genannt) maßgeblich beteiligt, so dass ein *Knock-out* zu einem Ausbleiben

dieser stressinduzierten Calloseantworten führt (Jacobs *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2003).

Die Einlagerung von Callose in die Zellwand wird als Teil der basalen pflanzlichen Abwehr betrachtet (Stone und Clarke, 1992). Callose bildet dabei den Hauptbestandteil sogenannter Papillen, die sich an der Infektionsstelle unter den eindringende Hyphen bilden (Stone und Clarke, 1992; Koh *et al.*, 2005). Durch die Einlagerung von weiteren Komponenten in die Callosematrix, wie bspw. phenolische Verbindungen und ROS, bilden Papillen nicht nur eine mechanischen Barriere, sondern haben auch eine antimikrobielle Wirkung (Smart *et al.*, 1986; Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Nicholson und Hammerschmidt, 1992). Dabei wird die Bildung von Papillen nicht als Abwehrreaktion betrachtet, die das Pathogen komplett stoppen kann. Vielmehr vermutet man, dass sie der Pflanze Zeit verschaffen, um weitere Abwehrmechanismen zu initiieren, die mit einer Induktion der Genexpression verbunden sind (Stone und Clarke, 1992; Brown *et al.*, 1998; Hammond-Kosack und Jones, 1996). Neuste Studien konnten jedoch eine Funktion der Papillen als Penetrationsbarriere bestätigen (Ellinger *et al.*, 2013; Naumann *et al.*, 2013). Die Überexpression von AtGSL5 in *A. thaliana* resultierte in einer kompletten Penetrationsresistenz, sowohl gegenüber dem Nichtwirtspathogen *Blumeria graminis f. sp. hordei*, als auch gegenüber dem virulenten Pathogen *Golovinomyces cichoracearum*. Die Erhöhung der Resistenz konnte auf eine verstärkte frühe Calloseablagerung zurückgeführt werden, die die Penetrationshyphen komplett ausschließen.

Dementsprechend führt die Deletion von AtGSL5 zu einem Fehlen der stressinduzierten Calloseablagerungen. Trotzdem zeigen die Mutanten eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Mehltauinfektion (Jacobs *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2003). Zurückgeführt wurde die Resistenz in den infizierten *A. thaliana* Pflanzen auf eine Hyperaktivierung des Biosynthesewegs der Salicylsäure (Nishimura *et al.*, 2003). Auch scheint AtGSL5 in der *A. thaliana mlo2* (*mildew resistance locus O 2*) Mutante nicht für die beobachtete Resistenz gegenüber der Penetration benötigt zu werden (Consonni *et al.*, 2010). Demgegenüber führt eine Inhibierung der Callozesynthese in Gerste (*Hordeum vulgare*) zu einem erhöhten Penetrationserfolg (Bayles *et al.*, 1990; Zeyen *et al.*, 2002). Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch in Weizen und Hafer (Zeyen *et al.*, 2002), was darauf

hinweisen könnte, dass Calloseablagerungen in den Monokotyledonen eine wichtigere Rolle in der Abwehr von Pathogenen übernimmt als in dikotylen Pflanzen.

#### 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, in wieweit sich *B. distachyon* als Wirt für *F. graminearum* eignet. Erst kurz zuvor war *B. distachyon* als Modellsystem der Gräser vorgeschlagen worden, da es alle typischen und wichtigen Charakteristika eines Modellorganismus aufzeigt. Zudem ist es mit den Süßgräsern wesentlich näher verwandt als die dikotyle Pflanze *A. thaliana*. Aufgrund dieser Verwandtschaft sollte das Pflanzen-Pathosystem *B. distachyon* - *F. graminearum* mittels, in ihrem Infektionsverlauf bereits detailliert beschriebener, *F. graminearum*-Stämme, die definierte Mutationen aufweisen, analysiert und mit den bekannten Infektionsverläufen in Weizen und Gerste verglichen werden. Da die pflanzliche Zellwand die erste Barriere für den eindringenden Pilz darstellt und um die pflanzliche Seite der Interaktion näher zu charakterisieren, sollten mögliche Veränderungen betrachtet werden. Bestandteil dessen war zum Einen die Analyse der Zusammensetzung der pflanzlichen Zellwand anhand der zugrunde liegenden Zucker mittels Anionenaustausch-Chromatographie gekoppelt mit gepulster amperometrischer Detektion. Durch diese Methoden können, durch vorhergehende Aufreinigung der alkoholunlöslichen Bestandteile und Hydrolyse dieser zu Monosacchariden, spezifisch die Hemicellulosen analysiert werden. Ein weiterer Aspekt, war die Analyse möglicher Pathogen-induzierter Calloseablagerungen.

Callose wird nach abiotischem und biotischem Stress zwischen der Plasmamembran und der Zellwand gebildet. Dabei wird Callose in Papillen eingelagert, um das Penetrieren des Pathogen zu stoppen, bzw. zu verlangsamen, um der Pflanze Zeit zu für die Induktion von weiteren Abwehrmechanismen zu geben. Um die Rolle und die Wichtigkeit der Pathogen-induzierten Callozesynthesen in den Monokotyledonen näher zu betrachten, sollte die Callozesynthase AtGSL5 aus *A. thaliana* in *B. distachyon* transformiert und überexprimiert werden. Die transgenen Pflanzen sollten anschließend auf eine Veränderung der Pathogenantwort untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Identifizierung von Callozesynthesen aus *B. distachyon*, die funktionell homolog zu der Stress- und Pathogen-induzierten

Callosesynthase AtGSL5 aus *A. thaliana* sind. Die identifizierten Callosesynthasen sollten kloniert und zur weiteren Charakterisierung in *B. distachyon* transformiert werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Difco (Heidelberg), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Steinheim) und Th. Geyer (Berlin) im analytischen Reinheitsgrad bezogen. Verwendete Enzyme stammen von Fermentas (St. Leon Roth) und Promega (Mannheim).

### 2.2 Kits

**Tabelle 2-1: Verwendete Kits und deren Herkunft.**

Wenn nicht weiter erwähnt, erfolgte die Bearbeitung der Proben nach Herstellerangaben.

Anwendung	Bezeichnung	Herkunft
Isolation von Plasmid-DNA	High-Speed Plasmid Mini Kit	Avegene (über DNA Cloning Service, Hamburg)
Aufreinigung von PCR Produkten	Gel / PCR DNA Fragments Extraction Kit	Avegene
Isolation von genomischer DNA aus Pflanzen	Plant Genomics DNA mini Kit	Avegene
Isolation von RNA aus Pflanzen	innuPREP Plant RNA Kit	Analytik Jena (Jena)
Erststrang cDNA Synthese	Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Fermentas
Quantitative Real-Time PCR	LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche
Quantitative Real-Time PCR	LightCycler® 480 Probes Master	Roche
Quantifizierung des Mykotoxins DON	Ridascreen DON ELISA	R-Biopharm (Darmstadt)

### 2.3 Deoxyoligonukleotide und DNA-Vektoren

Folgende Deoxyoligonukleotide (Primer) wurden von der Firma VBC Biotech (Wien, Österreich) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Zur Erstellung der Primer wurde die Computersoftware *Clone Manager Professional 9* (Scientific & Educational

Software) genutzt. Dabei wurde wie in Van Pelt-Verkuil *et al.* (2008) beschrieben, auf eine Mindestlänge von 18 bp und einem GC-Gehalt von etwa 50 % zugunsten der Stabilität geachtet. Zusätzlich wurden die Primer auf Genspezifität durch einen Datenbankvergleich mittels BLAST (Altschul *et al.*, 1990) gegen das Genom von *B. distachyon* überprüft (<http://blast.brachypodium.org/>), sowie die Bildung möglicher Sekundärstrukturen ausgeschlossen.

**Tabelle 2-2: Verwendete Primer in 5'-3'-Orientierung, sowie Sonden des RealTime ready qPCR Assays (Roche Diagnostics, Mannheim).**

Primer- / Genname	Sequenz / Assay ID	Ziel / Lokus
AB09-Bar-fwd	GCACCATCGTCAACCACTACATC	Basta (PAT) Resistenz
AB10-Bar-rev	AAACCCACGTCATGCCAGTTC	Basta (PAT) Resistenz
AB49-FgTub-F2exp	GAAACTCCACCTCTATCCAG	$\beta$ -Tubulin aus Fg
AB50-FgTub-R2exp	CTTCTTCCTCGTCAATTCCAG	$\beta$ -Tubulin aus Fg
BdAct-3'exp	ATGAAAGATGGCTGGAAAAGGACT	bradi4g41850.1
BdAct-5'exp	GCTGGGCGTGACCTAACTGAC	bradi4g41850.1
BdUbi	7000047	bradi4g00660.1
BdGSL1	7000008	bradi1g51757.1
BdGSL2	7000029	bradi2g46250.1
BdGSL3	7000032	bradi2g50140.1
BdGSL4	7000024	bradi2g40460.1
BdGSL5	7000005	bradi1g47427.1
BdGSL6	7000046	bradi3g60790.1
BdGSL7	7000000	bradi1g29622.1
BdGSL8	7000014	bradi1g77247.1
BdGSL8	7000042	bradi3g09317.1
BdGSL10	7000010	bradi1g76617.1
BdGSL11	7000021	bradi2g40430.1

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Plasmide wurden von Christian A. Voigt zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2-3: Verwendete Plasmide.**

Plasmid	Merkmale	Referenz
pCambia3301	Vektor zur Pflanzentransformation mit Kan <sup>r</sup> für Bakterienanzucht, Hyg <sup>r</sup> zur Selektion transgener Pflanzen. Zwischen LB ( <i>left border</i> ) und RB ( <i>right border</i> ) des T-DNA Bereiches eine Basta <sup>r</sup> ( <i>pat</i> ), Promoter 35S aus <i>CaMV</i> für <i>GUS-ORF</i> und <i>nosPA</i> .	Broothaerts <i>et al.</i> , 2005
35S-GFP (Agro16)	Basierend auf pCambia3301, GUS-ORF ersetzt durch GFP.	unveröffentlicht
35S- <i>AtGSL5::GFP</i> (Agro4)	Wie 35S-GFP mit <i>AtGSL5-ORF</i> C-terminal fusioniert mit GFP.	Ellinger <i>et al.</i> , 2013

## 2.4 Medien, Puffer und Lösungen

Sämtliche Medien und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Ionenaustauscheranlage (Milli-Q-WaterSystem, Millipore) angesetzt und, soweit erforderlich, durch Autoklavieren oder bei hitzelabilen Substanzen durch Sterilfiltration (Flaschenfilter mit 0,22 µm Porengröße, Millipore) sterilisiert.

Selektionsmedien wurde nach Abkühlen auf maximal 50 °C Antibiotikum mit folgender Endkonzentration zugesetzt:

**Tabelle 2-4: Antibiotika und die eingesetzte Konzentration.**

Antibiotika	Konzentration
Carbenicillin	100 µg/mL
Gentamycin	50 µg/mL
Kanamycin	50 µg/mL
Rifampicin	100 µg/mL
Spectinomycin	50 µg/mL
Timentin	320 µg/mL
Zeocin	100 µg/mL

## 2.5 Mikroorganismen und Kulturbedingung

In der Tabelle 2-5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Mutanten von *Fusarium graminearum* Schwabe (telemorph: *Gibberella zeae* [Schwein] Petch) zusammengefasst.

**Tabelle 2-5: Verwendete Bakterien- und Pilzstämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL-1	Mit pTiBo542 Virulenz Plasmid	Lazo <i>et al.</i> , 1991
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	Mit pMP90RK Virulenz Plasmid	Koncz und Schell, 1986
<i>Escherichia. coli</i> One Shot® OmniMAX™ 2 T1 <sup>R</sup>	F' [proAB lacIq lacZΔM15 Tn10(TetR ) Δ(ccdAB)] mcrA Δ(mrr hsdRMS-mcrBC) Φ 80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD	Invitrogen
<i>Fusarium graminearum</i> Wildtyp	Stamm: 8/1	Miedaner <i>et al.</i> , 2000
<i>Fusarium graminearum</i> wt-GFP	Wie <i>F. graminearum</i> Wildtyp, mit <i>GFP-ORF</i> unter <i>N. crassa</i> Isocitratlyase Promoter ( <i>PCII</i> ). Selektion mittels Hygromycin- Phosphotransferase ( <i>HPH</i> ) fusioniert an den Tryptophan C Promoter aus <i>A. nidulans</i> ( <i>PTRPC</i> )	Jansen <i>et al.</i> , 2005
<i>Fusarium graminearum</i> Δ <i>tri5</i> -GFP	Wie <i>F. graminearum</i> Wildtyp, mit unterbrochenem <i>TRI5</i> Gen ( <i>Knock-out</i> ) und Hygromycin-Phosphotransferase ( <i>HPH</i> ) unter dem Glyceralaldehyde 3- phosphatdehydrogenase A Promoter aus <i>A.</i> <i>nidulans</i> ( <i>PGPDA</i> )	Jansen <i>et al.</i> , 2005
<i>Fusarium graminearum</i> Δ <i>fgl1</i> -GFP	Wie <i>F. graminearum</i> Δ <i>tri5</i> -GFP, mit unterbrochenem <i>FGL1</i> Gen ( <i>Knock-out</i> )	Voigt <i>et al.</i> , 2005
<i>Fusarium graminearum</i> Δ <i>gpmk1</i> -GFP	Wie <i>F. graminearum</i> Δ <i>tri5</i> -GFP, mit unterbrochenem <i>GPMK1</i> / <i>MAP1</i> Gen ( <i>Knock-out</i> )	Jenczmionka <i>et al.</i> , 2003 Salomon <i>et al.</i> , 2012
<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	Stamm UCSC1	

Die Anzucht der Bakterien erfolgte zunächst auf Agarplatten mit festem LB-Medium und geeignetem Antibiotikum zur Selektion. Ein Einzelklon wurde gepickt und in flüssigem LB-Medium bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 28 °C (*A. tumefaciens*) unter schütteln angezogen.

Für eine Plasmidisolierung wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mittels High-Speed Plasmid Mini Kit isoliert.

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Pilzmyzel wurden 200 Konidien in 50 mL flüssigem Kompletmedium angeimpft und 4 Tage bei 28°C und 150 rpm im Dunkeln inkubiert. Das Myzel wurde über einen Büchnertrichter und sterilem Filterpapier abfiltriert, mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen und in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

Um ungeschlechtlichen Sporen, sogenannte Konidien, von *F. graminearum* zur Pflanzeninokulation zu erhalten, wurden Agarplatten mit SNA-Minimalmedium mit Konidien angeimpft. Zur Selektion der Mutantenstämme wurde der SNA-Agar mit Hygromycin B (100 µg/mL) angereichert. Bei der *F. graminearum* Mutante  $\Delta$ *gpmk1*-GFP wurde zusätzlich eine sterile Zellophanfolie auf den Agar gelegt, um eine Konidienproduktion im Medium zu verhindern. Die Platten wurden bei 18 °C und 16 h Licht (sichtbares Licht, sowie langewelliges UV) und 8 h Dunkelheit 10 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Konidien mit 5 mL eiskaltem, sterilem Wasser vom Agar abgespült und durch ein 200 µm Wilson-Sieb von Myzel getrennt. Die Konidienzahl wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt, die Konzentration auf 100 - 200 Konidien/µL eingestellt und die Konidien bis zur Inokulation von *B. distachyon* bei -70 °C gelagert.

#### Kompletmedium nach Leach *et al.* (1982)

2 g/L	Hefeextrakt-Mix
10 g/L	Glucose
1g/L	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
0,2 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,25 g/L	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
0,15 g/L	NaCl
1 mL/L	MNS (Spurenelement-Lösung)

SNA (Synthetic Nutrient Poor Agar) nach Nirenberg (1981)

1 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 g/L	KNO <sub>3</sub>
0,5 g/L	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
0,5 g/L	KCl
0,2 g/L	Glucose
0,2 g/L	Saccharose
22 g/L	Agar

Die Anzucht von *G. cichoracearum* erfolgte wie von Stein *et al.* (2006) beschrieben.

## 2.6 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *Brachypodium distachyon* Inzuchtlinie Bd21 genutzt (Garvin, 2007). Zur Anzucht wurden die Samen von *B. distachyon* in einem Erde-Sand-Gemisch (2:1; Einheitserdewerk Uetersen, Germany, ED 73 + 10 % Sand) ausgebracht und für eine Woche bei 8 °C im Dunkeln stratifiziert. Anschließend erfolgte die Kultivierung in einer Pflanzenanzuchtskammer unter einem 20-Stunden Tag bei 30 % relativer Luftfeuchtigkeit.

Zur Selektion von transgenen Pflanzen wurden diese ab der T1-Generation 2 Wochen nach der Aussaat über einen Zeitraum von 2 Wochen mit dem Herbizid Basta (200 mg/L; Bayer CropScience, Monheim) besprüht.

Mit *F. graminearum* inokulierte *B. distachyon* wurden in eine Pflanzenkammer (Rumed, Rubarth Apparate GmbH, Laatzen, Type 1604+) überführt und zwei Wochen bei 21 °C, 65 % Luftfeuchtigkeit und einem Licht-Dunkelrhythmus von 16 h zu 8 h kultiviert.

### 2.6.1 Pflanzeninokulation mit *F. graminearum*

Weizenpflanzen werden zum Zeitpunkt der Anthese (Entwicklungszeitpunkt nach Zadok: 65 – 69; Zadoks *et al.*, 1974) inokuliert, da sie in dieser Entwicklungsperiode besonders anfällig für eine *F. graminearum* Infektion sind (Parry *et al.*, 1995). In *B. distachyon* wurde die Blütephase etwa sechs Wochen nach der Aussaat erreicht (Entwicklungsstadium nach der Skala der Bundesanstalt, des Bundessortenamt und der chemischen Industrie

(BBCH): 61 - 65, Hong *et al.*, 2011). Die Inokulation mit *F. graminearum* erfolgte am späten Nachmittag.

Für die Sprühinokulation wurden die Ähren mit 1 mL einer Konidiensuspension mit 100 Konidien/ $\mu$ L mit Hilfe eines kleinen Pumpzerstäubers besprüht.

Bei der Punktinokulation wurde etwa die dritte Blüte eines Ährchens, wenn die Staubblätter (Antheren) in dieser gut erkennbar waren, mit 1  $\mu$ L einer Konidiensuspension (40 Konidien) bzw. sterilem Wasser als Kontrolle inokuliert. Das Inokulat wurde dazu, ähnlich wie zur Weizeninokulation (modifiziert nach Pritsch *et al.*, 2001), mit einer Pipettenspitze vorsichtig zwischen Lemma und Palea gegeben.

Anschließend wurden bei beiden Inokulationsmethoden die Pflanzen 2 Tage in Plastiktüten inkubiert, um durch eine erhöhte Luftfeuchtigkeit die Keimung der Konidien, sowie die Primärinfektion zu fördern. Für die folgenden Untersuchungen wurden mindestens 5 Ährchen 7 bzw. 14 Tage nach der Inokulation (*days post inoculation*, dpi) geerntet, gepoolt, unter flüssigem Stickstoff gemörsert und in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Konnten die Ährchen nicht direkt weiterbehandelt werden, wurden sie bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Bewertung der Infektionsstärke**

Die visuelle Bewertung der Infektion von *B. distachyon* erfolgte 5, 7, 11 und abschließend 14 dpi; ab diesem Zeitpunkt war kein Fortschreiten der Infektion mehr erkennbar. Gleichzeitig war die Samenreifung abgeschlossen und der Übergang in die Seneszenzphase erfolgte (BBCH 89, Hong *et al.*, 2011). Die Infektionsstärke wurde mittels eines numerischen Punktesystems (*Disease Score*) bewertet (vgl. Abbildung 2-1). Dazu wurden die einzelnen Blüten eines Ährchens näher betrachtet. Bei einer leichten Infektion der Blüte, bei der nur sehr kleine nekrotische Stellen auf der Karyopse erkennbar waren (vgl. Abbildung 2-1 B), wurde die Infektion mit 0,1 bewertet. War die Infektion weiter fortgeschritten, so dass die Blüte bis zur Hälfte eine Bräunung zeigte (vgl. Abbildung 2-1 C), erhielt diese einen *Score* von 0,5. Eine starke Infektion der Blüte, bei der mehr als die Hälfte nekrotisch war, wurde mit einem *Disease Score* von 1,0 bewertet (vgl. Abbildung 2-1 D). Abschließend wurde für jede Blüte eines inokulierten Ährchens die Infektionsstärke ermittelt und der *Disease Score* für das gesamte Ährchen berechnet.



**Abbildung 2-1: Beispiel des Punktesystems (*Disease Score*) zur Bewertung der Infektionsstärke von *F. graminearum* auf *B. distachyon*.**

Die Infektion wurde 14 dpi bewertet. (A) Uninfizierte Blüte. (B) Schwache Infektion einer Blüte, bei der nur eine geringe Verbräunung erkennbar ist. *Disease Score* = 0,1. (C) Fortgeschrittene Infektion mit Nekrosen bis zur Hälfte der Blüte. Die Infektionsstärke wurde mit 0,5 bewertet. (D) Starke Infektion der Blüte, die mit einem *Disease Score* von 1,0 bewertet wurde. Anhand des aufsummierten *Disease Score* kann die Stärke der Infektion eines Ährchens beschrieben werden. L: Lemma; N: Nekrose; Maßstab: 2 mm

### 2.6.2 Erzeugung transgener Pflanzen

Der zur Erzeugung von transgenen *B. distachyon* Pflanzen benötigte DNA-Transfer wurde durch das Bodenbakterium *A. tumefaciens* vermittelt. Die eingesetzten binären Vektoren sind vom Ti-Plasmid abgeleitet und lassen sich sowohl in *E. coli* als auch *A. tumefaciens* propagieren. Zur Selektion in Prokaryoten codiert das Plasmid pCAMBIA für eine Kanamycinresistenz durch das *NPTII*-Gen. Innerhalb der *left*- und *rightborder* liegt das *BAR*-Gen für eine Phosphinothricinacetyl-Transferase (PAT) zur Selektion von transgenen Pflanzen mittels des nicht-selektiven Herbizids Basta.

Die zu transformierenden Konstrukte wurden zunächst *in vitro* erzeugt und in *E. coli* OmniMAX™ 2 T1<sup>R</sup> amplifiziert. Nach der Kontrolle der erfolgreichen Klonierung durch einen Restriktionsverdau und Sequenzierung wurde das Konstrukt in *A. tumefaciens* GV3101 mit dem Helferplasmid pMP90RK (Koncz und Schell, 1986) transformiert. Die Pflanzentransformation wurde nach Alves *et al.* (2009) durchgeführt und wird im Folgenden nur zusammenfassend dargestellt. Zunächst wurden etwa 7 Wochen nach der Aussaat

(BBCH 73 - 75, Hong *et al.*, 2011) von Pflanzen mit Bd21 Hintergrund unreife Embryonen aus den Karyopsen isoliert und auf Kallus-Induktionsmedium gegeben. Sich entwickelnde Sprossen wurden regelmäßig entfernt, um die Bildung von embryogenem Kallusgewebe zu fördern. Nach jeweils drei Wochen, zwei Wochen sowie einer Woche wurden die embryogenen Kalli geteilt und auf frisches Kallus-Induktionsmedium gegeben.

Von positiven *A. tumefaciens* Klonen wurde zunächst eine 4 mL Vorkultur mit LB-Medium und entsprechenden Antibiotika (100 µg/mL Rifampicin, 50 µg/mL Kanamycin, 50 µg/mL Gentamycin) angelegt. Nach 2-3 Tagen bei 28 °C wurden 200 µL der Vorkultur in eine 200 mL LB-Hauptkultur mit alleiniger Selektion auf das binäre Plasmid (50 µg/mL Gentamycin) überimpft. Nach weiteren 2 Tagen bei 28 °C wurde die Bakteriensuspension bei 5000 rpm für 30 min abzentrifugiert, in 10 mL MSB mit 45 mg/mL Acytosyringon durch Vortexen resuspendiert und für 1 h geschüttelt. Die Kalli wurden mit 15 mL *A. tumefaciens* Suspension mit einer OD<sub>λ 600nm</sub> von 1 bedeckt. Nach 5 Minuten wurde die Suspension abpipettiert, die Kalli auf sterilem Filterpapier kurz getrocknet und in Petrischalen überführt, die mit 750 µL MSB mit 45 mg/mL Acytosyringon befeuchteten Filterpapier ausgelegt waren. Die Ko-Kultivierung von embryogenen Kalli und *A. tumefaciens* erfolgte für 2 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zur Selektion der transgenen Bereiche wurden die Kalli 2-mal für 3 Wochen auf Selektionsmedium mit Basta gegeben. Das Selektionsmedium wurde mit Timentin angereichert, um das *A. tumefaciens* Wachstum zu inhibieren. Die Regeneration erfolgte zunächst, bis sich die ersten Sprossen mit Wurzeln gebildet hatten, auf Regenerationsmedium und anschließend auf Keimmedium. Kleine Pflanzen wurden in Erde überführt und in einer Pflanzenanzuchtskammer bei 22 °C und einem 20-Stunden Tag bis zur Samenreife weiterkultiviert. Zusätzlich zur Selektion wurden die transgenen Pflanzen per Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Konstrukt-spezifischen Oligonukleotiden genotypisiert, sowie mittels Southern-Blot die Anzahl der Integrationen bestimmt.

**Kallus-Induktionsmedium (CIM)**

4,3 g/L	MS-Salze
30 g/L	Saccharose
1 mL/L	Fe-EDTA Stammlösung (40 mg/mL)
1 mL/L	CuSO <sub>4</sub> (0,6 mg/mL)
2 g/L	Phytigel
250 µL/L	2,4-D (5 mg/mL)
500 µL/L	MS-Vitamine (103 mg/mL)
pH 5,8 mit 1 M KOH	

**MSB**

4,3 g/L	MS-Salze
10 g/L	Saccharose
10 g/L	Mannitol
1 mL/L	Fe-EDTA Stammlösung (40 mg/mL)
1 mL/L	CuSO <sub>4</sub> (0,6 mg/mL)
pH 5,5 mit 1 M KOH	

**Selektionsmedium (SM)**

4,3 g/L	MS-Salze
30 g/L	Saccharose
1 mL/L	Fe-EDTA Stammlösung (40 mg/mL)
1 mL/L	CuSO <sub>4</sub> (0,6 mg/mL)
2 g/L	Phytigel
500 µL/L	2,4-D (5 mg/mL)
1 mL/L	MS-Vitamine (103 mg/mL)
700 µL/L	Timentin (320 mg/mL)
300 µL/L	Basta (10mg/ml)
pH 5,8 mit 1 M KOH	

### Regenerationsmedium (RM)

4,3 g/L	MS-Salze
30 g/L	Saccharose
1 mL/L	Fe-EDTA Stammlösung (40 mg/mL)
1 mL/L	CuSO <sub>4</sub> (0,6 mg/mL)
2 g/L	Phytigel
1 mL/L	Kinetin (0,2 mg/mL)
1 mL/L	MS-Vitamine (103 mg/mL)
700 µL	Timentin (320 mg/mL)
300 µL	Basta (10mg/ml)
pH 5,8 mit 1 M KOH	

### Keimmedium (GM)

4,3 g/L	MS-Salze
30 g/L	Saccharose
1 mL/L	Fe-EDTA Stammlösung (40 mg/mL)
2 g/L	Phytigel
1 mL/L	Kinetin (0,2 mg/mL)
1 mL/L	MS-Vitamine (103 mg/mL)
700 µL	Timentin (320 mg/mL)
300 µL	Basta (10mg/ml)
pH 5,8 mit 1 M KOH	

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

Standardmethoden wurden von Sambrook und Russell, 2001) abgeleitet und werden nicht näher beschrieben. Für einige Methoden standen Kits zur Verfügung (s. 2.2), bei denen nach Herstellerprotokoll gearbeitet wurde.

### 2.7.1 RNA-Präparation

#### 2.7.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Für die Isolation von Gesamt-RNA wurden von 3 Wochen alten Pflanzen jeweils 2 Blätter geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Zellaufschluss erfolgte ebenfalls

Tiefgefroren in einer Schwingmühle (MM2000, Retsch, Haan) mit 2 Stahlkugeln bei einer Amplitude von 80.000 Hz/s für 2x 1 min. Das gemörserte Pflanzenmaterial wurde anschließend in 450 µL PL Puffer des innuPREP Plant RNA Kit aufgenommen. Die weitere Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Qualität der RNA wurde zum Einen über ein frisches Agarosegel, zum Anderen über die photometrische Konzentrationsbestimmung (NanoVue, GE Healthcare, Freiburg) ermittelt.

### **2.7.1.2 Probenvorbereitung für die quantitative *real time* PCR (qPCR)**

#### **DNase-Behandlung**

Zur Entfernung von Kontaminationen genomischer DNA wurde ein zusätzlicher DNA-Verdau mit DNase I (Fermentas) durchgeführt. Es wurden 0,2 bis 1 µg RNA in einem Volumen von 10 µL nach Herstellerangaben behandelt, wobei pro Experiment die RNA Mengen der einzelnen Proben aneinander angepasst wurden.

#### **Glycogenfällung**

Die RNA wurde anschließend spezifisch mit 0,05 µg/µL Glycogen (RNA-free, Fermentas) sowie 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (Fermentas) in 2,5 Volumen Ethanol (p.a., 96%) über Nacht bei -70 °C gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 10.000 U/min, 4 °C) und einem Waschschrift mit 70 %igen EtOH (p.a.) wurde das luftgetrocknete Pellet in 30 µL RNase freiem Wasser aufgenommen.

#### **Erststrang-cDNA-Synthese**

Als Matrize in der qPCR diente ein cDNA-Strang, der mittels des Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas) nach Herstellerangaben aus RNA synthetisiert wurde.

### **2.7.1.3 Quantitative *real time* PCR (qPCR)**

Die quantitative *real time* PCR (qPCR) ermöglicht die Bestimmung der Konzentration eines Gens. Zum Einen kann über ein Referenzgen ein Rückschluss auf die Expressionstärke eines Gens erfolgen, zum Anderen kann mittels einer Referenzmenge an DNA die absolute Konzentration in einer Probe bestimmt werden.

Der verwendete LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master enthält den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der in doppelsträngige DNA interkaliert und ein Signal erzeugt, das nach jedem Zyklus gemessen wird und proportional zur aktuellen DNA-Konzentration ist. Zum Abschluss der Reaktion wurde eine Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate durchgeführt, die auf unspezifische Produkte oder Primerdimere hinweisen kann. Die Quantifizierung erfolgte durch Triplikate mit folgendem Temperaturprofil im LightCycler<sup>®</sup> 480 und der zugehörigen Software (Roche):

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Pre-Inkubation	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	10 sec	} 45
Annealing	62 °C	10 sec	
Elongation	72 °C	10 sec	
Fluoreszenz Messung	Nach jedem Zyklus		
Schmelzkurve	58 °C - 95 °C	5 sec/ °C	1

Die Expressionsniveaus der *BdGSLs* wurde mittels vorgefertigter RealTime ready-Platten (RTR, Roche) analysiert. Bei den RTR-Platten handelt es sich um Mikrotiterplatten, die mit bereits optimierten Sonden und Primern bestückt sind, mit einer garantierten Primereffizienz von 100% ± 10% (Mauritz *et al.*, 2005). Für die qPCR wurden Mastermixe angesetzt, wobei für jedes *well* 5 µL cDNA mit 10 µL Nukleinsäure-freiem Wasser und 10 µL des LightCycler<sup>®</sup> 480 Probes Master versetzt wurde. Die Menge des *Housekeeping*-Gens Ubiquitin diente als endogene Referenz zur Normalisierung der Genexpression.

Die Quantifizierung erfolgte durch Duplikate mit folgendem Temperaturprofil im LightCycler<sup>®</sup> 480 und der zugehörigen Software (Roche):

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Pre-Inkubation	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	10 sec	} 45
Annealing	60 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 sec	
Fluoreszenz Messung	Nach jedem Zyklus		

Zur Datenauswertung wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft) eingesetzt. Die Berechnung der relativen Expressionsniveaus erfolgte dabei nach Pfaffl (2003).

### **2.7.2 DNA-Isolation**

Zur Isolation von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial wurde die Methode nach Pallotta *et al.* (2000) angewandt. Dazu wurde etwa 100 mg Blattmaterial von *B. distachon* mit 2 Stahlkugeln in flüssigem Stickstoff gefroren und in einer Schwingmühle (MM2000, Retsch) bei 60 - 100 Hz für drei Minuten aufgeschlossen. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde mit 800 µL Extraktionspuffer versetzt und gründlich gevortext. Nach der Zugabe von 800 µL Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurde das Homogenisat für zwei Minuten gevortext und für 3 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und die Nukleinsäure mit 800 µL Isopropanol, sowie 80 µL 3 M Natriumacetat pH 5,2 für 10 Minuten bei 10.000 rpm und 4 °C gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70 %igem EtOH (p.a.) wurde das Pellet luftgetrocknet, anschließend in 100 µL TE-Puffer, pH 8 mit 40 µg/mL RNase aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelöst.

#### DNA-Extraktionspuffer

1%	N-lauryl-sarcosin
100 mM	Tris HCl, pH 8
10 mM	EDTA, pH 8
100 mM	NaCl

### **2.7.3 Restriktionsverdau genomischer DNA**

Von der genomischen DNA, die in einem Southern-Blot eingesetzt wurde, wurden 20 µg über Nacht mit 2 Units pro µg DNA einer Typ II-Restriktionsendonuklease verdaut. Die Reaktion fand mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer unter dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms statt. Durch die Zugabe von 5 mM Spermidin (Fermentas) zum Reaktionsansatz sollte die Spezifität des Restriktionsenzym erhöht

werden. Die Reaktion erfolgte über Nacht, um einen vollständigen Verdau der genomischen DNA zu gewährleisten.

Anschließend wurde die verdaute DNA mittels 70 µL Isopropanol und 10 µL Natriumacetat (pH 5,2) für 30 Minuten bei -20 °C gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde das Pellet mit 70 %igem EtOH (p.a.) gewaschen, erneut zentrifugiert und das luftgetrocknete Pellet über Nacht in 30 µL TE aufgenommen.

#### **2.7.4 Southern-Blot**

Die Bestimmung der Kopienzahl des Transgens im Genom der transgenen *B. distachyon* Pflanzen erfolgte durch eine Southern-Blot-Hybridisierung. Dafür wurde genomische DNA aus *B. distachyon* isoliert (s. 2.7.2), mit einem geeignetem Enzym verdaut (s. 2.7.3) und durch ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt.

Die Southern-Blot-Hybridisierung erfolgte modifiziert nach den Angaben des *DIG Application Manuals* der Firma Roche. Die DNA wurde mittels Kapillartransfer auf eine *Hybond NX-Nylonmembran* (Amersham) übertragen und dort durch UV-Licht (UV-Crosslinker, Stratagene) fixiert. Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre überführt und 30 min in 20 mL vorgewärmter *DIG Easy Hyb*-Lösung bei einer sondenspezifischen Temperatur im Hybridisierungsöfen prähybridisiert. Die Berechnung der optimalen Prä- und Hybridisierungstemperatur erfolgte, wie im *DIG Application Manual* vorgegeben, anhand des GC-Gehalts und der Länge der Sonde. Die Sonde wurde für 10 min bei 100 °C denaturiert, anschließend auf Eis gekühlt und 30 mL vorgewärmter *DIG Easy Hyb*-Lösung zugesetzt. In diese Hybridisierungslösung wurde die Membran über Nacht weiter inkubiert.

Um mögliche nicht-homologe Bindungen von Sonde und Zielsequenz aufzubrechen und die unpassenden Sequenzen wegzuschwemmen, wurde die Membran nach der Hybridisierung zunächst 2x mit 200 mL *Low Stringency*-Puffer, dann 2x mit 50 mL vorgewärmten *High Stringency*-Puffer bei 68 °C gewaschen.

Für die Detektion wurde die Membran zunächst in 100 mL frischer *Blocking*-Lösung inkubiert. Der gegen Digoxigenin gerichtete, mit einer alkalischen Phosphatase konjugierte

Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche) wurde frisch 1:10.000 in *Blocking*-Lösung verdünnt und für 30 min auf die Membran gegeben. Nach erneuten Waschschrritten wurde als Substrat der alkalischen Phosphatase 500 µL 1:100 verdünntes CSPD (Roche) eingesetzt. Die erzeugte Chemilumineszenz konnte nach 30 min Exposition und Entwicklung (Compact 2, Protec) eines sensitiven Films (Amersham Hyperfilm ECL) detektiert werden.

## 2.8 Metabolitenanalyse

### 2.8.1 Bestimmung der Konzentration des Mykotoxins DON

Die Quantifizierung des Mykotoxins DON in den mit *F. graminearum* inokulierten Ährchen erfolgt durch den Ridascreen DON Test (R-Biopharma, Darmstadt). Dieser basiert auf einem kompetitiven Enzymimmunoassay (*Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), der auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht. Dafür sind die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen mit Fang-Antikörpern gegen einen Anti-Deoxynivalenol-Antikörper beschichten. Nach Zugabe der Probe konkurriert das darin enthaltene unmarkierte DON mit dem im Kit enthaltenen, enzymmarkierten DON um die Deoxynivalenol-Antikörper-Bindestellen. Gleichzeitig wird der Anti-Deoxynivalenol-Antikörper von den immobilisierten Fang-Antikörpern gebunden. Das nun gebundene Enzymkonjugat kann durch die Zugabe einer Substratlösung photometrisch nachgewiesen werden, wobei die Extinktion der Lösung umgekehrt proportional zur DON-Konzentration der Probe ist.

Zur Extraktion von DON aus dem homogenisierten und gefriergetrockneten Pflanzenmaterial (vgl. 2.6.1) wurden 25 mg in 250 µL (bzw. 50 mg in 500 µL) deionisiertem Wasser aufgenommen, 1 min gevortext und 5 min bei 300 rpm geschüttelt. Das Pflanzenmaterial wurde anschließend für 5 min abzentrifugiert und der Überstand, wenn möglich, so verdünnt, dass die DON-Konzentration der Probe innerhalb der Nachweisgrenzen des Tests lagen (zwischen 3,7 ppb und 33,3 ppb). Die Testdurchführung erfolgte anschließend nach Herstellerangaben. Zur photometrischen Bestimmung der Substratkonzentration wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im *Microplate Reader Synergy HT* (Biotek, Bad Friedrichshall) bestimmt.

Um die DON Menge in Relation zur Menge des Pilzmyzels ausdrücken zu können, wurde mittels qPCR (vgl. 2.7.1.3) die Menge an genomischer *F. graminearum* DNA in den untersuchten Pflanzenproben quantifiziert. Dazu wurde zunächst genomische DNA aus 5 mg, in Flüssigkultur angezogenem, Pilzmyzel isoliert (Plant Genomics DNA mini Kit, Avegene). Anschließend wurde die Menge am Haushaltsgen  $\beta$ -Tubulin pro eingesetztem mg Myzel in fünf Verdünnungstufen in einer qPCR bestimmt. Über spezifische Primer, die ausschließlich an  $\beta$ -Tubulin aus *F. graminearum* bindeten, konnte die Konzentration der DNA aus *F. graminearum* im Verhältnis zur Gesamt-DNA aus dem Pflanzenmaterial berechnet werden.

## **2.8.2 Zellwandanalyse**

Die Analyse von möglichen Zellwandveränderungen erfolgte durch die Bestimmung der Zusammensetzung der Hemicellulosen. Dafür wurden zunächst die alkoholunlöslichen Bestandteile der Zellwand isoliert. Anschließend wurden spezifisch die Hemicellulosen durch die Behandlung mit Trifluoressigsäure in Monosaccharide hydrolysiert, während die Cellulose nicht angegriffen wurde (De Ruiter und Burns, 1987). Die freigesetzten Monosaccharide wurden abschließend durch Anionenaustausch-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) aufgetrennt und detektiert.

### **2.8.2.1 Extraktion der alkoholunlöslichen Fraktion (AIR)**

Die Aufbereitung des Pflanzenmaterials für die Zellwandanalyse erfolgte nach Arora *et al.* (2010) indem zunächst die alkoholunlöslichen Bestandteile (*alcohol insoluble residue*, AIR) extrahiert wurden. Dafür wurden 20 mg des gemörserten und gefriergetrockneten Pflanzenmaterials (vgl. 2.6.1) mit 1 mL Ethanol (96%, tech.), sowie 2 Stahlkugeln versetzt, für 2x 5 min mit einer Frequenz von 30 Hz mechanisch zerkleinert (Retsch MM 400, Haan) und 15 min bei 100°C gekocht. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 70%igem Ethanol 10 mal gewaschen und über Nacht in einem Vakuumtrockner (Speed Vac Concentrator, Savant Instruments, Farmingdale, USA) getrocknet. Die in der alkoholunlöslichen Fraktion vorhandene Stärke wurde durch  $\alpha$ -Amylase (0.29 U/ 10 mg; Sigma-Aldrich; in Acetatpuffer (100 mM, pH 5.0)) für 1h bei 85°C, gefolgt von Amyloglucosidase (0.30

U/10 mg; Sigma-Aldrich; in Acetatpuffer (100 mM, pH 5.0) für 2h bei 50°C verdaut. Die Enzyme wurden durch 3 Vol Ethanol (70%) für 10 min deaktiviert und das Pellet nach einem Zentrifugationsschritt erneut gewaschen und getrocknet.

### **2.8.2.2 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung durch Anionenaustausch-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD)**

Die alkoholunlöslichen Zellwandbestandteile wurden für 1h bei 120°C durch Trifluoressigsäure (TFA, 2M) hydrolysiert. Das TFA wurde unter Vakuum verdampft. Um die Monosaccharide zu lösen wurde das Pellet in 1 mL deionisiertes Wasser aufgenommen und gevortext. 15 µL der Monosaccharide wurden erneut in 1 mL Wasser verdünnt und mittels HPAEC-PAD (*High Performance Anion Exchange Chromatography mit Pulsed Amperometric Detection*) an einem ICS-5000 (Dionex, USA), ausgestattet mit einem elektrochemischen Detektor und einer CarboPac PA 20 Säule (3× 150 mm, Dionex, USA) nach Øbro *et al.* (2004), detektiert. Als Standard wurde Fucose, Arabinose, Rhamnose, Galactose, Mannose, Xylose, Glucose, Glucuronsäure und Galacturonsäure (Sigma-Aldrich) eingesetzt.

### **2.8.3 Bestimmung der Callose-Konzentration**

Zum Zeitpunkt 3 dpi begann *F. graminearum* die Rachilla der inokulierten Blüte zu kolonisieren, um sich danach im restlichen Ährchen auszubreiten. Daher wurde die Callose-Konzentration ausschließlich in der Rachilla der inokulierten Blüte über eine mikroskopische Analyse bestimmt. Die Ährchen wurden längs entlang der Rachilla aufgeschnitten und die Callose durch Anilinblau (Biosupplies, Australien) angefärbt. Die Mikroskopie erfolgte durch ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop wie in 2.9.3 beschrieben, wobei für alle Aufnahmen vergleichbare Einstellungen gewählt wurden. Aufgenommen wurde die Rachilla über einen *Z-Stack* um Unebenheiten auszugleichen. Die einzelnen Schichten des *Z-Stacks* wurden mit der ZEN Software durch eine *Maximum Intensity Projection* zu einem Bild übereinander gelegt. Dieses Bild wurde in *Photoshop CS4* (Adobe, USA) in ein Schwarzweiß-Bild umgewandelt, wobei ausschließlich die Cyanwerte, die Callose repräsentierten, in Grauwerte übersetzt wurden. Anschließend

wurde durch das Schnellauswahlwerkzeug der Rachilla-Bereich kopiert, in dem die, durch *F. graminearum* induzierten, punktuellen Calloseablagerungen zu beobachten waren. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Auswahl des Bereichs in allen untersuchten Proben geachtet. Der Bereich wurde abschließend in die Software *GSA Image Analyser* (Gesellschaft für Softwareentwicklung und Analytik mbH, Rostock) analysiert, die es ermöglicht die Fläche eines Grauwertes in einem Bild als Pixel pro Gesamtbild zu bestimmen. Somit konnte die Callosekonzentration pro Rachilla bestimmt werden.

Die Callose-Konzentration in den inokulierten Ährchen zum Zeitpunkt 7 und 14 dpi wurde durch einen ELISA basierten Assay (Pattathil *et al.*, 2010) bestimmt. Dafür wurde die Callose aus 10 mg Pflanzenmaterials (vgl. 2.6.1) mit 400  $\mu$ L NaOH (1M) bei 80°C über 20 min extrahiert, mit NaOH (1M) erneut verdünnt und in eine Mikrotiterplatte (Costar 3598; Corning Life Sciences) pipettiert. Durch Verdunsten der Flüssigkeit (über Nacht bei 37°C) wurde die Callose an die Mikrotiterplatte gebunden. Nachdem die unspezifischen Bindungsstellen mit einer Blockierungslösung aus fettarmem Milchpulver blockiert wurden, diente ein gegen  $\beta$ -1,3-Glucan gerichteter, monoklonaler Antikörper (Biosupplies) in einer 1:2500 Verdünnung in Waschpuffer als primärer Antikörper. Nach einem Waschschrift wurde ein sekundärer Peroxidase-konjugierter Anti-Maus IgG-Antikörper (1:7500; Sigma) gebunden. Der Farbumsatz des Substrates *p*-Nitrophenylphosphat (1 mg/mL *p*-NPP, Sigma; in einem Diethanolaminpuffer mit  $MgCl_2$ ) durch die Peroxidase konnte durch eine Absorptionsmessung bei 405 nm im *Mikroplate Reader* nachgewiesen werden. Zur Berechnung der Callose-Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe des  $\beta$ -1,3-Glucans von *Euglena gracilis* (Sigma) mitgeführt.

#### Blockierungslösung

1%	Magermilchpulver
50 mM	Tris HCl, pH 7,6
100 mM	NaCl

## Waschpuffer

0,1%	Magermilchpulver
150 mM	NaCl
1 mL/L	Tween 20

## 2.9 Mikroskopische Analysen

Die Visualisierung der Infektion erfolgte mittels einer Kamera mit Makroobjektiv, Fluoreszenzbinokular und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM). Dazu wurden die inokulierten Ährchen entlang der Rachilla aufgeschnitten.

### 2.9.1 Kamera

Um die Infektionsstärke zu bewerten, wurden die inokulierten Ährchen mit einer, an einem Stativ befestigten, Kamera (D300s, Nikon, Japan) mit einem Makroobjektiv (Sigma, Japan) und der PC-Software Camera Control Pro (Nikon) aufgenommen.

### 2.9.2 Fluoreszenzbinokular

Für die Inokulation der Ährchen wurde *F. graminearum* Mutanten ausgewählt, die ein konstitutives GFP-Signal erzeugten, anhand dessen man den Infektionsverlauf verfolgen konnte. Sowohl Auflicht- als auch Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit dem Fluoreszenzmikroskop Nikon AZ100. Die GFP-Fluoreszenz wurde mittels des Epi-Fluoreszenzilluminator C-HGFI, sowie des B-2A Filters mit einer Extinktion von 450-490 nm visualisiert.

### 2.9.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Um ein noch detaillierteres Bild der Infektion zu erhalten, wurden die Callose in den inokulierten Ährchen mittels des Anilinblau Farbstoffs angefärbt und durch das konfokale Laserscanning-Mikroskops LSM 780 und der ZEN 2011 Software (Zeiss, Jena) analysiert. Die jeweilige genutzte Extinktion und Emission war anwendungsabhängig und kann der folgenden Tabelle entnommen werden.

**Tabelle 2-6. Extinktion- und Emissionswerte der genutzten Fluoreszenzproteine am CSLM.**

Fluoreszenzprotein	Extinktion (nm)	Emission (nm)
GFP	488	525 - 560
Anilin Blau (Callose)	405	464 – 505
Pflanzliche Autofluoreszenz	561	588 - 735

## 2.10 Statistische Analysen

Für sämtliche statistischen Analysen wurde das Statistikprogramm SPSS Statistics (IBM, Armonk, USA, Release 20.0.0) genutzt. Daten des *Disease Scores*, der DON-Konzentration, der Zusammensetzung der Monosaccharide und des Callosegehalts wurden anhand der Mittelwerte durch einen einfachen ANOVA-Test (*Analysis of Variance*) auf Signifikanz getestet. Zunächst wurde die Homogenität der Varianzen durch eine Levene-Statistik überprüft. Bei ungleichen Varianzen wurde die Signifikanz mittels Welch-Test ermittelt. Um die signifikanten Werte zu identifizieren, wurde ein geeigneter Dunnett Post-Hoc Test nachgeschaltet, abhängig von der Varianzgleichheit und der Anzahl der Stichproben.

### 3. ERGEBNISSE

Zunächst sollte untersucht werden, in wieweit sich *B. distachyon* als Modellorganismus für eine *F. graminearum* Infektion eignet. Dafür musste geklärt werden, ob *B. distachyon* als Wirt für *F. graminearum* dient und Krankheitssymptome hervorrufen kann. Um dies zu untersuchen wurden Ährchen von *B. distachyon* zum Einen sprühhinokuliert, zum Anderen wurden einzelne Blüten einer Ähre punktinokuliert, wobei das Pathosystem Weizen-*F. graminearum*, welches bereits gut charakterisiert ist, als Vorbild fungierte. Anschließend wurde die Ausbreitung des Pilzes und die Mykotoxinkonzentration innerhalb des inokulierten Ährchens betrachtet.

#### 3.1 *F. graminearum* Infektion auf *B. distachyon*

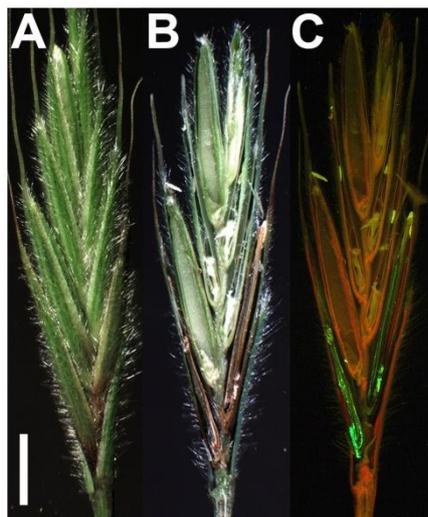
Bei einer Weizeninfektion mit Ährenfusarien können verschiedene Resistenztypen unterschieden werden (Schroeder und Christensen, 1963, Bai und Shaner, 2004). Die drei wichtigsten Resistenzen sind: a) Resistenz gegenüber der Primärinfektion (Resistenztyp I), d.h. ein erfolgreiches Eindringen wird verhindert; b) eine Resistenz gegenüber einer weiteren Ausbreitung innerhalb der Ähre (Resistenztyp II); sowie c) eine Resistenz gegenüber gebildeten Mykotoxinen (Resistenztyp III), z. B. indem die Bildung im Pilz inhibiert wird oder sie von der Pflanze abgebaut werden (Miller und Arnison, 1986).

Eine Unterscheidung der verschiedenen Resistenztypen erfolgt anhand verschiedener Inokulationsmethoden. So kann eine Resistenz von Typ I durch das Sprühen einer Sporensuspension über die blühende Ähre nachgewiesen werden, wohingegen ein Ausbreiten innerhalb der Ähre durch eine punktuelle Inokulation nachgewiesen werden kann (Schroeder und Christensen, 1963).

##### 3.1.1 *B. distachyon* kann von *F. graminearum* infiziert werden

Zunächst wurde *B. distachyon* mit einer Konidiensuspension des *F. graminearum* Wildtypisolats 8/1 besprüht, das zum besseren Nachweis einer erfolgreichen Infektion *in planta* das grün-fluoreszierende Protein (GFP) konstitutiv exprimierte. 14 dpi mit 1 mL einer Konidiensuspension (100 Konidien/ $\mu$ L) zeigten die Ährchen teilweise nekrotische

Bereiche. Die Infektionsstärke einzelner Ährchen schwankte stark. Sie reichte von fehlenden visuellen Krankheitssymptomen, bis zu mehreren verbräunten Blüten pro Ährchen wie in Abbildung 3-1 dargestellt. Aufgrund dieser Variabilität wurde keine statistische Auswertung vorgenommen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass in *B. distachyon* keine Typ I-Resistenz gegenüber dem *F. graminearum* Isolat vorliegt. Allerdings konnte eine Typ II-Resistenz mit dieser Inokulationsmethode nicht ausgeschlossen werden, da nicht eindeutig erkennbar war, ob die benachbarten Blüten eventuell von unabhängigen *F. graminearum*-Infektionen betroffen waren.



**Abbildung 3-1: Darstellung eines *B. distachyon*-Ährchens 14 Tage nach einer erfolgreichen Sprühinokulation mit *F. graminearum*.**

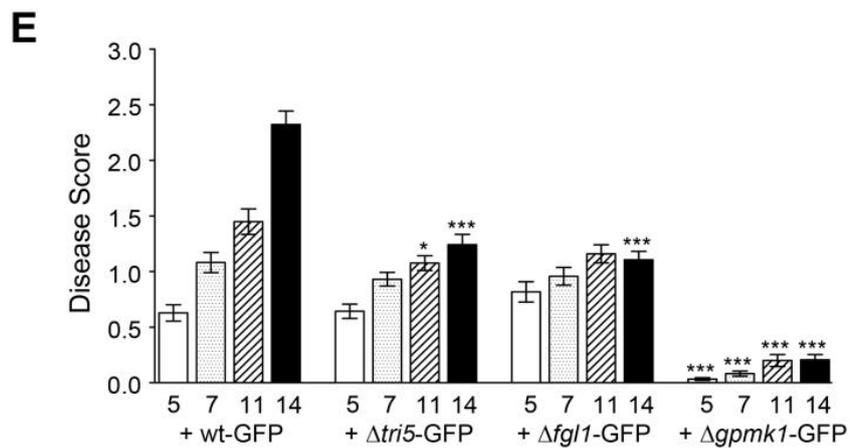
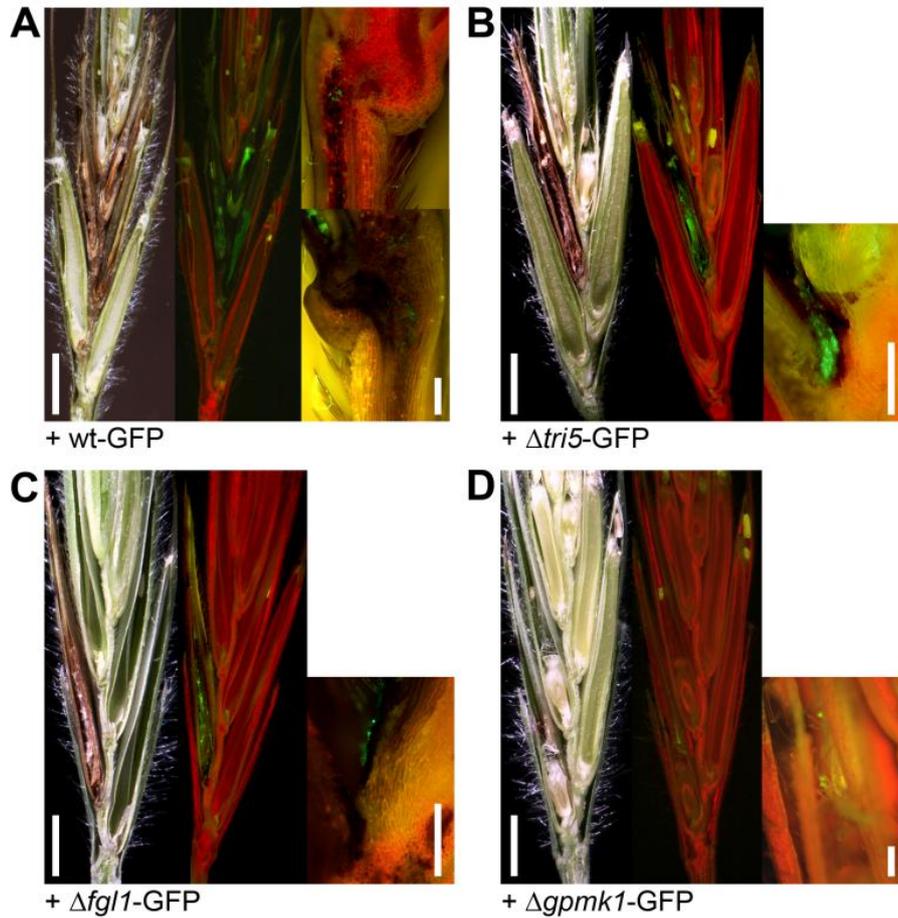
(A) Auflichtbild zeigt Verbräunungen mehrerer Blüten (B) Längsschnitt des gleichen Ährchens, wobei die verbräunten Blüten deutlich erkennbar sind. (C) Unter dem Fluoreszenzbild zeigen diese eine starke GFP-Expression des sich ausbreitenden Pilzes. Maßstab: 2 mm

### 3.1.2 *B. distachyon* zeigt unterschiedliche Resistenztypen nach Punktinokulation mit *F. graminearum*

Die Punktinokulation erfolgte ähnlich wie für Weizen beschrieben, wobei 40 Konidien in 1  $\mu$ L Suspension in eine einzelne Blüten von *B. distachyon* zum Zeitpunkt der Anthese (BBCH 61 - 65, Hong *et al.*, 2011) gegeben wurden. Zum Inokulieren wurden neben einer, dem Wildtyp ähnlichen, *F. graminearum*-Mutante unterschiedliche Deletionsmutanten genutzt, die in ihrem Infektionsverlauf im Weizen bereits charakterisiert waren. Um den

Infektionsprozess auch *in planta* verfolgen zu können, exprimierten alle inokulierten *F. graminearum*-Mutanten GFP konstitutiv. Der Infektionsverlauf wurde über einen Zeitraum von 14 dpi beobachtet, bis die Samenreife einsetzte (BBCH 85, Hong *et al.*, 2011) und keine weitere Zunahme der Infektion erkennbar war.

Die GFP exprimierende Wildtyp-Mutante (im weiteren wt-GFP, Jansen *et al.*, 2005) von *F. graminearum* zeigte innerhalb des Ährchens von *B. distachyon* eine starke Infektion und



Ausbreitung, gekennzeichnet durch ausgeprägte nekrotische Läsionen, die sich bereits 2 dpi ausbreiteten. Auffällig war, dass in den nekrotischen Bereichen des Ährchens die Ausbildung der Karyopsen unterblieb. Anhand der GFP-Fluoreszenz konnte die Ausbreitung des Pilzes von der inokulierten zur benachbarten Blüte durch eine Kolonisierung der Rachilla beobachtet werden (Abbildung 3-2 A). Dementsprechend nahm während der beobachteten 14 dpi der *Disease Score* der Infektion von 0,6 (5 dpi) konstant zu und erreichte abschließend einen Wert von 2,3 (Abbildung 3-2 E). Die für eine *F. graminearum* Infektion typische Ährenbleiche auf Weizen konnte bei *B. distachyon* partiell beobachtet werden.

Aus der Weizeninfektion mit *F. graminearum* ist bekannt, dass für eine erfolgreiche Ausbreitung des Pilzes vom inokulierten zum benachbarten Ährchen das Trichothecen-Mykotoxin DON erforderlich ist (Proctor *et al.*, 1995). Der *knock-out* der Trichodiensynthase TRI5, die das erste Enzym im Trichothecen-Biosyntheseweg kodiert, führt zum Abbruch der Synthese und beschränkt das Wachstums und die Ausbreitung von *F. graminearum* ausschließlich auf das inokulierte Ährchen. Der Pilz ist nicht mehr in der Lage die Rachis zu kolonisieren, was somit zu einer reduzierten Virulenz des Pilzes führt (Jansen *et al.*, 2005). In *B. distachyon* konnte die *knock-out*-Mutante  $\Delta tri5$ -GFP nur die inokulierte Blüte infizieren. Es konnten weder fluoreszierende Hyphen in benachbarten Blüten, noch eine Kolonisierung der Rachilla beobachtet werden (vgl. Abbildung 3-2 B). Der *Disease Score* der Infektion mit der  $\Delta tri5$ -GFP-Mutante (vgl. Abbildung 3-2 E) war zum ersten betrachteten Zeitpunkt (5 dpi) mit dem der wt-GFP vergleichbar (0,6). Im Verlauf der Infektion zeigte sie allerdings einen langsameren Anstieg und unterschied sich

**Abbildung 3-2: Infektionsverlauf in *F. graminearum* inokulierten *B. distachyon* Ährchen.**

(A-E) Auflichtbilder von Längsschnitten durch *B. distachyon* Ährchen 14 dpi stellen die sichtbaren nekrotischen Bereiche durch die Infektion dar. Fluoreszenzbilder zeigen die Ausbreitung der Pilzhypen innerhalb des Ährchens. (Maßstab: 2 mm) Die rechten Bildbereiche bilden jeweils die Rachilla der inokulierten Blüte ab. (Maßstab: 0,2 mm) (A) Mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz konnten die in die Rachilla, sowie in die benachbarten Blüten vordringenden Hyphen des wt-GFP Stammes visualisiert werden. (B, C) Die Hyphen der Deletionsmutante der Trichodiensynthase ( $\Delta tri5$ -GFP) und der sekretierten Lipase 1 ( $\Delta flg1$ -GFP) konnten die Rachilla nicht kolonisieren; die Infektion war auf die inokulierte Blüte beschränkt. (D) Die Inokulation mit dem *Knock-out* der apathogenen MAP-Kinase 1 ( $\Delta gpmk1$ -GFP) führte nur zu geringen nekrotischen Flecken in *B. distachyon*. (E) Der *Disease Score* 5, 7, 11, und 14 dpi stieg für die Infektion mit wt-GFP kontinuierlich an, während die Ausbreitung von  $\Delta tri5$ -GFP und  $\Delta flg1$ -GFP stoppte. Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts. Statistisch signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zum entsprechenden wt-GFP-Wert berechnet. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.005 gemäß ANOVA gefolgt von einem Dunnett Post-Hoc-Test.

11 dpi mit einem *Disease Score* von 1,1 bereits signifikant ( $P < 0,05$ ) von der wt-GFP Infektion (1,4). Entsprechend des visuellen Phänotyps erreichte die Infektion 14 dpi mit  $\Delta tri5$ -GFP eine bedeutend signifikante ( $P < 0,001$ ) Reduktion des *Disease Scores* auf 1,2.

Neben TRI5 benötigt *F. graminearum* für eine erfolgreiche, vollständige Infektion einen weiteren wirtsinduzierten Virulenzfaktor, die sekretierte Lipase FGL1 (Voigt *et al.*, 2005). Die Infektion mit  $\Delta flg1$ -GFP gestaltete sich ähnlich wie beim  $\Delta tri5$ -GFP. Nur die inokulierte Blüte zeigte nekrotische Symptome (Abbildung 3-2 B). In der Anfangsphase der Infektion verlief der *Disease Score* zur wt-GFP Infektion vergleichbar stark, blieb dann aber 11 dpi in der inokulierten Blüte stecken und erreichte 14 dpi einen signifikant reduzierten Wert von 1,1 (Abbildung 3-2 E).

Ein Defekt in der MAP Kinase MAP1/GPMK1 führt in einer Weizeninfektion zu einem apathogenen Infektionsverlauf (Jenczmionka *et al.*, 2003, Urban *et al.*, 2003). In *B. distachyon* konnte ebenfalls ein signifikant reduzierter Infektionsverlauf im Vergleich zum wt-GFP für alle Zeitpunkte beobachtet werden ( $P < 0,001$ ; Abbildung 3-2 E). Der visuelle Phänotyp der  $\Delta gpmk1$ -GFP Infektion war hauptsächlich durch kleine nekrotische Punkte am Lemma, sowie an der Palea direkt am Inokulationspunkt gekennzeichnet. Innerhalb der inokulierten Blüte waren einzig die Antheren, sowie die Narben verbräunt, an denen auch eine GFP-Fluoreszenz das Myzel kennzeichnete (vgl. Abbildung 3-2 D). Im Gegensatz zu den anderen applizierten *F. graminearum*-Mutanten konnte eine mit  $\Delta gpmk1$ -GFP inokulierte Blüte eine Karyopse ausbilden. Das restliche Ährchen zeigte keinerlei Krankheitssymptome.

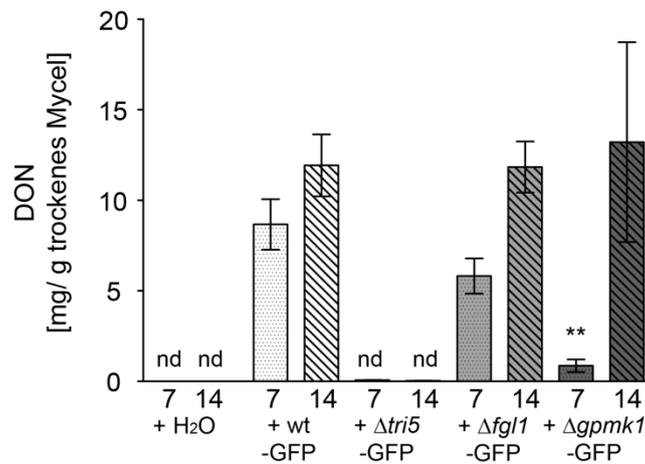
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die bereits aus der Weizeninfektion beschriebenen *F. graminearum*-Mutanten in *B. distachyon* einen vergleichbaren Infektionsverlauf nehmen und eine Unterscheidung zwischen den ersten beiden Resistenztypen auch in *B. distachyon* erfolgen kann.

### 3.1.3 Mykotoxinproduktion in *F. graminearum* inokulierten Ährchen

In Weizen führt eine Infektion mit *F. graminearum* zum Ernteausfall, da die Karyopsen nur unzureichend ausgebildet werden können (Bai und Shaner, 2004). Daneben produziert *F. graminearum* Mykotoxine, die im geernteten Getreidekorn gesundheitsschädlich auf

Mensch und Tier wirken können. Dabei ist Deoxynivalenol (DON) das am häufigsten in untersuchten Getreideproben nachweisbar Trichothecen (Nicholson, 2001).

Zum Nachweis einer DON-Produktion durch die verschiedenen *F. graminearum*-Mutanten, wurde die Konzentration des Mykotoxins 7 und 14 dpi in den *B. distachyon* Ährchen mittels kompetitiven ELISA bestimmt. Um die DON Menge relativ zur Pilzmenge bestimmen zu können, wurde mittels qPCR die *F. graminearum*-DNA Konzentration, basierend auf der Menge an  $\beta$ -Tubulin, ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-3 zusammengefasst.



**Abbildung 3-3: Mykotoxinakkumulation in *F. graminearum* inokulierten *B. distachyon* Ährchen.**

DON-Konzentration pro g Pilzmyzel 7 und 14 dpi. Auffällig ist die hohe DON-Konzentration bereits 7 dpi für wt-GFP. (nd: nicht nachweisbar). Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts. Statistisch signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zum entsprechenden wt-GFP-Wert berechnet. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.005 gemäß ANOVA gefolgt von einem Dunnett Post-Hoc-Test.

Wie erwartet lag die DON Konzentration in den mit Wasser inokulierten Kontrollproben unterhalb des Detektionslimits des ELISA (< 18 ppb bzw. 1  $\mu$ g DON/ kg Trockenmasse). Auch in  $\Delta tri5$ -GFP inokulierten Ährchen, einer Deletion des ersten Enzyms der Trichothecensynthese, konnte kein DON nachgewiesen werden. Dagegen zeigten Ährchen, die mit wt-GFP inokuliert wurden, bereits 7 dpi eine hohe DON Konzentration (8,7 mg DON/g Myzel). Der  $\Delta fgl1$ -GFP führte zu einer etwas geringeren DON-Menge von 5,8 mg DON/g Myzel. Besonders im Vergleich zum wt-GFP produzierte  $\Delta gpmk1$ -GFP 7 dpi nur sehr wenig DON (0,9 mg DON/g Myzel). Dagegen waren 14 dpi im Mittel annähernd die

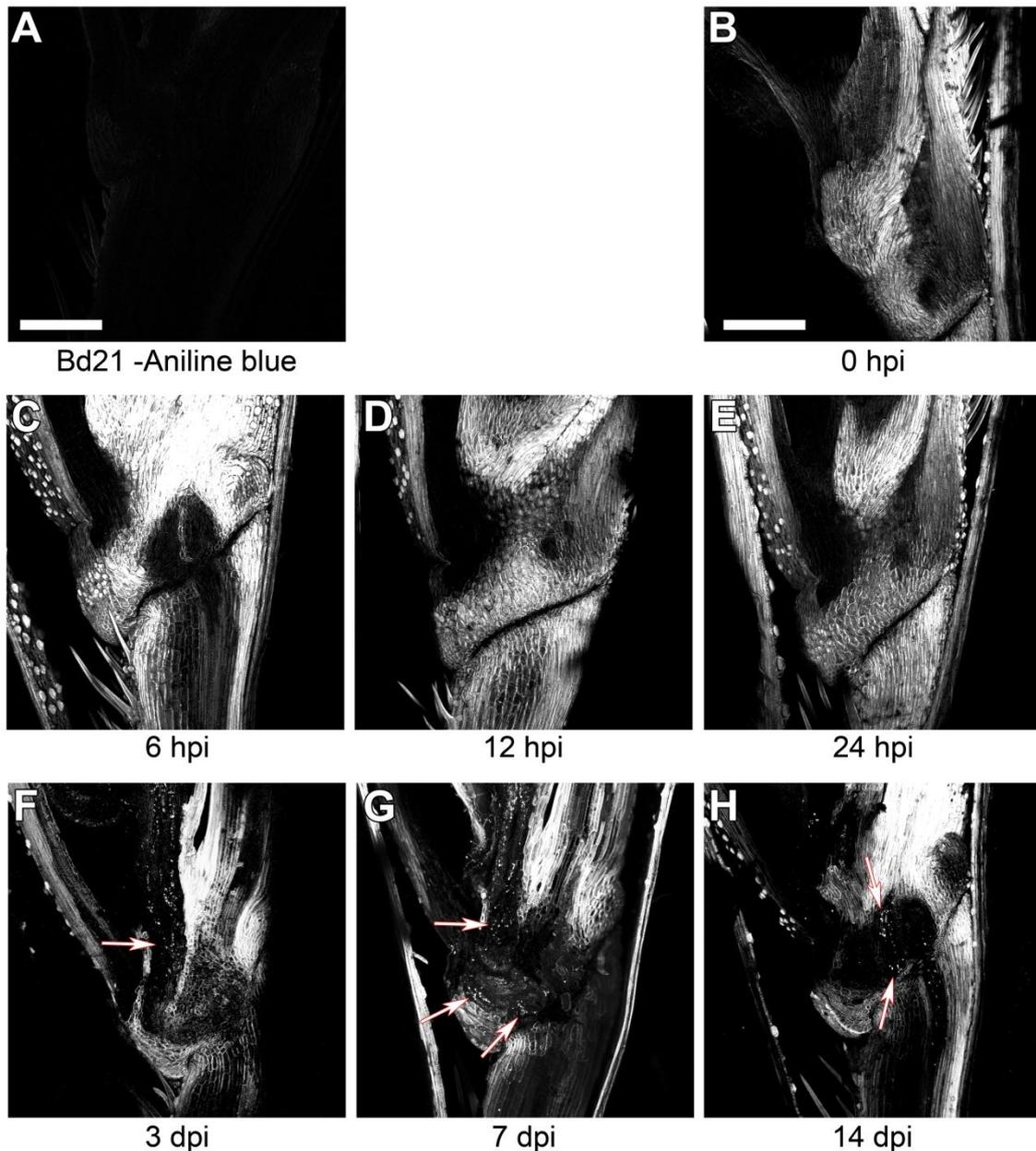
gleichen DON-Konzentrationen in den Mykotoxin produzierenden *F. graminearum* Mutanten nachweisbar (11,9, 11,8, bzw. 13,2 mg DON/g Myzel). Der große Fehler bei der Bestimmung der DON Menge in mit  $\Delta gpmk1$ -GFP inokulierten Ährchen ist wahrscheinlich auf die sehr geringe Myzelmenge zurückzuführen die bei nur 0,1 ‰ des Pflanzenmaterials lag, während das Myzel der anderen Isolate etwa 2 – 4 ‰ des Pflanzenmaterials ausmachten.

### 3.1.4 Induktion von Callose in *F. graminearum* infizierten *B. distachyon*

Nachdem gezeigt wurde das *F. graminearum* in der Lage ist *B. distachyon* auf ähnliche Weise zu infizieren wie Weizen, sollten nachfolgend mögliche Auswirkungen der Infektion auf pflanzlicher Ebene analysiert werden. Ein grundlegender Abwehrmechanismus gegen eindringende Pathogene ist die Auflagerung von Callose in die Zellwand. Es wurde gezeigt, dass die gebildeten Calloseablagerungen als mechanischer Schutz gegen eine Penetration wirken können (Ellinger *et al.*, 2013).

Um zu untersuchen, ob auch in *B. distachyon* nach der Infektion mit *F. graminearum* Callose gebildet wird, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion die Ährchen längs aufgeschnitten, die Callose mit Anilinblau angefärbt und unter einem konfokalen Mikroskop betrachtet. Das Ährchengewebe zeigte im Allgemeinen eine starke Fluoreszenz im Emissionbereich von Anilinblau (vgl. Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5). Da die Anilinblaufärbung sehr spezifisch Callose färbt (Evans *et al.*, 1984, Stone und Clarke, 1992), weist der starke „Hintergrund“ der Ähre auf eine allgemein hohe Callosekonzentration hin, wie sie auch schon für Weizen gezeigt werden konnte (Voigt *et al.*, 2006).

Zu den frühen Zeitpunkten der Infektion, bis 24 Stunden nach der Inokulation (*hours post inoculation*, hpi) konnten keine zusätzlichen Calloseablagerungen beobachtet werden, die in einen Zusammenhang mit der Infektion gebracht werden konnte (vgl. Abbildung 3-4 B - E). Wie in Abbildung 3-4 F ersichtlich, traten die ersten punktuellen Calloseablagerungen 3 dpi auf. Diese bildeten sich vorwiegend in der Rachilla, dem Übergangsbereich von der inokulierten Blüte zum Blütenstiel. Zu den späteren Zeitpunkten 7 und 14 dpi konnte auch im Bereich der Leitbündel im Blütenstiel Callose nachgewiesen werden (Abbildung 3-4 G - H).



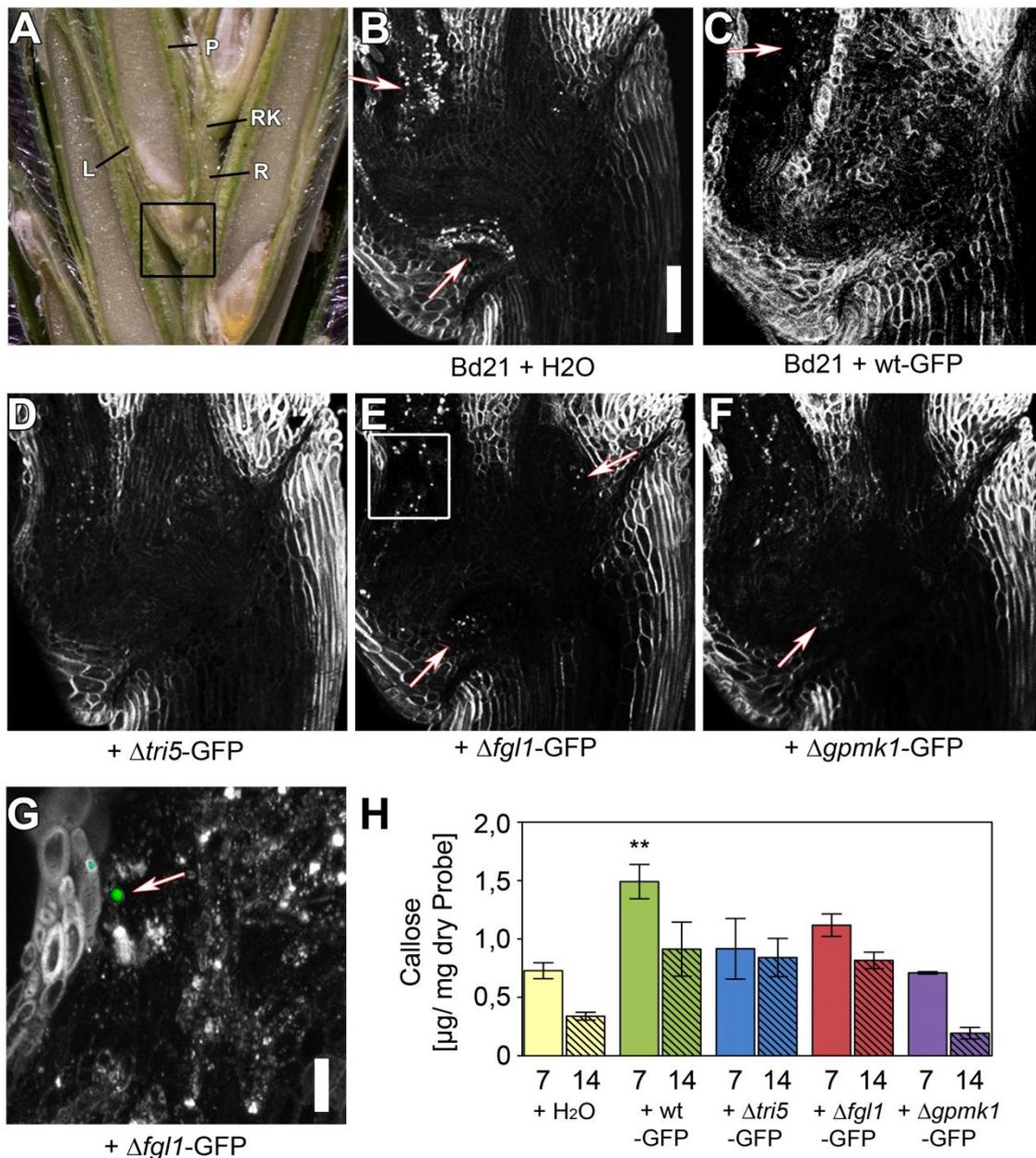
**Abbildung 3-4: Beispielhafte Calloseablagerungen in *F. graminearum* inokulierten *B. distachyon*-Ährchen zu verschiedenen Zeitpunkten.**

(A) Fluoreszenzaufnahme eines ungefärbten Längsschnitts durch ein uninfiziertes Ährchen von *B. distachyon* zeigt keine Autofluoreszenz. (B - H) Mit Anilinblau gefärbte Längsschnitte durch *B. distachyon* Ährchen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der wt-GFP Inokulation. Fluoreszenzbilder stellen den Übergang von der inokulierten Blüte in die Rachilla dar. Generell zeigen die Ähren von *B. distachyon* eine hohe Callosekonzentration, gekennzeichnet durch das hell fluoreszierende Gewebe. (B - E) Zum Zeitpunkt der Inokulation und bis 24 hpi konnten keine punktuellen Calloseablagerungen beobachtet werden. (F) Die früheste Akkumulation von Callose trat 3 dpi mit wt-GFP in der Übergangszone zur Rachilla auf. (G) Nach 7 Tagen konnte Callose in der gesamten Rachilla nachgewiesen werden. (H) Zum späten Zeitpunkt der wt-GFP Infektion (14dpi) nahmen die Calloseablagerungen wieder ab. Pfeile deuten auf punktuelle Calloseablagerungen. Maßstab: 0,2 mm

Neben dem wt-GFP wurden auch die verschiedenen *F. graminearum* Mutanten bezüglich einer Induktion der Calloseantwort betrachtet. Die inokulierten Ährchen wurden dazu mit einem spezifischen Anilinblau-Fluorochrom angefärbt. Die zusätzliche konstitutive GFP-Fluoreszenz der Hyphen ermöglichte es, das Vordringen des Pilzes innerhalb des Ährchens zu dokumentieren. In Abbildung 3-5 sind die mikroskopischen Ergebnisse zum Zeitpunkt 3 dpi zusammengefasst. Zudem erfolgte eine Quantifizierung der Callosemenge 7 und 14 dpi, da zu diesen Zeitpunkten keine visuellen Unterschiede hinsichtlich der Calloseakkumulation mehr erkennbar waren und diese weitestgehend der wt-GFP Infektion entsprachen (vgl. Abbildung 3-4 G – H).

Im Gegensatz zur wt-GFP Infektion zeigte die mit Wasser inokulierte Kontrolle vermehrt Calloseablagerungen. Diese fanden sich insbesondere in der Rachilla und in dem Übergang zur Blüte (vgl. Abbildung 3-5 B mit C) und scheinen somit am normalen Entwicklungsprozess beteiligt zu sein. Wie bei der wt-GFP Infektion waren kaum punktuelle Calloseablagerungen in den  $\Delta tri5$ -GFP und  $\Delta gpmk1$ -GFP inokulierten Ährchen detektierbar (vgl. Abbildung 3-5 D und F). Interessanterweise konnte in den mit  $\Delta flg1$ -GFP inokulierten Ährchen 3 dpi eine starke Calloseakkumulation beobachtet werden (vgl. Abbildung 3-5 E). Die Vergrößerung des betroffenen Gewebes demonstriert allerdings, dass Callose wahrscheinlich nicht im direkten Kontakt mit einer Hyphe gebildet wurde. (Abbildung 3-5 G, Pfeil).

Zu den späteren Zeitpunkten der Infektion (7 und 14 dpi) konnten keine Unterschiede bezüglich der Calloseablagerungen im Rachillaknoten des inokulierten Ährchens mehr beobachtet werden. Da sich zu diesen Zeitpunkten die wt-GFP Infektion bereits durch die Rachilla in gesamten Ährchen ausgebreitet hatte, erfolgte eine Quantifizierung der Callosemenge des Ährchens mittels eines ELISA. Dabei zeigte sich, dass 7 dpi eine wt-GFP Infektion zu signifikant erhöhten Callosemengen (1,49  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) im Vergleich zur Kontrolle (0,73  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ;  $P = 0,005$ ) führte. Dagegen wiesen Ährchen inokuliert mit  $\Delta tri5$ -GFP und  $\Delta flg1$ -GFP und  $\Delta gpmk1$ -GFP mit der Kontrolle vergleichbare Werte auf (0,92; 1,12; sowie 0,71  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Zum Ende der Infektion (14 dpi) konnte sowohl für den wt-GFP, als auch  $\Delta tri5$ -GFP und  $\Delta flg1$ -GFP leicht erhöhte Callosemengen im Vergleich zur Kontrolle und einer  $\Delta gpmk1$ -GFP Infektion gemessen werden.



**Abbildung 3-5: Calloseablagerungen in *B. distachyon*-Ährchen nach der Inokulation mit verschiedenen *F. graminearum* Mutanten.**

(A) Auflichtbild eines *B. distachyon* Ährchens: Rachilla (R, Ährchenachse), Rachillaknoten (RL) Lemma (L, Deckspelze), Palea (P, Vorspelze). Quadrat markiert die folgenden Ausschnitte. (B - F) Mit Anilinblau gefärbte Längsschnitte durch *B. distachyon* Ährchen 3 dpi. Fluoreszenzbilder stellen den Übergang von der inokulierten Blüte in die Rachilla dar. Pfeile deuten auf punktuelle Calloseablagerungen. Maßstab: 0,1 mm (B) In der Kontrolle konnten wenige punktuelle Calloseablagerungen beobachtet werden, die vermutlich für Entwicklungsprozesse wichtig sind. (C) Eine Infektion mit wt-GFP zeigt im Vergleich dazu 3 dpi weniger Calloseablagerungen. (D, F) Ähnliche Ergebnisse sind für die Infektionen mit  $\Delta tri5$ -GFP und  $\Delta gpmk1$ -GFP erkennbar. (E) Die Infektion mit  $\Delta flg1$ -GFP führt dagegen zu vermehrten punktuellen Calloseablagerungen in der Übergangszone zur Rachilla. (G) Vergrößerte Darstellung des markierten Ausschnitts der  $\Delta flg1$ -GFP Infektion aus (E). Die punktuellen Calloseablagerungen sind nicht ko-lokalisiert mit den grün fluoreszierenden Pilzhyphen (Pfeil). Maßstab: 20  $\mu$ m (H) Die Callosemenge 7 und 14 dpi wurde mittels eines ELISAs bestimmt. Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts. Statistisch signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zum entsprechenden H<sub>2</sub>O-Wert berechnet. \*\*  $P < 0,01$  gemäß ANOVA gefolgt von einem Dunnett Post-Hoc-Test.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass zu dem Zeitpunkt 3 dpi eine wt-GFP Infektion nur zu geringen Calloseablagerungen führt. Erst zu den späteren Zeitpunkten 7 und 14 dpi scheint diese induziert zu sein. Dagegen führt die Infektion mit  $\Delta flg1$ -GFP schon nach 3 Tagen zu einer auffälligen Calloseantwort in der Rachilla. Somit scheint auch bei der Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *F. graminearum* die Ablagerung von Callose eine Rolle zu spielen.

### 3.1.5 Differenzierte Zellwandveränderungen in *B. distachyon* durch *F. graminearum* Infektion

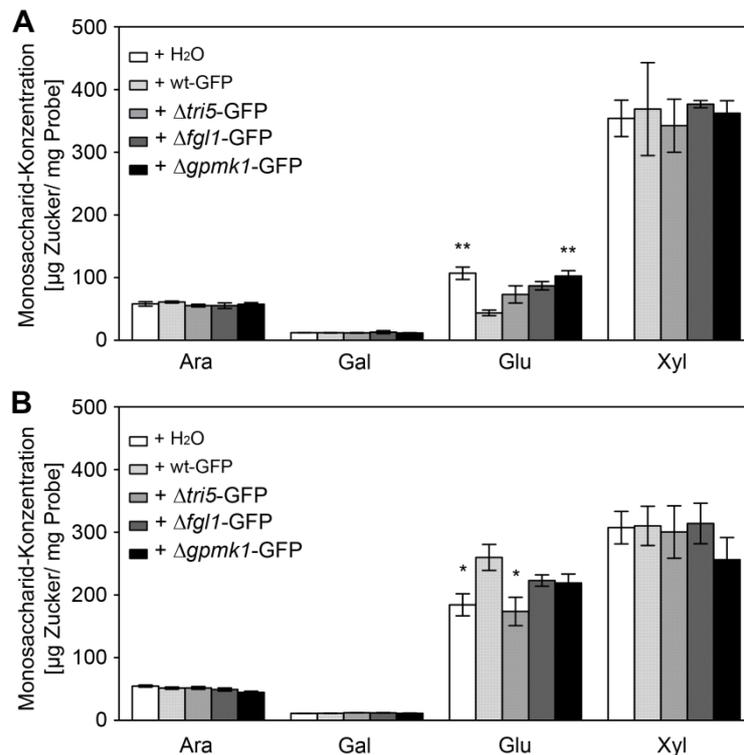
Da die pflanzliche Zellwand der erste Kontakt und somit Angriffspunkt für Pathogene ist, sollten mögliche Veränderungen der Zusammensetzung über die Analyse der nicht-cellulosehaltigen Monosaccharide bzw. Hemicellulosen gezeigt werden. Dazu wurden die inokulierten *B. distachyon* Ährchen 7 und 14 dpi geerntet, gemörsert und gefriergetrocknet. Anschließend wurden spezifisch die Bestandteile der Zellwand mittels AIR aufgereinigt, durch einen TFA-Verdau hydrolisiert und durch eine HPAEC-PAD detektiert.

In den Ährchen von *B. distachyon* konnte keine L-Fucose und D-Glucuronsäure detektiert werden. In sehr geringer Konzentration (unter 1%) und auch nur in einigen der biologischen Replikate konnte L-Rhamnose und D-Galacturonsäure nachgewiesen werden. Auf Grund der geringen Mengen ist anzunehmen, dass diese Monosaccharide in *B. distachyon* Ähren nur eine untergeordnete Rolle spielen und daher im Folgenden nicht weiter betrachtet werden.

Im Durchschnitt zeigten die untersuchten Ährchen unabhängig von dem Inokulat 7 dpi 57  $\mu\text{g}$  L-Arabinose, 12  $\mu\text{g}$  D-Galactose und 357  $\mu\text{g}$  D-Xylose pro mg Probe, was einer Konzentration von etwa 12%, 2% bzw. 71% entspricht. 14 dpi konnten etwa gleiche Mengen an L-Arabinose (51  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) und D-Galactose (11  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) detektiert werden. Die Menge an D-Xylose sank in dem betrachteten Zeitraum um 20% auf 299  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

Unterschiede zwischen den Inokulaten innerhalb eines Zeitpunktes konnten nur in den D-Glucosemengen festgestellt werden. So führte die Infektion des wt-GFP 7 dpi zu einem signifikant reduzierten Glucosewert (43  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) im Vergleich zur Wasserkontrolle (107  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ;  $P = 0,002$ ), was einer Reduktion von 41% entspricht. Auch zeigten die Infektionen mit  $\Delta tri5$ -GFP mit 73  $\mu\text{g}/\text{mg}$  und  $\Delta flg1$ -GFP mit 87  $\mu\text{g}/\text{mg}$  geringfügig niedrigere

Glucosewerte. Die Inokulation mit  $\Delta gpmk1$ -GFP führte zu keiner Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (103  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).



**Abbildung 3-6: Frühe und späte Zusammensetzung nicht-celluloser Monosaccharide der Zellwand in *F. graminearum* inokulierten *B. distachyon* Ährchen.**

Monosaccharide wurden mittels AIR und TFA aus den Ährchen aufgeschlossen und durch HPAEC-PAD analysiert. Die Zellwandzusammensetzung zeigte bezüglich Arabinose, Galactose und Xylose keine Veränderungen zwischen den unterschiedlich inokulierten Ährchen. (A) Die Glucosemenge ist 7 dpi in den wt-GFP inokulierten Ährchen am geringsten. (B) 14 dpi führt eine wt-GFP Infektion zu signifikant erhöhten Glucosemengen im Vergleich zur Wasser- und  $\Delta tri5$ -GFP-Inokulation; auch in den  $\Delta fgl1$ -GFP und  $\Delta gpmk1$ -GFP-inokulierten Ährchen ist ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Ara: L-Arabinose, Gal: Gal: D-Galactose, Glu: D-Glucose, Xyl: D-Xylose. Mittelwert aus mind. 2 biologischen Replikaten. Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts. Statistisch signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zum entsprechenden wt-GFP-Wert berechnet. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  gemäß ANOVA gefolgt von einem zweiseitigem Dunnett-T2 Post-Hoc-Test.

Im Vergleich zum Zeitpunkt 7 dpi- konnte in allen untersuchten Proben eine Erhöhung der Glucosemenge 14 dpi festgestellt werden. In der Wasserkontrolle stieg die Glucosemenge der Hemicellulosen um 72% auf 184  $\mu\text{g}/\text{mg}$  an. Eine ähnliche Menge konnte für  $\Delta tri5$ -GFP nachgewiesen (173  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Auffällig ist der starke Anstieg um fast 500% der Glucosemenge in wt-GFP inokulierten Ährchen (260  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Die Inokulation mit  $\Delta fgl1$ -

GFP, sowie  $\Delta gpmk1$ -GFP führte zu einer etwas niedrigeren Glucosemenge von 223 bzw. 211  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

Betrachtet man die Ergebnisse des 14 dpi Zeitpunktes, führte die Infektion mit der *F. graminearum*  $\Delta tri5$ -GFP Mutante zu keiner zusätzlichen Erhöhung der Glucosemenge, während für die anderen *F. graminearum* Isolate ein Anstieg im Vergleich zur Wasser Inokulation zu verzeichnen war. Besonders auffällig war die wt-GFP Infektion, die eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle, sowie zum  $\Delta tri5$ -GFP beinhaltet ( $P = 0,02$  bzw.  $P = 0,023$ ). Bemerkenswert ist dies, da der  $\Delta tri5$ -GFP als einziges der untersuchten Isolate nicht in der Lage ist das Mykotoxin DON zu produzieren. Aufgrund dessen wurde die These postuliert, dass DON möglicherweise die beschriebenen Zellwandveränderung induzieren haben könnte.

### **3.2 Behandlung von *B. distachyon* mit DON**

Um zu untersuchen ob der Anstieg der Glucosemenge innerhalb der Zellwandbestandteile durch DON induziert wurde, wurden verschiedene Konzentrationen von DON (1ppb – 500 ppm), wie bereits für die *F. graminearum* Infektion beschrieben, punktinokuliert. Analog zu *F. graminearum* Infektion wurden die Ährchen 7 und 14 dpi geerntet und für die HPAEC-PAD vorbereitet.

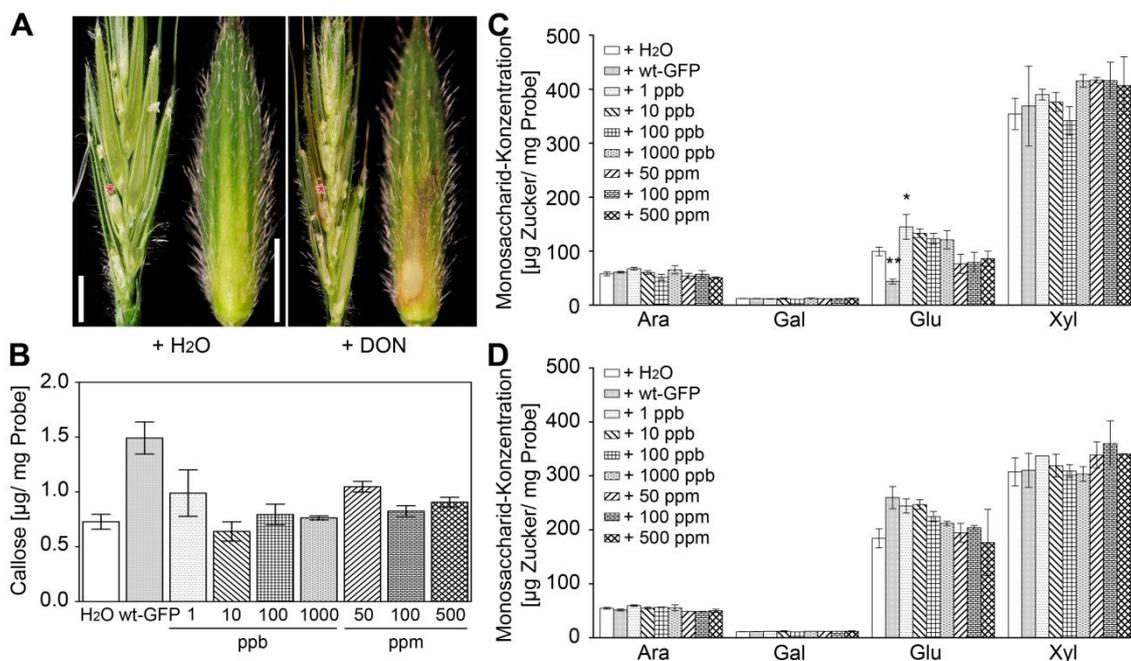
#### **3.2.1 Hohe DON Konzentrationen wirken nekrotisch**

Bereits 7 dpi konnten von Nekrosen umgebene, chlorotische Bereiche an den Blüten, die mit hohen DON Konzentrationen (500 ppm) inokuliert waren, beobachtet werden. Diese fanden sich hauptsächlich an dem Bereich der Lemma, der mit DON in Kontakt kam. Blüten, die mit niedrigeren Konzentrationen behandelt wurden, zeigten zu diesem Zeitpunkt noch keine Veränderungen zur Kontrolle. Nach 14 Tagen traten auch in Konzentrationen ab 50 ppm Läsionen an der Blüte auf. In Abbildung 3-7 A sind die visuellen Symptome der höchsten DON Konzentration auf die Blüte 14 dpi dargestellt. Auf der Lemma zeigten sich starke Nekrosen, die einen chlorotischen Bereich umgaben. Läsionen konnten auch auf der Palea beobachtet werden. Auffällig war, dass die Stärke der Läsionen mit steigender DON Konzentration ebenfalls zunahm. Dementsprechend konnten

für die niedrigen DON Konzentrationen von 1 ppb bis 10 ppm keine visuellen Auswirkungen während des betrachteten Zeitraums beobachten werden.

### 3.2.2 DON induzierte Zellwandveränderungen in niedriger Konzentration

Um zu überprüfen, ob die beschriebenen Veränderungen der Zellwand auf DON zurückzuführen sind, wurden die oben beschriebenen, mit DON inokulierten Ährchen nach 7 und 14 Tagen geerntet und mittels HPAEC-PAD analysiert.



**Abbildung 3-7: Auswirkungen einer Inokulation mit DON auf *B. distachyon* Ährchen.** (A) Auflichtbilder von Längsschnitten durch *B. distachyon* Ährchen 14 dpi stellen die sichtbaren Läsionen durch DON (500 ppm) im Vergleich zur wasserinokulierten Kontrolle dar. Sternchen: markiert die inokulierte Blüte. Maßstab: 2 mm Die rechten Bildbereiche zeigen jeweils die Lemma der inokulierte Blüte. Maßstab: 0,2 mm (B) Die Applikation von DON induziert keine Calloseablagerungen 7 dpi. (C, D) Zusammensetzung nicht-celluloser Monosaccharide der Zellwand in *B. distachyon* Ährchen 7 und 14 Tage nach DON Inokulation. Monosaccharide wurden mittels AIR und TFA aus den Ährchen aufgeschlossen und durch HPAEC-PAD analysiert. Die Zellwandzusammensetzung zeigte bezüglich Arabinose, Galactose und Xylose keine Veränderungen zwischen den unterschiedlich inokulierten Ährchen. (C) Niedrige DON Konzentrationen ( $\leq 1000$  ppb) führen abhängig von der Konzentration zum Anstieg der Glucose. (D) 14 dpi führt eine wt-GFP Infektion zu erhöhten Glucosemengen im Vergleich zur Wasserkontrolle. Ähnlich hohe Glucosewerte wurden für niedrige DON Konzentrationen detektiert; mit steigender DON Konzentration erfolgt eine Abnahme der Glucosemenge. Ara: L-Arabinose, Gal: Gal: D-Galactose, Glu: D-Glucose, Xyl: D-Xylose. Mittelwert aus mind. 2 biologischen Replikaten. Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts. Statistisch signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zum entsprechenden Wasserkontrolle berechnet. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  gemäß ANOVA gefolgt von einem zweiseitigem Dunnett-T2 Post-Hoc-Test.

Bereits 7 dpi konnte in den mit niedrigen DON Konzentrationen inokulierten Ährchen eine Erhöhung der Glucosewerte beobachtet werden (vgl. Abbildung 3-7 B). Besonders für die niedrigste inokulierte DON Konzentration von 1 ppb konnte die höchste Induktion an Callose beobachtet werden. Diese lag mit 145 µg/mg signifikant ( $P = 0,048$ ) über der wasserinokulierten Probe. Mit steigender DON Konzentration sank der Glucosewert. Die höheren Konzentrationen (ab 50 ppm) zeigten dagegen eine mittlere Glucosemenge von etwa 80 µg/mg.

Auch 14 dpi zeigten die Ährchen, die mit niedrigen DON Konzentrationen inokuliert wurden, einen erhöhten Glucosewert (Abbildung 3-7 C). Dieser lag mit 244 µg/mg knapp unter dem Glucosewert der wt-GFP Infektion (260 µg/mg). Ebenfalls zeigte sich wieder die Tendenz, dass mit höherer DON Konzentration weniger Glucose nachweisbar war und die hohen Konzentrationen eher dem Glucosewert der wasserinokulierten Ährchen entsprach.

Da auch Callose eine Stress-, bzw. Pathogen-induzierte Zellwandveränderung darstellt, wurden die Callosemenge in den DON inokulierten Ährchen 7 und 14 dpi mittels ELISA bestimmt. Obwohl 7 Tage nach der DON Applikation teilweise eine Erhöhung der Glucosewerte beobachtet werden konnte, konnten hinsichtlich der Callosemenge keine Unterschiede im Vergleich zur Wasserinokulation festgestellt werden.

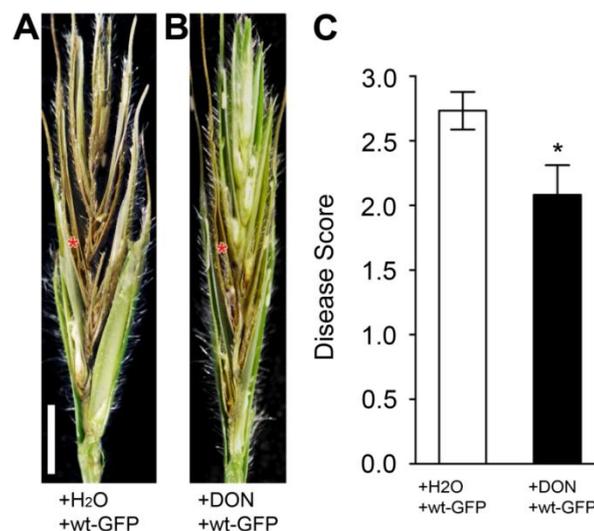
Somit konnte gezeigt werden, dass die Inokulation von DON in sehr niedrigen Konzentrationen zu einer Veränderung der Zellwandzusammensetzung führt und diese vergleichbar ist mit einer wt-GFP Infektion, die Calloseakkumulation davon aber nicht betroffen ist.

### **3.2.3 Resistenzhöhung durch Vorbehandlung mit DON**

Die Inokulation von DON hat bereits 7 dpi zu einer spezifischen Zellwandveränderung in *B. distachyon* geführt. Ob diese Modifikationen auch eine Auswirkung auf den Infektionsverlauf haben, sollte im Folgenden geklärt werden. Dazu wurde 7 Tage vor der Anthese eine wässrige DON-Lösung mit einer Konzentration von 1000 ppb auf die *B. distachyon* Ährchen gesprüht. Zum Zeitpunkt der Anthese wurden die Ährchen wie zuvor beschrieben mit dem *F. graminearum* wt-GFP Stamm inokuliert und 14 dpi analysiert.

Insgesamt konnte für die Kontrolle, die nur mit Wasser besprüht wurde, eine sehr starke wt-GFP Infektion beobachtet werden (vgl. Abbildung 3-7 A), was sich in dem hohen *Disease Score* von 2,7 widerspiegelt. Dies könnte eventuell auf die erhöhte Luftfeuchtigkeit durch das Sprühen der wässrigen Lösung zurückzuführen sein.

Die zuvor mit DON behandelten Ährchen zeigten einen schwächeren Infektionsverlauf im Vergleich zur Wasserbehandlung (Abbildung 3-7). Die statistische Auswertung ergab dementsprechend eine signifikante Reduktion des *Disease Scores* um 23% auf 2,1 ( $P = 0,016$ ).



**Abbildung 3-8: Auswirkung einer Vorbehandlung mit DON auf die *F. graminearum* Infektion.** (A) 7 Tag vor der Anthese wurden *B. distachyon* Ähren mit einer DON Lösung (1000 ppb), bzw. Wasser zur Kontrolle, besprüht. Zur Anthese wurde die markierte Blüte (Stern) mit wt-GFP inokuliert. Auflichtbilder von Längsschnitten durch die Ährchen 14 dpi stellen die sichtbaren nekrotischen Bereiche der Infektion dar. Die mit DON vorbehandelten Ährchen zeigen insgesamt einen schwächeren Infektionsverlauf als der starke Verlauf der Kontrollbehandlung. (Maßstab: 2 mm) (B) Die schwächere Infektion 14 dpi zeigt sich auch in dem *Disease Score*, der durch die DON-Vorbehandlung signifikant reduziert ist. Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts. Statistisch signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zur Wasserkontrolle berechnet. \*  $P < 0.05$  gemäß Student t-Test.

### 3.3 Integration der Callosesynthase AtGSL5 in *B. distachyon*

Eine der ersten Abwehrmechanismen in Pflanzen ist die Bildung von Zellwandauflagerung in sogenannten Papillen. Diese bestehen hauptsächlich aus Callose, die durch membranständige Callosesynthasen synthetisiert wird (Verma und Hong, 2001). Für eine

Pathogen- und allgemein Stress-induzierte Calloseantwort ist die Callosesynthase AtGSL5 aus *A. thaliana* wichtig (Jacobs *et al.*, 2003, Nishimura *et al.*, 2003). In *A. thaliana* konnte vor kurzem gezeigt werden, dass eine Überexpression von AtGSL5 zu vermehrten Calloseablagerungen nach einer Mehltauinfektion führt und gleichzeitig konnte eine verstärkten Resistenz gegen das Eindringen des Mehltaus beobachtet werden (Ellinger *et al.*, 2013).

### 3.3.1 Erzeugung transgener *B. distachyon* Pflanzen

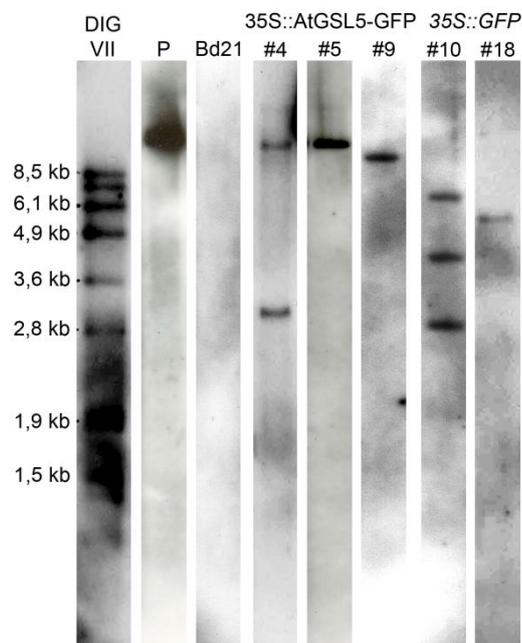
Da die Auflagerung von Callose ein universeller Abwehrmechanismus gegenüber eindringenden Pathogenen ist, sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine Überexpression der Callosesynthase auch in einer monokotylen Pflanze wie *B. distachyon* zu einer Erhöhung der Resistenz führt. Dazu wurde der binäre Vektor pCambia-35S::*AtGSL5-GFP* über *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation in *B. distachyon* übertragen. In dem Vektor befindet sich ein Fusionskonstrukt aus der cDNA von AtGSL5 und GFP, unter der Kontrolle des 35S-Promoters aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus. Als Kontrolle wurde der Vektor mit einem 35S::*GFP* unter gleichen Bedingungen transformiert. Zur Selektion in der Pflanze trug der in die Pflanzen übertragene Bereich des Vektors, die T-DNA, das Resistenzgen BAR/PAT gegen das Totalherbizid Basta, wodurch eine nachträgliche Selektion durch Sprühen von Basta jeder Zeit ermöglicht wurde.

### 3.3.2 Bestätigung der Integration des Transgens

Die erfolgreiche Transformation der *B. distachyon* Pflanzen wurde zunächst durch ein Sprühen mit dem Totalherbizid Basta bestätigt. Aus den überlebenden Pflanzen wurde genomische DNA isoliert und das Transgen mittels PCR bestätigt. Da durch eine PCR nur eine qualitative Aussage möglich ist, also ob die T-DNA erfolgreich integriert wurde oder nicht, folgte ein Southern-Blot, bei dem auch eine Aussage über die Anzahl der Integrationen im Genom getroffen werden kann. Zusätzlich können Pflanzenlinien identifiziert werden, bei denen es zu unabhängigen Transformationsereignissen gekommen ist.

In Abbildung 3-9 sind die Ergebnisse für drei 35S::*AtGSL5-GFP* Linien und zwei Kontrollen (35S::*GFP*) dargestellt. Wie erwartet konnte für den Wildtyp kein Transgen

nachgewiesen werden. Dagegen zeigten alle untersuchten Pflanzenlinien, die den Selektionsprozess überlebt hatten, eine oder mehrere Integrationen des Transgens in die genomische DNA. Aufgrund der mehrfachen Integrationen in zwei der untersuchten Pflanzenlinien wurden für weitergehende Untersuchungen nur die *35S::AtGSL5-GFP* Linien #5 und #9, sowie die *35S::GFP* Linie #18 genutzt. Die unterschiedlichen Bandengrößen in diesen Linien lassen vermuten, dass es sich um unabhängige Transformationsereignisse und daher auch um unterschiedliche Integrationen im jeweiligen Genom handelt. Somit ist es unwahrscheinlich, dass ein beobachteter Phänotyp in den unabhängigen Linien auf den Integrationsort zurückgeführt werden kann.



**Abbildung 3-9: Integrationsmuster der erfolgreich transformierten Pflanzenlinien.**

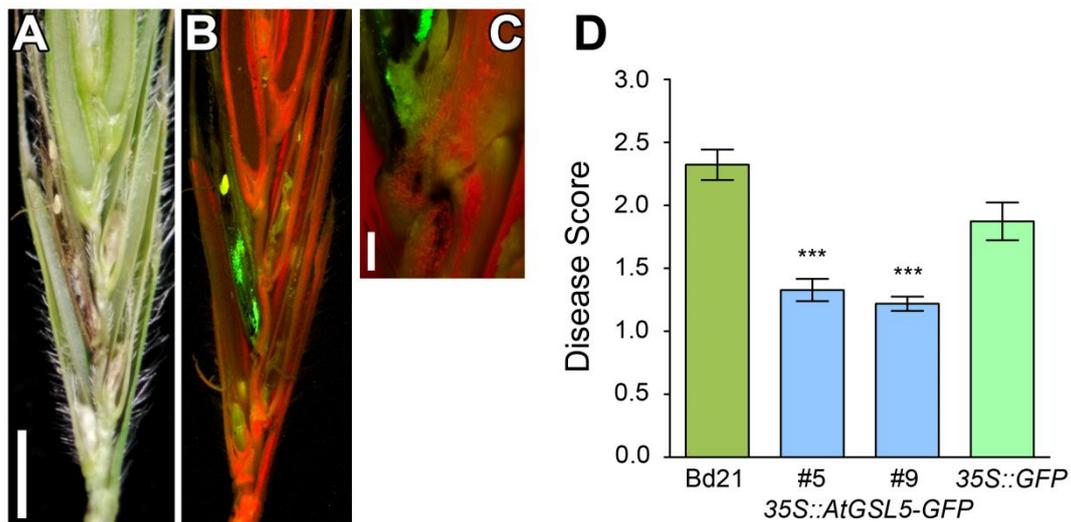
Zusammengestellte Übersicht über verschiedene Southern Blots auf verdaute genomische DNA von Wildtyp (Bd21) und transgenen Pflanzenlinien. Die verwendete Sonde hybridisierte spezifisch mit dem *BAR/PAT* Gen. Marker: DIG-labeled DNA Molecular Weight Marker VII (Roche), P: positiv Kontrolle, Plasmid pCambia *35S::AtGSL5-GFP*

Es konnten keine auffälligen phänotypischen Unterschiede in den verschiedenen transgenen Pflanzenlinien im Vergleich zum Wildtyp *B. distachyon* beobachtet werden.

### 3.3.3 Integration von AtGSL5 in *B. distachyon* führt zur Erhöhung der Resistent gegenüber *F. graminearum*

In *A. thaliana* führt die Überexpression von AtGSL5 zu einer erhöhten Resistenz gegen den biotrophen Mehltau *Golovinomyces cichoracearum* (Ellinger *et al.*, 2013). Wie in 3.1.4 beschrieben wurde, scheinen auch bei der Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *F. graminearum* Calloseablagerungen eine Rolle zu spielen. Ob eine Integration der Callosesynthese in *B. distachyon* zu vermehrten Calloseablagerungen und zu einer erhöhten Resistenz führt, sollte durch Infektionsstudien mit *F. graminearum* analysiert werden. Dazu wurden die unabhängigen Linien ab der dritten Generation nach der Transformation (T3-Generation), wie bereits für den Wildtyp Bd21 beschrieben, mit dem *F. graminearum* wt-GFP Isolat punktinokuliert (vgl. 2.6.1). Die T3-Generation wurde gewählt, da ab dieser Generation die Pflanzen homozygot vorlagen. Um mögliche Schwankungen in den Wachstumsbedingungen auszugleichen, die möglicherweise zu Unterschieden in der Infektion führen könnten, wurden jeweils Wildtyp-Pflanzen, die Kontrolllinie, sowie eine *35S::AtGSL5-GFP*-Linie in einen Topf ausgesät.

Wie in Abbildung 3-10 D ersichtlich führte, die zusätzliche Callosesynthese in den inokulierten Pflanzenlinien zu einem um 40% niedrigeren *Disease Score* (1,2 bis 1,4;  $P \leq 0,001$ ) im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Die Infektion blieb meist beschränkt auf die inokulierte Blüte (vgl. Abbildung 3-10 A-C), wie schon für die  $\Delta tri5-GFP$  und  $\Delta fgl1-GFP$  Infektion beschrieben. Dagegen zeigte die ebenfalls inokulierte Kontrolllinie *35S::GFP* zwar eine etwas schwächere Infektion (1,8), die aber nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Wildtyp war.

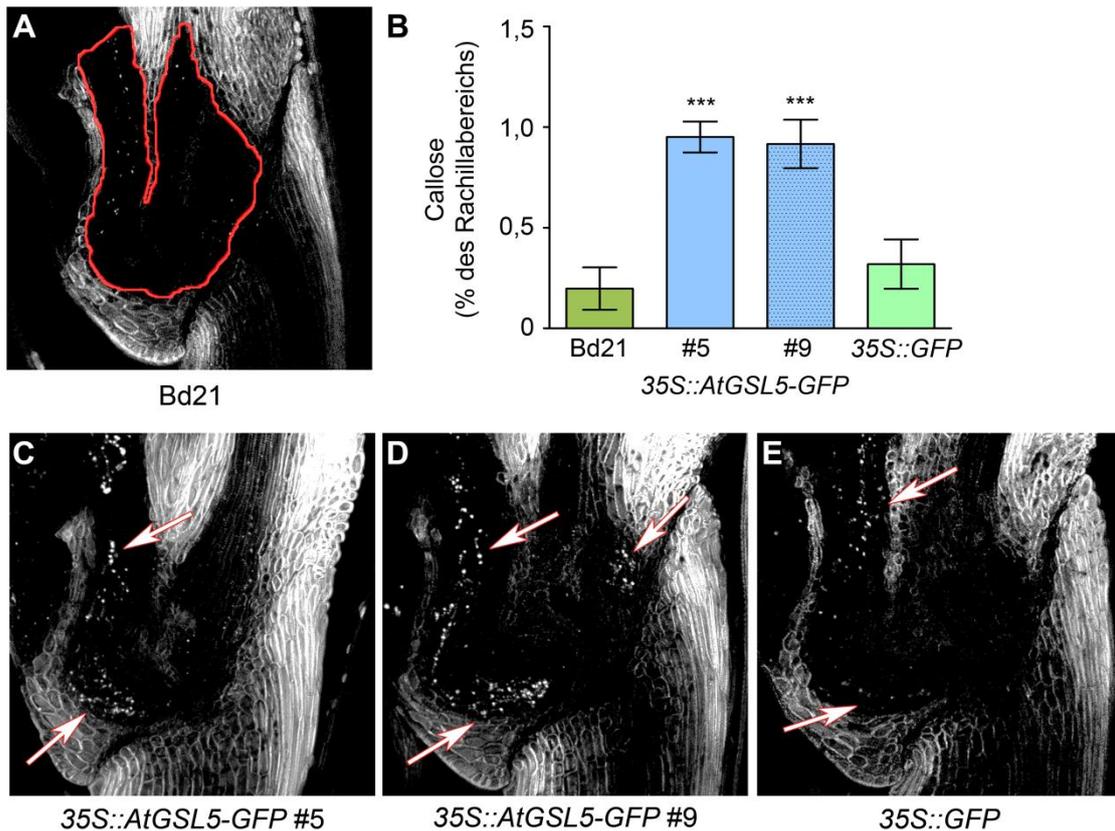


**Abbildung 3-10: Darstellung der reduzierten Infektion mit *F. graminearum* 14 dpi in transgenen *35S::AtGSL5-GFP*-Linien.**

(A) Auflichtbild eines Längsschnitts durch ein *35S::AtGSL5-GFP* Ährchen 14 dpi. Nekrotischen Bereiche durch die wt-GFP Infektion beschränken sich ausschließlich auf die inokulierte Blüte. Maßstab: 2 mm (B - C) Auch Fluoreszenzbilder zeigen keine Ausbreitung der Pilzhyphen innerhalb des Ährchens. (C) Nahaufnahme aus (B) zeigt die Rachilla der inokulierten Blüte in der keine Pilzhyphen nachweisbar waren (Maßstab: 0,2 mm) (D) Die zwei unabhängigen *35S::AtGSL5-GFP*-Linien zeigen einen signifikant reduzierten *Disease score* 14 dpi durch wt-GFP im Vergleich zum *B. distachyon* Wildtyp Bd21. Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts. Statistisch signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zum entsprechenden wt-GFP-Wert berechnet. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$  gemäß ANOVA gefolgt von einem Dunnett Post-Hoc-Test.

### 3.3.4 Callosegehalt in *F. graminearum*-inokulierten Ährchen

Die *F. graminearum* Infektion in den *35S::AtGSL5-GFP* Linien war weitestgehend auf die inokulierte Blüte beschränkt, während sie sich in der Wildtyppflanze durch die Rachilla in die benachbarten Blüten ausbreiten konnte. Auch eine Infektion mit den *F. graminearum* Deletionsmutanten führte zu einem Steckenbleiben des Pilzes. Bei der Infektion mit  $\Delta fgl1$ -GFP konnten 3 dpi vermehrte Calloseablagerungen in der Rachilla beobachtet werden. Auch in den *35S::AtGSL5-GFP*-Linien konnten die, bereits oben beschriebenen, (vgl. 3.1.4), punktuellen Calloseablagerungen beobachtet werden.



**Abbildung 3-11: Überexpression von AtGSL5 führt zu vermehrten Calloseablagerungen in der Rachilla der inokulierten Blüte 3 dpi mit *F. graminearum* wt-GFP.**

(A, C – E) Längsschnitte durch *B. distachyon* Ährchen 3 dpi mit *F. graminearum* wt-GFP, mit Anilinblau angefärbt. (A) In der Rachilla des Wildtyps sind kaum punktuelle Calloseablagerungen zu erkennen. Rot umrandet ist der Bereich, der zur Bestimmung der prozentualen Callosemenge (B) herangezogen wurde. (B) Die Quantifizierung der Calloseablagerungen innerhalb der Rachilla zeigte eine erhöhte Callosemenge für 35S::AtGSL5-GFP Linien. Als Grundlage der Berechnung dienten mindestens 9 Bilder von inokulierten Ärchen der jeweiligen Linien. (C, D) In der Rachilla der 35S::AtGSL5-GFP Pflanzen traten vermehrt punktuelle Calloseablagerungen (Pfeile) auf, während die Kontrolllinie dem Wildtyp entsprach (E). Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts. Statistisch signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zur Wildtyppflanze Bd21 berechnet. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.005 gemäß ANOVA gefolgt von einem Dunnett Post-Hoc-Test.

Während der wt-GFP-Infektion konnten in den Wildtyppflanzen nur geringe, induzierte Calloseablagerungen beobachtet werden. Eine Quantifizierung der in Abbildung 3-10 markierten Bereiche ergab im Durchschnitt eine Callosekonzentration von 0,02% pro Rachilla. Die 35S::GFP Kontrolllinie zeigte ebenfalls nur wenige Calloseablagerungen, die 0,03% der Rachilla ausmachten. Bei beiden untersuchten 35S::AtGSL5-GFP Linien konnten dagegen Calloseablagerungen 0,1% bzw. 0,09% in der Rachilla beobachtet werden, was einer Steigerung um mehr als 300% entspricht.

### **3.4 Callosesynthesen in *B. distachyon***

Bisher konnte gezeigt werden, dass eine Integration der bereits gut charakterisierten Callosesynthase AtGSL5 in *B. distachyon* zu einer Erhöhung der Resistenz gegenüber *F. graminearum* führt (vgl. 3.3.3). Dabei kommt es auch zu einer vermehrten Calloseablagerung. Da auch in Wildtyppflanzen im Laufe der Infektion Calloseablagerungen beobachtet wurden (vgl. Abbildung 3-4), kann man annehmen, dass auch in *B. distachyon* Callosesynthesen bei einer Stressantwort aktiv werden.

Daher sollten als nächstes mögliche funktionell homologe Callosesynthesen zu der stressinduzierten AtGSL5 in *B. distachyon* ermittelt werden.

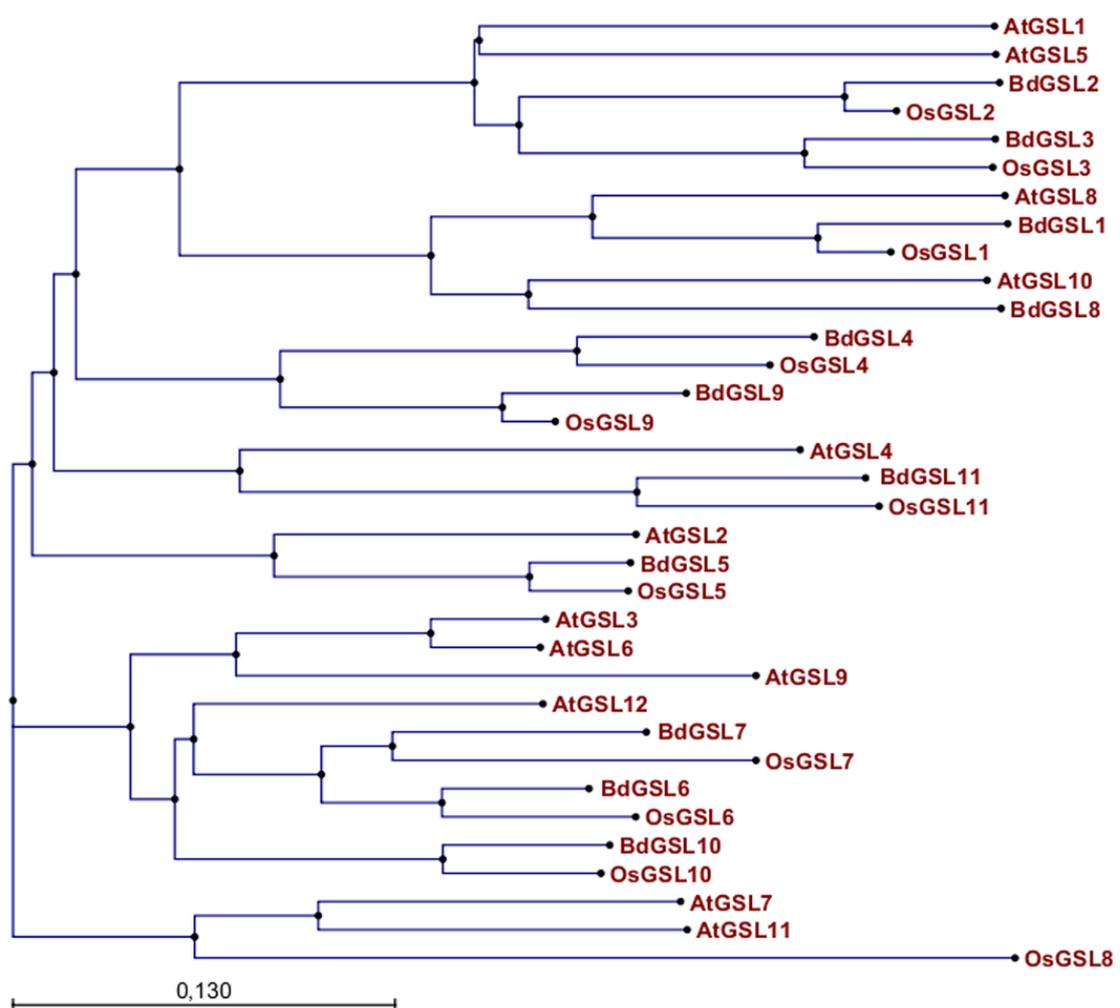
#### **3.4.1 Identifizierung von putativen Callosesynthesen in *B. distachyon***

Zunächst erfolgte auf der Webseite *Brachypodium.org* eine genomweite Datenbanksuche nach Callosesynthesen anhand der Aminosäuresequenz von AtGSL5 (TBLASTN; Altschul *et al.*, 1997). Die Datenbank der kodierenden Sequenzen (CDS) von Bd21 diente dabei als Grundlage.

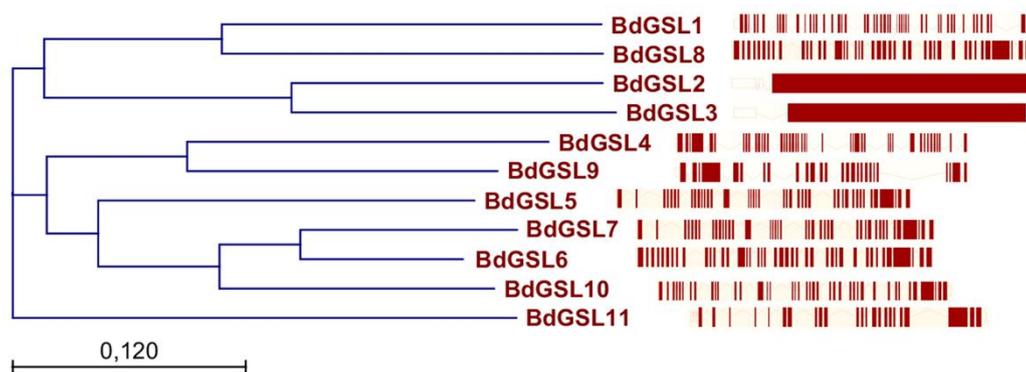
Die so identifizierten 11 putativen Callosesynthesen von *B. distachyon* wurden mithilfe von ClustalW den von Yamaguchi (2006) beschriebenen Callosesynthesen aus Reis (*Oryza sativa*) zugeordnet und entsprechend ihrer Homologie benannt (Tabelle 3-1). Abschließend wurden die Callosesynthesen von *A. thaliana* hinzugefügt, das *Alignment* neu berechnet und ein phylogenetischer Baum konstruiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-12 dargestellt.

**Tabelle 3-1: Übersicht über die identifizierten Callosesynthasen aus *B. distachyon*.**

Name	Locus
BdGSL1	Bradi1g51757
BdGSL2	Bradi2g46250
BdGSL3	Bradi2g50140
BdGSL4	Bradi2g40460
BdGSL5	Bradi1g47427
BdGSL6	Bradi1g29622
BdGSL7	Bradi3g60790
BdGSL8	Bradi1g77247
BdGSL9	Bradi2g40430
BdGSL10	Bradi1g76617
BdGSL11	Bradi3g09317



Anhand des phylogenetischen Baums kann man erkennen, dass die Callosesynthasen aus Reis prinzipiell näher mit *B. distachyon* verwandt sind, als jene aus der dikotylen Pflanzen *A. thaliana*. So kann man z. B. BdGSL2 und BdGSL3 die homologen Callosesynthasen OsGSL2 bzw. OsGSL3 zuordnen. Dagegen sind AtGSL1 und AtGSL5 untereinander näher verwandt als zu BdGSL2 oder BdGSL3. Allerdings gibt es auch Proteine, für die keine direkte Verwandtschaft zwischen *B. distachyon* und Reis, dafür aber zu *A. thaliana* gefunden werden konnte (BdGSL8 bzw. OsGSL8).



**Abbildung 3-12: Phylogenetischer Baum putativer Callosesynthasen *B. distachyon* (BdGSL) mit der jeweiligen Exonstruktur.**

Die Genstruktur wurde gramene.org entnommen. Das *Alignment* wurde auf Proteinebene erstellt und der Baum mittels des *Neighbor Joining* Algorithmus konstruiert. Maßstab: Mutationen pro Position.

Wie in 1.3.4 beschrieben, zeigen die Callosesynthasen in *A. thaliana* eine auffällige Genstruktur mit 40 bis 50 Exons. Ausgenommen davon sind *AtGSL1* und *AtGSL5*, die nur 2 bzw. 3 Exons aufweisen. Über die *gramene.org*-Webseite (Release 10) wurden die Genstrukturen der *BdGSL* analysiert. Wie in Abbildung 3-13 erkennbar, zeigen die Callosesynthasen bis auf *BdGSL2* und *BdGSL3* auch in *B. distachyon* die oben beschriebene Genstruktur.

Aufgrund des dargestellten Verwandtschaftsverhältnisses und der auffälligen,

**Abbildung 3-13: Phylogenetischer Baum putativer Callosesynthasen von *A. thaliana* (AtGSL), Reis (OsGSL) und *B. distachyon* (BdGSL).**

Die Benennung der BdGSL erfolgte anhand der Homologien zu Reis. Das *Alignment* wurde auf Proteinebene erstellt und der Baum mittels des *Neighbor Joining* Algorithmus konstruiert. Maßstab: Mutationen pro Position.

konservierten Exonstruktur kommen sowohl *BdGSL2* als auch *BdGSL3* als Homologien zu *AtGSL5* in Betracht. Eine weitere Charakterisierung der beiden Callosesynthasen aus *B. distachyon* sollte anhand von Expressionsanalysen erfolgen.

### 3.4.2 Expressionsstudien zu *BdGSL*

Für die Expressionsanalysen wurden zum Einen die Blätter von 3 Wochen alten Pflanzen des Ökotyps Bd21 nach einer Verwundung, zum Anderen nach der Inokulation mit dem Nicht-Wirtspathogen *Golovinomyces cichoracearum* geerntet. Für den Nachweis von Calloseablagerungen wurden ein Teil der Blätter mit Anilinblau gefärbt und am CLSM betrachtet. Die Expressionsniveaus aller 11 *BdGSLs* wurden durch vorgefertigte Platten des RealTime ready Assays (Roche) ermittelt, wofür zunächst eine RNA Isolation mittels Kit erfolgte und anschließend eine cDNA Synthese.

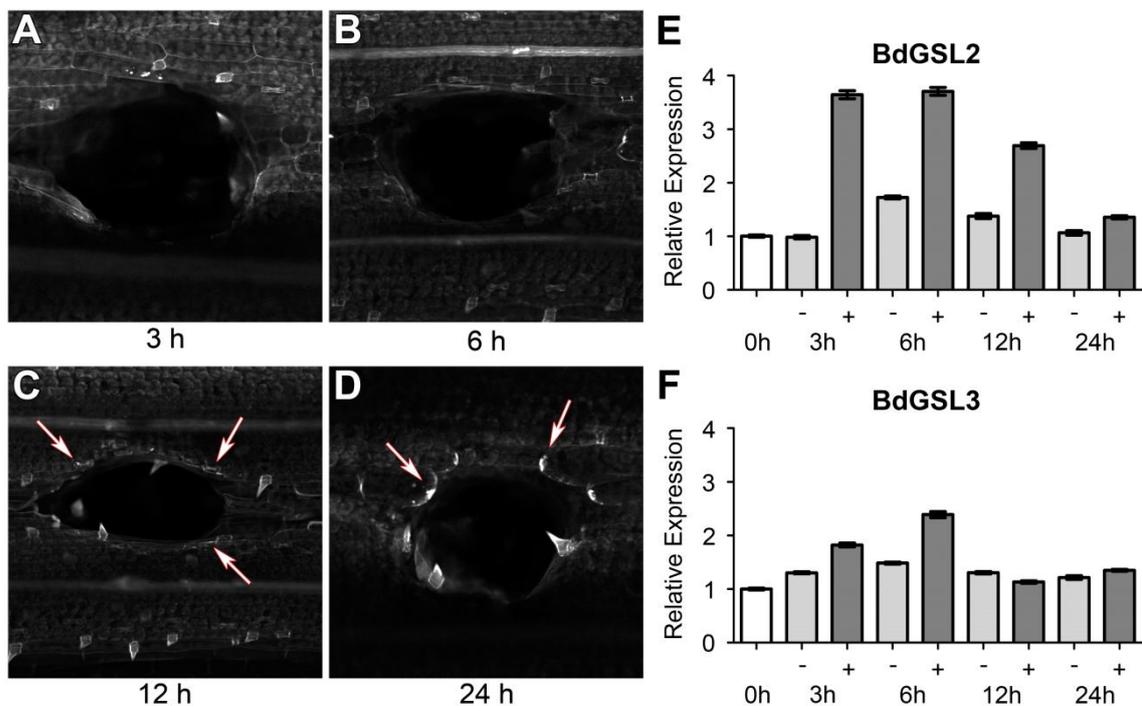
Folgend werden hier ausschließlich die beiden Callosesynthasen *BdGSL2* und *BdGSL3* aufgrund der oben beschriebenen Charakteristika betrachtet. Die Expressionsniveaus weiterer *BdGSLs* können dem anhang entnommen werden.

In Abbildung 3-14 sind die Ergebnisse der Verwundung der Blätter dargestellt. Dafür wurde über das ganze Blatt verteilt mit einer Nadel eingestochen. Die Fluoreszenzbilder zeigen, dass eine leichte Calloseablagerung als Wundverschluss 12 Stunden nach der Verletzung erkennbar ist. Erst zum 24 Stunden Zeitpunkt kann eine deutliche Callosefluoreszenz detektiert werden.

Im Vergleich zu den visuellen Calloseablagerungen steigt das Expressionsniveau von *BdGSL2* im Vergleich zur unverwundeten Probe bereits 3 Stunden nach der Verwundung um das 3,6-fache (vgl. Abbildung 3-14 E). Ab dem 12 Stunden Zeitpunkt nimmt die Expression dann wieder ab, bis sie 24 h nach der Verwundung das Ausgangsniveau erreicht hat. Im Gegensatz dazu zeigt die Expression von *BdGSL3* lediglich einen langsameren und geringeren Anstieg vom 1,8-fachen nach 3 bis 2, 4-fachen nach 6 Stunden (Abbildung 3-14 E). Die dargestellten Ergebnisse des einen biologischen Replikats spiegeln sich ebenfalls in dem zweiten Replikat wieder. Die relativ starke Induktion der *BdGSL2*-Expression deutet auf eine Beteiligung an der Callosesynthese nach einem Verwundungsstress hin. Allerdings zeigt auch *BdGSL3* einen, wenn auch nur

geringen, Anstieg des Expressionslevels. Somit kann eine Mitwirkung in diesem Fall nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In *A. thaliana* wird die Callosesynthase AtGSL5 zusätzlich zur Verwundungsreaktion auch für die Bildung von Calloseablagerungen an Penetrationsstellen benötigt (Jacobs *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2003). Daher sollten durch ein Inokulationsexperiment mit dem Mehltau *G. cichoracearum* und anschließender Untersuchung der Expression die Beteiligung der Callosynthesen aus *B. distachyon* untersucht werden.

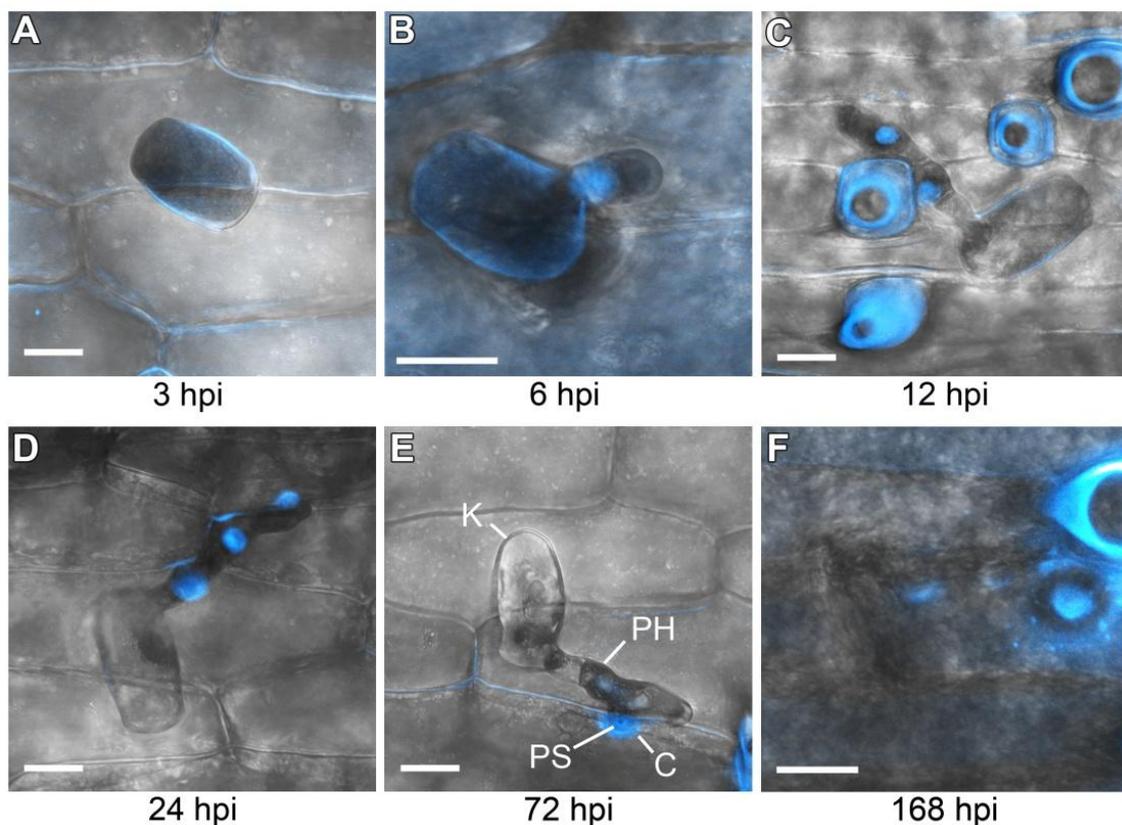


**Abbildung 3-14: Calloseablagerungen und Expression der zwei putativen AtGSL5-Homologen BdGSL2 und BdGSL3 nach Verwundung.**

(A – D) Fluoreszenzbilder von 3 Wochen alten Bd21 Blättern. Die Blätter wurden 3, 6, 12 und 24 Stunden nach einer mechanischen Verwundung geerntet, mit EtOH entfärbt und mit Anilinblau angefärbt. Die ersten Calloseablagerungen (Pfeile) sind nach 12 Stunden (C), starke Ablagerungen nach 24 Stunden (D) zu erkennen. (E, F) Relative Expressionsniveaus von *BdGSL2* und *BdGSL3* im Verhältnis zur nicht-verwundeten 0 Stunden Probe. Während in den nicht-verwundeten Blättern nur geringe Schwankungen in den Expressionstärken auftraten, (E) konnte für *BdGSL2* nach 3 Stunden ein starker Anstieg der Expression beobachtet werden. Ab 6 Stunden sank die Expression kontinuierlich ab. (F) Dagegen zeigte *BdGSL3* nur eine geringe Induktion der Expression nach 3 und 6 Stunden. Die Berechnung erfolgte nach Pfaffl (2001), wobei als internes Referenzgen *BdUbi*, sowie als Kalibrator der unverwundete 0 Stunden Zeitpunkt diente.

Die Analyse der Inokulation mit *G. cichoracearum* erfolgte entsprechend der Verwundung. Zunächst wurde die erfolgreiche Induktion einer Calloseantwort durch die

Fluoreszenzmikroskopie bestätigt (vgl. Abbildung 3-15). Obwohl *B. distachyon* für *G. cichoracearum* kein Wirt ist, keimt der Pilz zwischen 3 und 6 hpi aus, bildet die Primärhypho und versucht zu penetrieren (Abbildung 3-15 B). Als Antwort bildet *B. distachyon* Calloseablagerungen, die wie in Abbildung 3-15 E erkennbar, den Penetrationsstift vollständig umschließen und somit das Eindringen des Pilzes in das pflanzliche Gewebe verhindern. Als Reaktion versucht der Pilz durch Längenwachstum der Hypho an eine günstigere Position zu gelangen und erneut zu penetrieren (Abbildung 3-15 C, D), bis die Reserven in der Konidie aufgebraucht sind. 168 hpi erscheinen die Calloseplugs diffuser zu werden, da sie wahrscheinlich abgebaut werden.



**Abbildung 3-15: Calloseablagerungen nach Inokulation mit dem Nichtwirtspathogen *G. cichoracearum*.**

Durchlichtbilder überlagert mit Fluoreszenzaufnahmen von 3 Wochen alten Bd21 Blättern, die mit dem Mehltau *G. cichoracearum* inokuliert wurden. Die Blätter wurden 3, 6, 12, 24, 72 und 168 hpi geerntet, in EtOH entfärbt und mit Anilinblau angefärbt. (B) Die erste Calloseablagerung unter der Penetrationshypho konnten 6 hpi beobachtet werden. (C, D) Da die Penetration nicht erfolgreich war, wuchs die Penetrationshypho weiter und es bildeten sich 12 und 24 hpi weitere Calloseablagerungen. (E) Seitliche Aufnahme einer Penetrationsstelle, die mit Callose umhüllt ist. (F) Zum 168 hpi Zeitpunkt wirkten die Calloseablagerung wesentlich diffuser. K: Konidie, PH: Penetrationshypho, PS: Penetrationsstelle, C: Callose.

Obwohl nach der Inokulation mit dem Mehltau eindeutige Calloseablagerungen zu beobachten waren, konnten keine auffälligen Änderungen in der Expression, die sich auch in beiden biologischen Replikaten widerspiegelte, festgestellt werden. Eventuelle verursachte die ausgebrachte Konidiendichte von etwa 30 bis 40 Konidien/mm verteilt auf das ganze Blatt zu wenige Penetrationsereignisse, um eine detektierbare Erhöhung der Expression der Callosesynthasen zu registrieren.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 *F. graminearum*-Infektion in *B. distachyon*

Die zu den Süßgräsern zählenden Getreide gehören zu den wichtigsten Nahrungsmitteln der Welt. Nach Mais und Reis stellt vor allem auch Weizen eine wesentliche Grundlage unserer Ernährung dar (FAO, 2013). Umso wichtiger ist es die Sicherheit während des Anbaus zu gewährleisten. Durch phytopathologische Pilze kommt es aber immer wieder zu Ernteausfällen und einer Kontamination mit Mykotoxinen, die für Tiere und Menschen gesundheitlich gefährlich werden können. In Weizen kann eine Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *F. graminearum* zur Ährenbleiche (FHB) und dadurch zu Ernteausfällen bis zu 40 Prozent führen (Cowger und Sutton, 2005). Daneben produziert *F. graminearum* während der Kolonisierung der Pflanze Mykotoxine, die, oft in hohen Konzentrationen, in den befallenen Körnern verbleiben (D’Mello *et al.*, 1999). Daher ist die Erhöhung der Resistenz des Weizens ein primäres Ziel der Pflanzenzüchtung, die allerdings durch den komplexen genetischen Hintergrund erschwert wird. Aufgrund seiner Verwandtschaft zu den Süßgräsern hat *B. distachyon* in den letzten Jahren als Modellsystem für funktionelle genomische Analysen an Bedeutung gewonnen (Draper *et al.*, 2001; Mur *et al.*, 2011). Um die pflanzliche Seite der Interaktion näher zu charakterisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit der *B. distachyon* Ökotyp Bd21 als Modell für das Pflanzen-Pathosystem Weizen - *F. graminearum* genutzt, da das Genom dieses Ökotyps bereits vollständig sequenziert vorlag.

#### 4.1.1 *B. distachyon* besitzt keine Typ I-Resistenz gegenüber *F. graminearum*

Damit *B. distachyon* auch als Modellsystem für das Pathosystem Weizen – *F. graminearum* dienen kann, sollte die Infektion in *B. distachyon* mit der in Weizen vergleichbar sein. Um den Infektionsverlauf innerhalb der Ähre verfolgen zu können, wurden *F. graminearum* Mutanten inokuliert, die das grün-fluoreszierende Protein (GFP) konstitutiv exprimierten, wodurch sich die Pilzhyphen *in planta* leicht identifizieren ließen (Prasher, 1995). Die Sprühinokulation mit Konidien einer Wildtyp-ähnlichen *F. graminearum*-Mutante (wt-GFP; Jansen *et al.*, 2005) zeigte 14 dpi nekrotische Ährchen,

aber kein Verbleichen der Ähre. Nichtsdestotrotz demonstrieren die Nekrosen, die lokalisiert mit der pilzlichen GFP-Fluoreszenz auftreten, dass *B. distachyon* erfolgreich von *F. graminearum* kolonisiert werden kann. Dies konnte zuvor auch von Peraldi *et al.* (2011) gezeigt werden. Im Laufe der Infektion konnten die Autoren zusätzlich die typischen Symptome der kompletten Ährenbleiche beobachten, was durch die Nutzung des aggressiveren *F. graminearum*-Isolats (UK1) erklärt werden könnte. Unterschiede bezüglich der Aggressivität einzelner *F. graminearum* Stämme konnten von Cumagun *et al.* (2004), sowie Goswami und Kistler (2005) teilweise auf die Menge des produzierten Mykotoxins zurückgeführt werden. Zudem korreliert die direkte Applikation des Mykotoxins DON in hohen Konzentrationen (10 g/L) mit einer Ährenbleiche in für *F. graminearum* anfälligen Weizensorten (Lemmens *et al.*, 2005). Neben der Infektion mit einem eventuell aggressiveren *F. graminearum* Isolats, erzeugten Peraldi *et al.* (2011) einen hohen Infektionsdruck durch das Sprühen einer Konidienlösung auf die Pflanzen bis zu Oberflächensättigung.

Die Sprühinokulation führte zu einer erfolgreichen Primärinfektion, so dass keine Typ I-Resistenz, wie sie von Schroeder und Christensen (1963) beschrieben wurde, vorliegt und *B. distachyon* prinzipiell als Wirt für *F. graminearum* dienen kann. Eine erfolgreiche Ausbreitung des Pilzes innerhalb der Pflanze kann mit dieser Methode nicht untersucht werden, da unabhängige *F. graminearum* Infektionen benachbarter Blüten nicht ausgeschlossen werden können (Schroeder und Christensen, 1963, Bai und Shaner, 2004).

#### **4.1.2 Infektion definierter *F. graminearum*-Mutanten in *B. distachyon* verläuft vergleichbar zur Weizeninfektion**

Um zu untersuchen, ob *F. graminearum* zu einer Kolonisierung weiteren Gewebes und somit zu einer Ausbreitung innerhalb der Ähre in der Lage ist, wurde eine einzelne Blüte punktuell inokuliert. Auch hier zeigte der wt-GFP eine starke Infektion, die, durch einen *Disease Score* von über 2, 14 dpi gekennzeichnet ist. Mit dem *Disease Score* wurde der Infektionsverlauf visuell anhand eines Punktesystems bewertet, wobei ein Wert über 2 eine erfolgreiche Ausbreitung der Infektion beschreibt (vgl. 2.6.1). Zudem verdeutlichen fluoreszierende Hyphen des wt-GFP innerhalb der Rachilla den Infektionsweg des Pilzes von der inokulierten zu den benachbarten Blüten. Die wt-GFP-Infektion kann die Barriere

der Rachilla und somit eine Typ II-Resistenz überwinden. Auch im Weizenkultivar Nandu konnten Hyphen des *F. graminearum* wt-GFP beobachtet werden, die sich in der Rachis durch das Xylem und Phloem der Leitbündel ausbreitet und somit das nächstgelegene Ährchen kolonisiert (Jansen *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2010). Dagegen zeigt Gerste nach einer *F. graminearum* Infektion eine klare Typ II-Resistenz, wobei die Ausbreitung des Pilzes am Rachisknoten und der Rachilla gestoppt wird (Langevin *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2005).

In Weizen führt eine *F. graminearum* Infektion häufig zu verkümmerten und nur unzureichend ausgebildeten Körnern, die auf eine Unterbrechung der Nährstoffzufuhr durch den Pilz während der Kornbildung zurückgeführt wird (Bechtel *et al.*, 1985; McMullen *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2010). Erfolgt die *F. graminearum*-Infektion, nachdem die Kornbildung bereits begonnen hat, kann der Pilz die enthaltene Stärke und Speicherproteine verdauen, sowie die Zellwände zersetzen, was ebenfalls zu Korndefekten führt (Bechtel *et al.*, 1985; Boyacioglu und Hettiarachchy, 1995). In den infizierten Ährchen von *B. distachyon* unterblieb die Kornbildung vollständig (Abbildung 3-2). Dies lässt auf einen Infektionszeitpunkt vor der Kornbildung schließen, wobei höchstwahrscheinlich durch die massive Besiedlung des Pilzes die bereits in Weizen beschriebene Unterbrechung der Nährstoffzufuhr zu den Karyopsen erfolgte.

Die für Weizen typische Ährenbleiche konnte nach der Punktinokulation des *F. graminearum*-Stammes wt-GFP nur partiell bei *B. distachyon*-Ährchen beobachtet werden (Abbildung 3-2 A). Da hauptsächlich das Mykotoxin DON für das Ausbleichen verantwortlich gemacht wird (Cumagun *et al.*, 2004; Goswami und Kistler, 2005; Lemmens *et al.*, 2005), wurde die DON Konzentration in den inokulierten Ährchen analysiert. Die Infektion mit wt-GFP führte bereits 7 dpi zu hohen DON-Mengen (Abbildung 3.3). Zu diesem Zeitpunkt hat der Pilz bereits das inokulierte Ährchen und den Rachillaknoten kolonisiert und breitet sich über die Rachilla aus, was der *Disease Score* von etwa 1 widerspiegelt. In Weizen korreliert die DON-Konzentration mit der *TRI5*-Expression und es konnte gezeigt werden, dass die Besiedlung des Übergangsbereichs zwischen Rachilla und Rachis zu einer starken Induktion der Trichothecenebiosynthese in *F. graminearum* führt. Ist diese überwunden, nimmt die *TRI5*-Expression wieder ab (Doohan *et al.*, 1999; Voigt *et al.*, 2007; Ilgen *et al.*, 2009). Auch in *B. distachyon* konnte

kein Anstieg der DON-Menge in den inokulierten Ährchen zu einem späteren Zeitpunkt beobachtet werden. Aufgrund dieser Beobachtungen scheint auch in den Ährchen von *B. distachyon* der Übergangsbereich in die Rachilla bei der Besiedlung durch *F. graminearum* eine Barriere darzustellen, die von dem Pilz überwunden werden muss. In *B. distachyon*-Ährchen lag die DON Konzentration 14 dpi mit wt-GFP bei 12 mg/g Mycel (Abbildung 3-3) und entsprach damit in etwa den DON Konzentrationen im Weizen von 20 mg/g Mycel (Voigt *et al.*, 2007). Hierbei zeigt sich auch die weitaus bessere Anwendbarkeit der Modellpflanze *B. distachyon* in der Untersuchung der Mykotoxin-Induktion gegenüber *A. thaliana*, bei der die nachgewiesenen DON-Konzentrationen nach einer *F. graminearum*-Infektion im Allgemeinen relativ gering und nicht mit den Mengen in Weizen vergleichbar sind (Urban *et al.*, 2002; Cuzick *et al.*, 2008). Prinzipiell kann somit festgesellt werden, dass *B. distachyon* die nötigen Faktoren zur Induktion der DON-Produktion in *F. graminearum* bereitstellt.

Nachdem der Infektionsverlauf, sowie die Induktion und Akkumulation von DON durch wt-GFP in *B. distachyon* mit dem des Weizens vergleichbar ist, sollte anschließend untersucht werden, ob auch vergleichbare Typ II-Resistenzen nach der Inokulation verschiedener definierter *F. graminearum*-Deletionsmutanten auftreten. Die Trichodiensynthase TRI5 bildet das erste Enzym im Syntheseweg der Trichothecene und eine Deletion des kodierenden Gens führt zum Abbruch der Trichothecensynthese und zum Fehlen des Mykotoxins DON (Hohn und Desjardins, 1992; Proctor *et al.*, 1995). In Weizen führt dieser *Knock-out* zu einer starken Einschränkung der Virulenz, wobei das inokulierte Ährchen noch besiedelt werden kann, eine weitere Ausbreitung aber unterbleibt (Desjardins *et al.*, 1993; Bai *et al.*, 2002; Jansen *et al.*, 2005). Nach der Inokulation des Trichodiensynthase *Knock-outs*  $\Delta tri5$ -GFP konnte in *B. distachyon* keine weitere Ausbreitung außerhalb der inokulierten Blüte beobachtet werden. Damit konnte nachgewiesen werden, dass anders als in Gerste und Mais DON als Virulenzfaktor für die Ausbreitung und die volle Pathogenität in *B. distachyon* wichtig ist und damit vermutlich eine ähnliche Funktion in der Überwindung der Pflanzenabwehr wie in Weizen besitzt. (Jansen *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2006).

Einen weiteren wichtigen Virulenzfaktor von *F. graminearum* in Weizen bildet die sekretierte Lipase FGL1. Ähnlich dem TRI5-*Knock-out* ist die Infektion der

Deletionsmutante  $\Delta fgl1$  in der Ausbreitung eingeschränkt. In Weizen wird ausschließlich das inokulierte Ährchen besiedelt, und auch in Mais führt eine Inokulation mit dieser Mutante zu einer stark reduzierten Infektion (Voigt *et al.*, 2005). In *B. distachyon* konnte eine reduzierte Infektion, vergleichbar mit der  $\Delta fgl1$  Infektion in Weizen, bzw. der beschriebenen  $\Delta tri5$ -GFP Infektion in *B. distachyon*, beobachtet werden (Abbildung 3-2). Da die Mutante die Übergangszone von Rachilla und Rachis nicht durchbrechen kann, dieser Bereich aber höchst induktiv auf die DON-Bildung wirkt (Ilgen *et al.*, 2009), konnte in  $\Delta fgl1$ -infizierten Weizenähren ein kontinuierlicher Anstieg der *TRI5*-Expression und der DON-Menge beobachtet werden (Voigt *et al.*, 2007; Ilgen *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu war die DON-Konzentration in den  $\Delta fgl1$ -GFP inokulierten Ährchen von *B. distachyon* zu den untersuchten Zeitpunkten vergleichbar mit der wt-GFP Infektion. Während in der Weizenähre die Ährchen sehr kompakt gebaut sind und die Rachilla der einzelnen Blüten über den Rachisknoten direkt in die Rachis übergehen, liegen in *B. distachyon* die Rachilla der Blüten und die Rachis weiter auseinander (Abbildung 1-1 C; bzw. Opanowicz *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2010). Zwar bildet der Rachillaknoten in *B. distachyon* eine Barriere gegen die Ausbreitung der Infektion, scheint aber anders als in Weizen nicht die gleiche starke induktive Wirkung auf die DON-Produktion zu haben, da es zu keiner erhöhten DON-Induktion beim Auftreffen der  $\Delta fgl1$ -GFP Mutante auf den Rachillaknoten im Vergleich zum penetrierenden wt-GFP kommt (Abbildung 3-3).

In *F. graminearum* ist die MAP-Kinase GPMK1 an der Regulation von FGL1 beteiligt (Salomon *et al.*, 2012). Die durch die Deletion des Gens erzeugte Mutante  $\Delta gpmk1$  zeigt einen apathogenen Infektionsphänotyp auf inokulierten Weizenähren (Jenczmionka *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 2003), da neben der Induktion der sekretierten Lipase auch die Induktion weiterer extrazellulärer Endonukleasen, Xylanasen und Proteasen, die an einem Abbau der pflanzlichen Zellwand während des Infektionsprozesses beteiligt sind, unterbleibt (Jenczmionka und Schäfer, 2005). Vergleichbar mit der Infektion in Weizen, kann in *B. distachyon* ein leichtes Wachstum der Deletionsmutante nur auf den Antheren beobachtet werden, ansonsten zeigte sich auch hier der apathogenen Infektionsphänotyp (Abbildung 3-2). Die leichten Nekrosen an Palea und Lemma von *B. distachyon*-Blüten könnten von den hohen DON-Konzentrationen hervorgerufen werden, die für die Mutante nachgewiesen wurden (vgl. Abbildung 3-3; Urban *et al.*, 2003). So konnten auch Peraldi *et*

*al.* (2011) eine Sensitivität von *B. distachyon* gegenüber DON beobachten, die sich ebenfalls in nekrotischen Läsionen manifestierte.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *B. distachyon* erfolgreich von *F. graminearum* infiziert werden kann, wurde mit der Analyse der bereits in Weizen gut dokumentierten Infektionen der unterschiedlichen *F. graminearum*-Deletionsmutanten die Vergleichbarkeit der Infektionsverläufe und der Ausbreitung demonstriert. Zusammenfassend kann *B. distachyon* als Modellorganismus zur Analyse der *F. graminearum*-Infektion, sowie des damit verbundenen Schadbilds FHB, genutzt werden.

#### **4.1.3 *F. graminearum* Infektion induziert spezifische Abwehrmechanismen während der Infektion**

Die pilzliche Seite des Pathosystems *F. graminearum* – Weizen konnte mithilfe von Deletionsmutanten des Pilzes, wie den oben beschriebenen, oder diversen Überexpressionen bereits gut charakterisiert werden (Kazan *et al.*, 2012). Um auch die pflanzliche Seite der Interaktion besser verstehen zu können, muss neben der Beschreibung und Identifizierung möglicher Abwehrmechanismen, auch die funktionelle Untersuchung der zugrundeliegenden Gene erfolgen. Diese Analysen werden durch die genetische Zugänglichkeit von *B. distachyon* im Vergleich zu Weizen wesentlich vereinfacht.

##### **4.1.3.1 Induzierte Calloseablagerungen**

Eine basale Reaktion von Pflanzen auf penetrierende Pathogene bildet die lokale Einlagerung von Callose in die Zellwand. Innerhalb kurzer Zeit wird Callose in Form von Papillen als mechanische Barriere unterhalb der Penetrationsstelle gebildet (Koh *et al.*, 2005). Die Auflagerungen können das Eindringen des Pathogens verhindern, bzw. der Pflanze Zeit für die Bildung weiterer Abwehrmechanismen verschaffen (Stone und Clarke, 1992; Brown *et al.*, 1998; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Ellinger *et al.*, 2013).

Bei einer *F. graminearum*-Infektion scheint besonders der Übergangsbereich des Rachillaknotens in *B. distachyon* bzw. des Rachisknotens in Weizen für eine erfolgreiche Typ II-Resistenz von Bedeutung zu sein. Dementsprechend konnten in diesem Bereich in *B. distachyon* bereits 3 dpi punktuelle Callosablagerungen beobachtet werden. Ein Vergleich der verschiedenen Deletionsmutanten von *F. graminearum* zeigte deutliche

Unterschiede hinsichtlich der Calloseablagerungen. So führte die Infektion mit dem wt-GFP, genauso wie mit dem  $\Delta tri5$ -GFP nur zu geringer Calloseakkumulation im Vergleich zu den wasserinokulierten Ährchen (Abbildung 3-5). Eine Unterdrückung von callosehaltigen Zellwandauflagerungen bzw. ein Abbau durch sekretierte  $\beta$ -1,3-Glucanasen konnte auch von Kang und Buchenauer (2000) während der Infektion mit *F. culmorum* in anfälligen Weizenkultivaren beobachtet werden. In einem resistenten Weizenkultivar führte die Infektion dagegen sehr schnell zu starken Zellwandverdickungen (Kang und Buchenauer, 2000; Slikova *et al.*, 2008). Diese bildeten eine zusätzliche physikalische Barriere, die vermutlich die Ausbreitung des Pilzes im Wirtsgewebe beschränkten, sowie eine Diffusion niedermolekularer Substanzen, wie Toxine, verhinderten. Zudem könnte die Ausbreitung in weiter entferntes Gewebe durch den Verschluss der Siebelemente durch Callose und anderem amorphen Material eingeschränkt werden (Ribichich *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2005). Die vermehrten Calloseablagerungen, die während der  $\Delta fgl1$ -GFP Infektion im Rachillaknoten von *B. distachyon* nachgewiesen werden konnten, stehen im Einklang mit Beobachtungen von Voigt (2006) in Weizen. Obwohl die Deletionsmutante  $\Delta fgl1$  in Weizen erhöhte DON-Mengen produziert, führte eine  $\Delta fgl1$ -Infektion zu einer Induktion der Calloseablagerung im Rachisknoten. Im Gegensatz zu den *F. graminearum*-Stämmen wt-GFP und  $\Delta tri5$ -GFP fehlt  $\Delta fgl1$  die sekretierte Lipase 1, die benötigt wird, um pflanzliche Lipide zu hydrolysieren (Voigt *et al.*, 2005). Für die dabei frei gesetzten ungesättigten freien Fettsäuren konnte eine Inhibierung der Callosesynthese in der Pflanzen gezeigt werden, die somit in der  $\Delta fgl1$  Mutante unterbleibt (Kauss und Jeblick, 1986a; Voigt, 2006). Daneben wurden weitere post-translationale Regulationsmechanismen für die Callosesynthese vorgeschlagen, wie eine Aktivierung durch  $Ca^{2+}$  oder Phosphorylierung (Kauss und Jeblick, 1986b; Hong *et al.*, 2001a).

Die mit *F. graminearum* wt-GFP inokulierten *B. distachyon*-Ährchen zeigten 7 dpi die höchste Callosemenge, die 14 dpi wieder abnahm (vgl. Abbildung 3-4 G und Abbildung 3-5 H). Da auch in den wasserinokulierten Ährchen die Menge abnahm, scheint es sich zum Teil um eine entwicklungsbedingte Veränderung zu handeln. Jedoch blieben die Callosemengen in infizierten *B. distachyon*-Ährchen stets deutlich höher als in der Wasserkontrolle, mit Ausnahme der Ährchen nach Inokulation mit der apathogenen

*Δgpmk1*-Mutante. Zum Zeitpunkt der höchsten Callosekonzentration in den Ährchen nach 7 dpi hat wt-GFP bereits die Rachilla kolonisiert und breitet sich von dort weiter aus (Abbildung 3-2). Es ist anzunehmen, dass eine Verstärkung der Zellwände oder ein Verschluss der Leitbündel durch Callose in diesem Stadium keinen Einfluss mehr auf die Ausbreitung des Pilzes hat und somit eine Unterdrückung der Callosebildung nur noch an der Wachstumsfront erforderlich ist. So kann auch eine Reduzierung der *FGLI*-Expression 7 und 14 Tage nach einer Wildtyp Inokulation in Weizen im Vergleich zum induktiven Zeitpunkt 3 dpi festgestellt werden (Salomon *et al.*, 2012).

Im Allgemeinen scheinen Zellwandverdickungen, auch ohne eine Beteiligung von Callose, zu einer Resistenzausprägung beizutragen. Da in *F. graminearum*-infizierten Rachisknoten von Weizen von Ribichich *et al.* (2000) keine vermehrte Cellulose nachgewiesen werden konnte, wird die Zellwand wahrscheinlich nicht durch die Synthese von neuen Schichten verdickt. Vielmehr wird eine Verstärkung durch die Einlagerung von Phenylpropanoiden erreicht. So konnten in den *F. graminearum*-resistenten Weizenkultivaren Sumai-3 und Nyubai eine Induktion der Synthese von Amidinen der Hydroxymitsäuren, Flavonoiden und Ligninen nachgewiesen werden (Ribichich *et al.*, 2000; Gunnaiah *et al.*, 2012). Lignine können die Zellwand gegen einen enzymatischen Verdau, oder mechanische Einwirkungen verstärken, wie z. B. gegen den erhöhten Druck während eines Penetrationsversuchs durch pilzliche Appressorien (Vance *et al.*, 1980; Nicholson und Hammerschmidt, 1992; Moura *et al.*, 2010). Gleichzeitig erhöht z. B. Ferulasäure, eine Hydroxymitsäure, die Verknüpfung der Zellwandmoleküle und wirkt, wie Flavonoide, als Phytoalexin (McLusky *et al.*, 1999; Edreva *et al.*, 2007; Marcia, 2009). Die Induktion von Zellwandverdickungen wird vermutlich durch DON inhibiert. So konnten Jansen *et al.* (2005) in *Δtri5*-GFP inokulierten Weizenähren, im Gegensatz zu einer Infektion mit dem *F. graminearum* Wildtyp, eine starke Verdickung der Zellwände im Bereich des Rachisknoten beobachten.

#### **4.1.3.2 Spezifische induzierte Zellwandveränderungen**

Ob eine Pathogenantwort auch zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der Hemicellulosen führt, sollte mit der Analyse der nicht-cellulosehaltigen Monosaccharide geklärt werden. Die Zuckerzusammensetzung der Zellwände von *B. distachyon*-Ährchen entspricht in etwa den zuvor beschriebenen Zusammensetzungen anderer Gewebe von

*B. distachyon* und ist vergleichbar mit der der Gräser im Allgemeinen (Rancour *et al.*, 2012). Den Hauptanteil der Monosacharide bildet 7 Tage nach der Anthese Xylose. Zudem konnten etwa gleiche Mengen an Glucose und Arabinose, sowie nur wenig Galactose nachgewiesen werden. Entwicklungsbedingt veränderte sich die Zusammensetzung der Zellwand 14 Tage nach der Anthese, indem die Glucosemenge anstieg, während die Xylosekonzentration abnahm. Betrachtet man die weitere Entwicklung, zeigen reife Ähren von *B. distachyon* etwa 24 Prozent mehr Glucose als Xylose (Rancour *et al.*, 2012), die Zellwand des ausgereiften Kornes besteht sogar zu 90 Prozent aus Glucose (Guillon *et al.*, 2011). Glucose ist ein Grundbaustein der Zellwand und findet sich unterschiedlich verknüpft, sowohl in Cellulose, als auch in den Hemicellulosen vorwiegend als  $\beta$ -(1,3;1,4)-D-Glucan (MLG) und Xyloglucan (XyG). Der starke Anstieg der Glucose in *B. distachyon* Ähren geht wahrscheinlich auf einen hohen Anteil MLG zurück, die für eines schnelles Zellwachstum und dessen Kontrolle synthetisiert werden (Buckeridge *et al.*, 2004; Guillon *et al.*, 2011). In *B. distachyon* weisen zudem die erhöhten Mengen an MLG, sowie ein geringer Stärkegehalt auf eine Funktion als Stärkequelle hin, die während der Keimung schnell und effektiv mobilisiert werden kann (Burton und Fincher, 2012; Guillon *et al.*, 2011). In sich entwickelnden Organen der Gräser bildet Xylose den Hauptbestandteil der Zellwand. So zeigte sich auch in den Ährchen von *B. distachyon* 7 Tage nach der Anthese ein Xyloseanteil von 70%, der während der weiteren Samenreifung bis zur reifen Ähre abnahm (Rancour *et al.*, 2012).

Interessanterweise führte in *B. distachyon*-Ährchen eine Infektion durch *F. graminearum* wt-GFP zunächst zu einer starken Reduktion der Glucosemenge der Hemicellulosen, während weder Veränderungen der Xylose- noch Arabinosemengen beobachtet wurden. Auch in den  $\Delta tri5$ -GFP und  $\Delta fgl1$ -GFP inokulierten Ährchen konnte eine etwas geringere Glucosemenge beobachtet werden, während die  $\Delta gpmk1$ -GFP Infektion keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Daraus lässt sich schließen, dass die Stärke der *F. graminearum*-Infektion in einem Zusammenhang mit der Reduktion der Glucosemenge steht. Besonders nekrotrophe Pilze sekretieren eine Bandbreite von zellwandabbauenden Enzymen (CWDP, *cell wall degrading proteins*), wie Cellulasen, Xylasen und Pektinasen, um die Barriere der Zellwand zu überwinden (Walton, 1994; Nühse, 2012). Auch konnte ein Abbau von Cellulose in der pflanzlichen Zellwand bereits

für *Fusarium*-Spezies demonstriert werden (Kang und Buchenauer, 2002; Wanjiru *et al.*, 2002). Allerdings wurden durch die in dieser Arbeit angewandte Aufreinigungsmethode und dem anschließenden Verdau mit TFA spezifisch die Hemicellulosen hydrolysiert, während die Cellulosen nicht angegriffen wurden (De Ruiter und Burns, 1987), weshalb der beobachtete Glucoseabfall nicht auf einen Verdau der Cellulosen durch *F. graminearum* zurückgeführt werden kann. Wie zuvor beschrieben geht in *B. distachyon*-Ährchen die detektierte Glucosemenge der Hemicellulosen vermutlich hauptsächlich auf MLG zurück, die ebenfalls durch Cellulasen hydrolysiert werden können (Ivakov und Persson, 2001). Damit könnte die geringere Glucosemenge durch einen Abbau der Hauptstrukturkomponente der Hemicellulosen durch *F. graminearum* erklärt werden. Durch diesen Abbau würden wahrscheinlich Verknüpfungen zwischen den Cellulosen gelockert, was wiederum die Zellwand angreifbarer für einen weiteren Verdau macht und schließlich *F. graminearum* die Penetration ermöglicht (Walter *et al.*, 2010). Die bei der Hydrolyse entstehenden MGL-Oligosaccharide könnten aufgrund einer Überwachung der Zellwandintegrität und Funktionalität von der Pflanze perzipiert werden und Signalkaskaden aktivieren (Pilling und Höfte, 2003; Seifert und Blaukopf, 2010; Vega-Sánchez *et al.*, 2012; Nühse, 2012). So führte in Reis die Deletion der *Cellulose synthese-like F6 (CslF6)* Glykosyltransferasen zu einem fast vollständigen Verlust der MLGs, sowie zu einer Induktion der Pathogenantwort und einer erhöhten Resistenz. Zudem konnte ein erhöhte Expression von Salicylsäure-Markergenen festgestellt werden (Vega-Sánchez *et al.*, 2012). In frühen Phasen der Infektion konnte auch für *F. graminearum* eine Induktion der Salicylsäure gezeigt werden (Pritsch *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2011). Salicylsäure ist Teil der allgemeinen pflanzlichen Abwehr und spielt vorwiegend bei biotropen Infektionsprozessen eine zentrale Rolle, wobei ihr auch eine Bedeutung in der Resistenzausbildung gegen *F. graminearum* in Weizen zugesprochen werden konnte (Ding *et al.*, 2011; Kazan *et al.*, 2012; Vlot *et al.*, 2009). Dies steht im Einklang mit den zunächst hemibiotrophen Charakteristiken die *F. graminearum* während der Etablierung der Infektion zeigt (Brown *et al.*, 2010; Trail, 2009; Bushnell *et al.*, 2003). So könnte die Freisetzung der MGL-Oligosaccharide durch *F. graminearum* als Signal für die Pflanze dienen, Salicylsäure zu induzieren. Die erfolgreiche Kolonisierung von *B. distachyon* deutet allerdings auf eine nicht ausreichende Induktion der Abwehr hin (Pritsch *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2011).

Im weiteren Verlauf der *F. graminearum*-Infektion konnte ein signifikanter Anstieg der Glucosemenge in wt-GFP inokulierten Ährchen im Vergleich zur Wasser-Inokulation beobachtet werden. Dieser Anstieg steht im Kontrast zu der zuvor beschriebenen Sekretion von CWDP durch *F. graminearum*, um die Zellwand zu überwinden ((Walton, 1994; Walter *et al.*, 2010; Nühse, 2012)). Ein erfolgreicher Verdau der Zellwände, sollte vermutlich auch zu einer Abnahme in der Gesamtmenge der Hemicellulosen führen, die aber nicht beobachtet werden konnte. Während für die DON-produzierenden Mutanten  $\Delta fgl1$ -GFP und  $\Delta gpmk1$ -GFP ebenfalls ein leichter Anstieg zu verzeichnen war, verblieb die Glucosemenge der  $\Delta tri5$ -GFP Infektion auf dem Niveau der Wasserkontrolle (Abbildung 3-6 B). Somit konnte nur in DON-produzierenden *F. graminearum*-Stämmen eine Veränderung der Zellwandzusammensetzung beobachtet werden. Um zu klären ob DON alleine für die Modifikationen verantwortlich ist, wurden *B. distachyon*-Ährchen mit verschiedenen Konzentrationen von DON inokuliert. Interessanterweise konnte nur für geringe DON Konzentrationen bis 1000 ppb ein Anstieg der Glucose beobachtet werden, wobei der höchste Anstieg bei der niedrigsten Konzentration (1 ppb) auftrat (Abbildung 3-7 C). Bei dem Anstieg der Glucose konnte eine Beteiligung von Calloseablagerungen, wie sie im wt-GFP 14 dpi gezeigt wurden (Abbildung 3-4), ausgeschlossen werden, da die Callosemenge in den DON-inokulierten Ährchen der Wasser-Inokulation entsprach (Abbildung 3-7 B) und dementsprechend nicht induziert war.

Obwohl für die hohen DON-Konzentrationen von 50 ppm bis 500 ppm keine Veränderungen der Monosaccharidzusammensetzung festgestellt werden konnte, traten in den inokulierten Blüten Nekrosen auf. Das Auftreten von nekrotischen und chlorotischen Symptomen wird auf eine Inhibierung der Proteinbiosynthese zurückgeführt (Cutler, 1988; Peraldi *et al.*, 2011), wobei DON vermutlich an die ribosomale 60S-Untereinheit bindet und so die Aktivität der Peptidyltransferase blockiert (Wannemacher *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 2005). Im tierischen System wird durch die Bindung an das Ribosom die Aktivität der Peptidyltransferase inhibiert, wodurch MAPK-Signalkaskaden eine ribotoxische Stressantwort auslösen (Shifrin und Anderson, 1999; Iordanov *et al.*, 1997). Die MAP-Kinasen bilden einen zentralen Signaltransduktionsweg in der Zelle, der für die Weitergabe der Information von diversen Rezeptoren oder Sensoren bis zu einer Antwort auf zellulärer Ebene verantwortlich ist (Opdenakker *et al.*, 2012). Dabei können MAP-

Kinasen die Zellproliferation und Differenzierung beeinflussen, sowie Apoptose induzieren (Cobb, 1999). Während im tierischen System bereits die MAP-Kinasen JNK (*c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase*) und p38 identifiziert wurden, die potentiell an der Weitergabe der DON-induzierten ribotoxischen Stressantwort beteiligt sind (Pestka, 2007), fehlt für Pflanzen die Information, welche MAP-Kinasen an der Perzeption, Weitergabe und schließlich der Regulation der Genexpression involviert sind. Einige Hinweise liefern Studien von Caffrey *et al.* (1999) und Ren *et al.* (2002), die eine funktionelle Verwandtschaft von JNK bzw. p38 zu MPK3 und MPK6 aus *A. thaliana* vorschlagen. Für einige Trichothecene konnte in *A. thaliana* bereits eine Aktivierung der MAPK-Signalkaskade, u. a. über MAPK6, und anschließende Induktion von Genen der Pathogenabwehr, Akkumulation von Salicylsäure und ROS, sowie eine Läsionsbildung beschrieben werden (Nishiuchi *et al.*, 2006). Für DON konnte dagegen keine Induktion der Pathogenabwehr beobachtet werden, vermutlich da *A. thaliana* durch die Expression einer UDP-Glycosyltransferase in der Lage ist DON zu detoxifizieren (Poppenberger *et al.*, 2003).

Ähnlich wie im tierischen System könnte DON auch in der Pflanze Dosis-abhängig unterschiedliche Reaktionen hervorrufen: Während sehr hohe DON-Dosen zum Absterben von Organen und zum Tod führen, können niedrigere Dosen das Immunsystem modulieren (Pestka, 2007; Ueno, 1984). So könnte eine hohe DON-Konzentration auch in der Pflanze zur Apoptose führen, wodurch auch die nekrotischen Symptome erklärt werden könnten, während niedrige DON-Konzentrationen die pflanzliche Abwehr ähnlich einer *effector-triggered-like immunity* induzieren (Jones und Dangl, 2006) und schließlich zur Erhöhung der Glucosemenge beitragen. Ein weiterer Hinweis auf eine Funktion als Effektor, könnte die erhöhte Resistenz gegenüber einer *F. graminearum* Infektion nach einer Vorbehandlung mit DON sein (Abbildung 3-8). DON wird innerhalb der Wirtszelle bei Bindung an das Ribosom erkannt, das Signal wird weitergeleitet und die pflanzliche Abwehr auf das Pathogen vorbereitet, wie z. B. die Veränderung der Zellwandzusammensetzung. Wie DON in der Zelle erkannt wird, welche Proteine an der Weiterleitung beteiligt sind und welche spezifischen Abwehrmechanismen durch DON induziert werden, soll in der Zukunft noch geklärt werden, da hierdurch mögliche neue Resistenzmechanismen aufgedeckt werden könnten.

## 4.2 Beteiligung von Callosesynthasen an der *F. graminearum*-Infektion in *B. distachyon*

Bezüglich der induzierten Zellwandveränderungen nach einer mikrobieller Infektion ist neben den zuvor beschriebenen, insbesondere die Ablagerung des  $\beta$ -1,3-Glucans Callose eine der offensichtlichsten Veränderungen, die eine generelle Antwort auf die physische Penetration darstellt. Dies konnte auch in *B. distachyon* nach *F. graminearum*-Infektion festgestellt werden. Vergleichbar zu Weizen war die Infektion mit der  $\Delta fgl1$ -Mutante besonders auffällig, da sie zu erhöhten Calloseablagerungen im Rachillaknoten von *B. distachyon* führte, sowie in der Ausbreitung eingeschränkt war. Da zudem kürzlich gezeigt werden konnte, dass in *A. thaliana* die Überexpression der stressinduzierten Callosesynthase AtGSL5 zu einer vermehrten Calloseablagerung an Orten der versuchten Mehltau-Penetration und letztlich zur kompletten Resistenz gegenüber dem Pathogen führt (Ellinger *et al.*, 2013), stellte sich die Frage, ob auch in dem monokotylen Gras *B. distachyon* eine Überexpression der Callosesynthase AtGSL5 aus *A. thaliana* zur Erhöhung der Resistenz beitragen könnte. Dafür wurden *B. distachyon* Wildtyppflanzen mittels *A. tumefaciens* mit dem entsprechenden Konstrukt zur AtGSL5-Überexpression transformiert. Die Integration und Expression von AtGSL5 führte in *B. distachyon* zu einer Erhöhung der Resistenz gegenüber *F. graminearum* wt-GFP. Dieser Phänotyp konnte für zwei unabhängige Linien bestätigt werden, während sich die Pflanzenlinie, die nur mit GFP als Kontrolle transformiert wurde, wie der Wildtyp verhielt (Abbildung 3-10). Durch diese mitgeführte Kontrollpflanze konnte eine Induktion der Resistenz aufgrund des transformierten Vektors und des exprimierten GFPs ausgeschlossen werden. Die wt-GFP-Infektion zeigte in den AtGSL5-Pflanzen eine typische Typ II-Resistenz, wobei sich *F. graminearum* nur im inokulierten Ährchen ausbreiten konnte. Die Callosebestimmung 3 dpi ergab eine Steigerung der Callosemenge um 350% im Rachillaknoten der inokulierten Blüte. Diese starke Induktion der Calloseproduktion ist wahrscheinlich an der Ausbildung der beobachteten Resistenz beteiligt, wie sie auch für resistenterer Weizenkultivare beschrieben wurde (Kang und Buchenauer, 2000; Slikova *et al.*, 2008). Dies liefert wichtige Hinweise darauf, dass Callose in der *F. graminearum*-Infektion in Monokotyledonen eine größere Rolle spielen könnte als bisher angenommen. Diese Vermutung wird unterstützt durch Untersuchungen zur Inhibierung der Callosesynthase in

Getreiden. So führt eine Behandlung mit dem Callosesynthase-Inhibitor 2-Deoxy-D-Glucose in Gerste zu einer Verstärkung der Penetration insbesondere durch einen inkompatiblen Mehltau (Bayles *et al.*, 1990; Zeyen *et al.*, 2002). Dabei wurde auch der Einfluss von Calloseablagerungen in *MLO*-Mutanten getestet. Mutationen in *MLO*-Genen führen zu einer allgemeinen Erhöhung der Resistenz gegen Mehltau, aber auch zu früher Blattseneszenz und reduzierter Fitness in ungünstigen Umgebungen (Consonni *et al.*, 2010). *MLO* aus Gerste und *MLO2* aus *A. thaliana* kodieren für ein integrales Membranprotein mit sieben transmembranen Domänen, das mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor Calmodulin interagiert und die pflanzliche Pathogenantwort unterdrückt (Büschges *et al.*, 1997; Devoto *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2002). Die Deletion des Gens führt dagegen zu einem erhöhten Ausstoß von ROS, einer pathogen-induzierten Genexpression, sowie zu einer Vergrößerung der lokalen Papillen, wodurch eine Penetration unterbunden wird (Skou *et al.*, 1984; Peterhänsel *et al.*, 1997; Piffanelli *et al.*, 2002). Obwohl der *mlo*-Phänotyp in Gerste dem *Knock-out* in *A. thaliana* entspricht (Vogel und Somerville, 2000; Schulze-Lefert und Panstruga, 2003), scheinen in dem dikotylen Organismus Calloseablagerungen, durch die Stress-induzierte Callosesynthase AtGSL5 für eine Resistenzausbildung keine Rolle zu spielen (Consonni *et al.*, 2010).

Aufgrund der Bedeutung von Calloseablagerungen in der Ausbildung der Typ II-Resistenz in *B. distachyon*, wurde damit begonnen, die *B. distachyon*-eigenen Callosesynthasen näher zu charakterisieren. In einem Screening auf genomischer Ebene wurden 11 Gene identifiziert, die zur der Familie der Callosesynthase-kodierenden *GSL*-Gene gerechnet werden können. Von den 11 *GSL*-Genen zeigten *BdGSL2* und *BdGSL3* eine relativ einfache Genstruktur, die sich in dem Vorhandensein von nur wenigen Exons äußert und damit vergleichbar zur Struktur der Gene *AtGSL1* und *AtGSL5* aus *A. thaliana* ist (vgl. Abbildung 3-13 und Abbildung 1-4). Neben der Genstruktur zeigten diese Callosesynthasen auch auf Proteinebene eine enge Verwandtschaft (Abbildung 3-12). Durch Expressionsstudien sollten nachfolgend untersucht werden, ob die Callosesynthasen *BdGSL2* und *BdGSL5* aus *B. distachyon* neben der festgestellten Sequenz-Homologie auch eine ähnliche biologische Funktion in der stressinduzierten Callosebiosynthese wie *AtGSL5* besitzen (Jacobs *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2003). Neben den eindeutigen Calloseablagerungen nach einer Mehltauinfektion konnte auch nach einer Verwundung des

Blattes Callose beobachtet werden. Die Expressionsanalyse der 11 *GSL*-Gene aus verwundeten Blattbereichen von *B. distachyon*, zeigte eine Induktion der *BdGSL2*-Transkription vor der beobachteten Akkumulation von Callose (Abbildung 3-14). Dies ist ein wichtiger Hinweis auf eine mögliche Funktion der Callosesynthese *BdGSL2* in der stressinduzierten Callosebiosynthese. Eine potentiell ähnliche biologische Funktion und die hohe Homologie in der Sequenz und Genstruktur zwischen *BdGSL2* und *AtGSL5* könnte zudem helfen, die evolutionäre Entwicklungen der stressinduzierten Callosebiosynthese in höheren Pflanzen zu untersuchen.

Dazu muss jedoch zunächst die biologische Funktion der Callosesynthese *BdGSL2* aus *B. distachyon* experimentell, durch die Generierung einer entsprechenden Deletionsmutante, nachgewiesen werden.

### **4.3 Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung von *B. distachyon* als Modellorganismus für die Untersuchung der *F. graminearum* – Weizen Infektion gezeigt. Eine Nutzung für weitere Pathosysteme unter den Getreiden wurde teilweise bereits beschrieben. So konnten *B. distachyon* erfolgreich für die Infektion durch das Reispathogen *Magnaporthe grisea* (Parker *et al.*, 2008; Routledge *et al.*, 2004; Draper *et al.*, 2001) und des Streifenrosts *Puccinia striiformis* auf Gerste und Weizen (Draper *et al.*, 2001) genutzt werden. Vermutlich werden in Zukunft weitere Pathogene hinzukommen. Obwohl *B. distachyon* nicht zu den C4-Pflanzen gehört, könnte es auch als Modell für Mais und die Bioenergiepflanze *Miscanthus x giganteus* dienen, um z.B. Zellwandveränderung zu untersuchen, die zu einem höheren Ertrag bzw., im Falle von Energiepflanzen, zu einer höheren Energieausbeute führen.

Durch die Analyse der *F. graminearum*-Infektion in *B. distachyon* wurden DON-induzierte Zellwandveränderungen beobachtet. Zusätzlich zu den gewählten Zeitpunkten von 7 und 14 dpi könnten auch sehr frühe Zeitpunkte, die mit der ersten DON-Induktion einhergehen, wie sie von Pritsch *et al.* (2000) beschrieben wurden, einen Hinweis geben zu welchem Zeitpunkt die Veränderungen stattfindet. Durch gleichzeitig durchgeführte Expressionsanalysen wie z.B. für Markergene der Salicylsäure, könnten die Resistenzmechanismen tiefergehend beschrieben werden.

Zur Bestätigung und funktionellen Charakterisierung der identifizierten, zu AtGSL5 homogenen, Callosesynthase BdGSL2, sollten Deletionsmutanten von *B. distachyon* bezüglich der Calloseablagerungen nach einer Verwundung bzw. als Reaktion auf Pathogene untersucht werden. Da zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit für *B. distachyon* noch keine T-DNA-Insertionsline für BdGSL2 oder weitere interessante Callosesynthasen beschrieben war, könnten eigene *Knock-out*-Mutanten anhand der TALEN Methode erstellt werden (Shan *et al.*, 2013). Dabei werden durch designte Nukleasen am Zielort Doppelstrangbrüche in die DNA eingeführt, die anschließend mit dem ausgewählten Konstrukt durch homologe Rekombination repariert werden. Dadurch entsteht die Möglichkeit Gene durch das Einbringen von Selektionsmarkern relativ einfach zu deletieren. Desweiteren könnte man auch durch die Transformation von RNAi-Konstrukten die Funktion einzelner oder Gruppen von Callosesynthasen analysieren, wie es bereits für die AtGSL5 Mutante beschrieben wurde (Jacobs *et al.*, 2003).

Um die Übertragbarkeit auf Weizen und andere Getreide zu verifizieren, könnte zunächst die Callosesynthase AtGSL5, später auch eine identifizierte endogene Callosesynthase in den Getreiden exprimiert werden. Untersuchungen des Phänotyps durch Inokulationsexperimente würden dann aufzeigen, ob eine vergleichbare Resistenz nach einer Pathogeninfektion auftritt, wie sie für *B. distachyon* in dieser Arbeit beschrieben wurde.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die zunehmende Verbreitung der Pflanzenkrankheit *Fusarium Head Blight*, hauptsächlich verursacht durch den phytopathogenen Pilz *Fusarium graminearum*, führt zu hohen Ernteverlusten und einer Belastung des Getreides mit Mykotoxinen. Da die Kontrolle der Krankheit nur unzureichend mit Fungiziden erfolgen kann, liegt der Fokus auf der Züchtung von resistenteren Getreidesorten mit dem Hauptaugenmerk auf Weizen. Allerdings werden Analysen der Interaktion zwischen *F. graminearum* und Getreide durch die genetische Unzugänglichkeit insbesondere in Weizen erschwert. Als Lösung wurde *Brachypodium distachyon* vorgeschlagen, das neben den wichtigen Eigenschaften eines Modellorganismus, auch genetisch zugänglich ist und relativ einfach transformiert werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch die Analyse der Infektion eines *F. graminearum* Wildtyp-Stammes, sowie definierter Deletionsmutanten, die Eignung von *B. distachyon* als Modell für die *F. graminearum* – Weizen Infektion bestätigt werden. Dabei verhielt sich *F. graminearum* bezüglich des Infektionsverlaufs und der DON-Produktion wie bereits für Weizen beschrieben. Während der Wildtyp *B. distachyon*-Ährchen erfolgreich kolonisieren konnte, konnten sich sowohl die DON-defiziente Mutante  $\Delta tri5$ , als auch die Lipase-Deletionsmutante  $\Delta fgl1$ , die Wildtyp-ähnliche Mengen des Mykotoxins DON produzierte, nur in der inokulierten Blüte ausbreiten. Der *Knock-out* der MAP-Kinase  $\Delta gmpk1$  verhielt sich wie auf Weizen auch auf *B. distachyon* apathogen.

Um die pflanzliche Seite der Interaktion näher zu charakterisieren, wurden mögliche Veränderungen der pflanzlichen Zellwand, die die erste wichtige Barriere gegen pilzliche Pathogene darstellt, analysiert. Die alkoholunlöslichen Bestandteile der Zellwand wurden dafür aufgereinigt und die Hemicellulosen hydrolisiert. Anschließend wurden die zugrundeliegenden Monosaccharide mittels Anionenaustausch-Chromatographie mit gekoppelter, gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) bestimmt. 14 Tage nach der Infektion (dpi) mit *F. graminearum* konnte in den inokulierten *B. distachyon*-Ährchen nur für die DON-produzierenden Stämme Wildtyp,  $\Delta fgl1$ - und  $\Delta gmpk1$ -Mutante ein Anstieg der Glucosemenge beobachtet werden. Durch eine Inokulation mit DON konnte die Induktion der Glucose auf das Mykotoxin zurückgeführt werden. Dabei zeigte

die geringste DON-Konzentration von 1 ppb den höchsten Anstieg. Da eine Vorbehandlung der Ähren mit DON zu einer signifikanten Reduktion der anschließenden Wildtyp-Infektion führte, wird für das Mykotoxin eine Dosis-abhängige Induktion der Pathogenabwehr, ähnlich der *effector-triggered immunity*, vorgeschlagen.

Als Teil der basalen Pathogenabwehr wird das Zellwandpolymer Callose zwischen der Plasmamembran und der Zellwand gebildet. Auch in *B. distachyon* konnte eine Anreicherung von Callose nach einer *F. graminearum*-Infektion beobachtet werden. Während 7 Tage nach der Wildtyp-Inokulation die höchste Callosekonzentration *B. distachyon*-Ährchen beobachtet werden konnte, stach zum frühen 3 Tage Zeitpunkt besonders die  $\Delta fgl1$ -Mutante hervor. Diese zeigte vermehrte Calloseablagerungen im Rachillaknoten, dem Übergang von der Blüte zur Ährchenachse. Damit entsprachen auch die Calloseablagerungen in *B. distachyon* nach einer *F. graminearum*-Infektion den in Weizen beschriebenen. Die zusätzliche Integration der Stress-induzierten Callozesynthese AtGSL5 aus *Arabidopsis thaliana* führte in *B. distachyon* zu einer stark erhöhten Callosebildung im Rachillaknoten nach einer *F. graminearum*-Infektion im Vergleich zur Wildtyp-Pflanze. Zudem konnte eine Erhöhung der Typ II-Resistenz gegenüber einer *F. graminearum*-Infektion beobachtet werden, die die Bedeutung von Calloseablagerungen während dieser in *B. distachyon* verdeutlichen. Ein erster Schritt um die Ergebnisse auf Weizen zu übertragen, war die Identifizierung endogener Callozesynthasen aus *B. distachyon*. Unter den 11 putativen Callozesynthasen konnte durch Expressionsanalysen BdGSL2 identifiziert werden, die eine mögliche homologe Funktion zu AtGSL5 aufweist.

## 6. ABSTRACT

Increasing outbreaks of the severe plant disease Fusarium Head Blight on cereals mainly caused by the fungal plant pathogen *Fusarium graminearum* lead to massive losses of yield and a contamination of grains with mycotoxins. Due to the insufficient disease control based on fungicides, the breeding of more resistant cereals gains more and more importance. But the investigation of the interaction between *F. graminearum* and cereals, esp. wheat, was always limited by the genetic inaccessibility of these plants. Recently *Brachypodium distachyon* was introduced as a sufficient model system for the temperate grasses, which can easily be transformed.

Within this work the suitability of *B. distachyon* as a model for the pathosystem *F. graminearum* – wheat has been approved, by analysing the infection pattern of a *F. graminearum* wild type strain as well as predefined mutant strains. *F. graminearum* showed the same disease phenotype and DON production as previously reported. While the wild type was able to colonize *B. distachyon* spikelets successfully, both, the DON deficient  $\Delta tri5$  mutant and the lipase deletion mutant  $\Delta fgl1$ , which showed wild type-like DON production, were only able to infect the inoculated floret. The MAP kinase deletion mutant  $\Delta gpmk1$  showed in *B. distachyon* an apathogenic phenotype as previously reported from wheat.

To characterize the plant defense of this interaction in more detail, cell wall alterations have been analyzed as the cell wall represents the first effective barrier against intruding fungal pathogens. The alcohol insoluble residues of the cell walls were prepared and the hemicelluloses were hydrolyzed. Afterwards the monosaccharide composition was determined by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). 14 days post-inoculation (dpi) an increased amount of glucose was detected in the inoculated spikelets only for the DON-producing strains wild type,  $\Delta fgl1$  and  $\Delta gpmk1$  in the inoculated spikelets. Due to the results from DON inoculation a linkage between the induction of the glucose and the mycotoxin was observed. Application of the lowest DON concentration of 1 ppb induced the strongest increase. Additionally *F. graminearum* wild type infection was significantly reduced on spikelets that were pretreated with DON. This suggests that the mycotoxin DON can

induce a dose-dependent effector-triggered like immunity in the host plant, which is associated with cell wall changes.

A common defense response in plants is the deposition of the cell wall polymer callose between the plasma membrane and the cell wall. Comparable to wheat an enrichment of callose was detected after a *F. graminearum* infection in *B. distachyon*. While the highest amount of callose was observed in wild type-inoculated *B. distachyon* spikelets at 7 dpi, the callose content of the  $\Delta fgl1$  mutant was prominent at 3 dpi. In comparison to the wild type, the mutant showed an increased callose deposition in the rachilla node, the transition zone from the floret to the rachilla. The integration of AtGSL5, a callose synthase from *A. thaliana*, led to an enhanced callose deposition after a *F. graminearum* infection in comparison to the wild type plant. Furthermore, an enhanced type II resistance was observed, which further supports the importance of callose deposition during a *F. graminearum* infection in *B. distachyon*. The identification of endogenous callose synthases from *B. distachyon* was a first crucial step to transfer the results onto wheat. Based on expression studies, the callose synthase BdGSL2 was identified among 11 putative callose synthases as a putative functional homolog of AtGSL5.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- AIST, J. R. (1976) Papillae and Related Wound Plugs of Plant-Cells. *Annual Review of Phytopathology* 14: 145-163
- ALLWOOD, J. W., ELLIS, D. I., HEALD, J. K., GOODACRE, R., MUR, L. A. (2006) Metabolomic approaches reveal that phosphatidic and phosphatidyl glycerol phospholipids are major discriminatory non-polar metabolites in responses by *Brachypodium distachyon* to challenge by *Magnaporthe grisea*. *Plant Journal* 46: 351-368
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215: 403-410
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25: 3389-3402
- ALVES, S. C., WORLAND, B., THOLE, V., SNAPE, J. W., BEVAN, M. W., VAIN, P. (2009) A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nat. Protocols* 4: 638-649
- AMOR, Y., HAIGLER, C. H., JOHNSON, S., WAINSCOTT, M., DELMER, D. P. (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 9353-9357
- ANNIS, S. L., GOODWIN, P. H. (1997) Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 103: 1-14
- ARORA, R., MANISSERI, C., LI, C., ONG, M., SCHELLER, H., VOGEL, K., SIMMONS, B., SINGH, S. (2010) Monitoring and Analyzing Process Streams Towards Understanding Ionic Liquid Pretreatment of Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *BioEnergy Research* 3: 134-145
- ASPINALL, G. O., KESSLER, G. (1957) The structure of callose from the grape vine. *Chemistry and Industry, London*
- BACIC, A., FINCHER, G. B., STONE, B. A. (2009) *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*. Academic Press
- BAI, G., SHANER, G. (2004) Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* Head Blight. *Annual Review of Phytopathology* 42: 135-161
- BAI, G. H., DESJARDINS, A. E., PLATTNER, R. D. (2002) Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* Causes Initial Infection, but does not Cause Disease Spread in Wheat Spikes. *Mycopathologia* 153: 91-98

- BAYLES, C. J., GHEMAWAT, M. S., AIST, J. R. (1990) Inhibition by 2-deoxy-D-glucose of callose formation, papilla deposition, and resistance to powdery mildew in an *ml-o* barley mutant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 63-72
- BECHTEL, D., KALEIKAU, L., GAINES, R., SEITZ, L. (1985) The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels. *Cereal Chemistry* 62: 191-197
- BLUHM, B. H., ZHAO, X., FLAHERTY, J. E., XU, J. R., DUNKLE, L. D. (2007) RAS2 regulates growth and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular plant-microbe interactions* 20: 627-636
- BOYACIOGLU, D., HETTIARACHCHY, N. (1995) Changes in some biochemical components of wheat grain that was infected with *Fusarium graminearum*. *Journal of Cereal Science* 21: 57-62
- BRKLJACIC, J., GROTEWOLD, E., SCHOLL, R., MOCKLER, T., GARVIN, D. F., VAIN, P., BRUTNELL, T., SIBOUT, R., BEVAN, M., BUDAK, H., CAICEDO, A. L., GAO, C., GU, Y., HAZEN, S. P., HOLT, B. F., 3RD, HONG, S. Y., JORDAN, M., MANZANEDA, A. J., MITCHELL-OLDS, T., MOCHIDA, K., MUR, L. A., PARK, C. M., SEDBROOK, J., WATT, M., ZHENG, S. J., VOGEL, J. P. (2011) Brachypodium as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiol* 157: 3-13
- BROOHAERTS, W., MITCHELL, H. J., WEIR, B., KAINES, S., SMITH, L. M. A., YANG, W., MAYER, J. E., ROA-RODRIGUEZ, C., JEFFERSON, R. A. (2005) Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433: 629-633
- BROWN, I., TRETOWAN, J., KERRY, M., MANSFIELD, J., BOLWELL, G. P. (1998) Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *The Plant Journal* 15: 333-343
- BROWN, N. A., URBAN, M., VAN DE MEENE, A. M. L., HAMMOND-KOSACK, K. E. (2010) The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology* 114: 555-571
- BROWNFIELD, L., DOBLIN, M., FINCHER, G. B., BACIC, A. (2009) Biochemical and molecular properties of biosynthetic enzymes for (1, 3)- $\beta$ -glucans in embryophytes, chlorophytes and rhodophytes. *Chemistry, Biochemistry and Biology of (1, 3)-Beta Glucans and Related Polysaccharides*, Ed 2: 283-326
- BUCKERIDGE, M. S., RAYON, C., URBANOWICZ, B., TINÉ, M. A. S., CARPITA, N. C. (2004) Mixed Linkage (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -d-Glucans of Grasses. *Cereal Chemistry Journal* 81: 115-127
- BUERSTMAYR, H., BAN, T., ANDERSON, J. A. (2009) QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* 128: 1-26
- BURTON, R., FINCHER, G. (2012) Current challenges in cell wall biology in the cereals and grasses. *Frontiers in Plant Science* 3: 130
- BURTON, R. A., GIDLEY, M. J., FINCHER, G. B. (2010) Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat Chem Biol* 6: 724-732

- BÜSCHGES, R., HOLLRICHER, K., PANSTRUGA, R., SIMONS, G., WOLTER, M., FRIJTERS, A., VAN DAELEN, R., VAN DER LEE, T., DIERGAARDE, P., GROENENDIJK, J. (1997) The Barley *Mlo* Gene: A Novel Control Element of Plant Pathogen Resistance. *Cell* 88: 695-705
- BUSHNELL, W., HAZEN, B., PRITSCH, C., LEONARD, K. (2003) Histology and physiology of Fusarium head blight. *Fusarium head blight of wheat and barley*: 44-83
- CAFFREY, D. R., O'NEILL, L. A., SHIELDS, D. C. (1999) The evolution of the MAP kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. *Journal of molecular evolution* 49: 567-582
- CARPITA, N. C. (1996) Structure and Biogenesis of the Cell Walls of Grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445-476
- CARPITA, N. C., GIBEAUT, D. M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1-30
- CERVONE, F., HAHN, M. G., DE LORENZO, G., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P. (1989) Host-pathogen interactions XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiol* 90: 542-548
- CHAKRABORTY, S., NEWTON, A. C. (2011) Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology* 60: 2-14
- CHEN, L., KAMISAKA, S., HOSON, T. (1999) Suppression of (1→3),(1→4)-β-D-glucan turnover during light-induced inhibition of rice coleoptile growth. *Journal of Plant Research* 112: 7-13
- CHEN, X. Y., KIM, J. Y. (2009) Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal Behav* 4: 489-492
- CHRISTENSEN, N. M., AXELSEN, K. B., NICOLAISEN, M., SCHULZ, A. (2005) Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in plant science* 10: 526-535
- CHRISTIANSEN, P., ANDERSEN, C. H., DIDION, T., FOLLING, M., NIELSEN, K. K. (2005) A rapid and efficient transformation protocol for the grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Rep* 23: 751-758
- COBB, M. H. (1999) MAP kinase pathways. *Progress in biophysics and molecular biology* 71: 479-500
- COHN, J., SESSA, G., MARTIN, G. B. (2001) Innate immunity in plants. *Current opinion in immunology* 13: 55-62
- CONSONNI, C., BEDNAREK, P., HUMPHRY, M., FRANCOCCI, F., FERRARI, S., HARZEN, A., VER LOREN VAN THEMAAT, E., PANSTRUGA, R. (2010) Tryptophan-derived metabolites are required for antifungal defense in the *Arabidopsis mlo2* mutant. *Plant Physiol* 152: 1544-1561
- COSGROVE, D. J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology* 6: 850-861
- COWGER, C., SUTTON, A. L. (2005) The southeastern U.S. Fusarium head blight epidemic of 2003. *Plant Health Progress* 10

- CUI, X., SHIN, H., SONG, C., LAOSINCHAI, W., AMANO, Y., BROWN JR, R. M. (2001) A putative plant homolog of the yeast  $\beta$ -1,3-glucan synthase subunit *FKS1* from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibers. *Planta* 213: 223-230
- CUMAGUN, C. J. R., BOWDEN, R. L., JURGENSON, J. E., LESLIE, J. F., MIEDANER, T. (2004) Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology* 94: 520-526
- CUTLER, H. G. (1988) Trichothecenes and Their Role in the Expression of Plant Disease. *In* Biotechnology for Crop Protection, Vol 379. American Chemical Society, pp 50-72
- CUZICK, A., URBAN, M., HAMMOND-KOSACK, K. (2008) *Fusarium graminearum* gene deletion mutants *map1* and *tri5* reveal similarities and differences in the pathogenicity requirements to cause disease on *Arabidopsis* and wheat floral tissue. *New Phytol* 177: 990-1000
- D'OVIDIO, R., MATTEI, B., ROBERTI, S., BELLINCAMPI, D. (2004) Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1696: 237-244
- D'MELLO, J. P. F., PLACINTA, C. M., MACDONALD, A. M. C. (1999) *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80: 183-205
- DE RUITER, J. M., BURNS, J. C. (1987) Characterization of trifluoroacetic acid hydrolyzed subtropical forage grass cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 308-316
- DELMER, D. P. (1987) Cellulose Biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 259-290
- DENOUX, C., GALLETI, R., MAMMARELLA, N., GOPALAN, S., WERCK, D., DE LORENZO, G., FERRARI, S., AUSUBEL, F. M., DEWDNEY, J. (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Molecular Plant* 1: 423-445
- DESJARDINS, A. E., HOHN, T. M., MCCORMICK, S. P. (1993) Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological Reviews* 57: 595-604
- DEVOTO, A., PIFFANELLI, P., NILSSON, I., WALLIN, E., PANSTRUGA, R., VON HEIJNE, G., SCHULZE-LEFERT, P. (1999) Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *Journal of Biological Chemistry* 274: 34993-35004
- DING, L., XU, H., YI, H., YANG, L., KONG, Z., ZHANG, L., XUE, S., JIA, H., MA, Z. (2011) Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS ONE* 6: e19008
- DOBLIN, M. S., DE MELIS, L., NEWBIGIN, E., BACIC, A., READ, S. M. (2001) Pollen Tubes of *Nicotiana glauca* Express Two Genes from Different  $\beta$ -Glucan Synthase Families. *Plant Physiol* 125: 2040-2052

- DOBLIN, M. S., KUREK, I., JACOB-WILK, D., DELMER, D. P. (2002) Cellulose Biosynthesis in Plants: from Genes to Rosettes. *Plant and Cell Physiology* 43: 1407-1420
- DOBLIN, M. S., PETTOLINO, F., BACIC, A. (2010) Evans Review: Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Functional Plant Biology* 37: 357-381
- DOOHAN, F. M., WESTON, G., REZANOOR, H. N., PARRY, D. W., NICHOLSON, P. (1999) Development and Use of a Reverse Transcription-PCR Assay To Study Expression of *Tri5* by *Fusarium* Species In Vitro and In Planta. *Applied and environmental microbiology* 65: 3850-3854
- DRAPER, J., MUR, L. A., JENKINS, G., GHOSH-BISWAS, G. C., BABLAK, P., HASTEROK, R., ROUTLEDGE, A. P. (2001) *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol* 127: 1539-1555
- EDREVA, A., VELIKOVA, V., TSONEV, T. (2007) Phenylamides in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 54: 287-301
- ELLINGER, D., NAUMANN, M., FALTER, C., ZWIKOWICS, C., JAMROW, T., MANISSERI, C., SOMERVILLE, S. C., VOIGT, C. A. (2013) Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in Arabidopsis. *Plant Physiol*
- ENNS, L. C., KANAOKA, M. M., TORII, K. U., COMAI, L., OKADA, K., CLELAND, R. E. (2005) Two callose synthases, *GSL1* and *GSL5*, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. *Plant Molecular Biology* 58: 333-349
- EVANS, N. A., HOYNE, P. A., STONE, B. A. (1984) Characteristics and specificity of the interaction of a fluorochrome from aniline blue (sirofluor) with polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 4: 215-230
- EVERT, R. F. (2009) *Esaus Pflanzenanatomie: Meristeme, Zellen und Gewebe der Pflanzen-ihre Struktur, Funktion und Entwicklung*. de Gruyter
- FAO (2013) FAOSTAT-Agriculture. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. 17.4.2013
- FERGUSON, C., TEERI, T., SIIKA-AHO, M., READ, S., BACIC, A. (1998) Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 206: 452-460
- FERRARI, S., SAVATIN, D. V., SICILIA, F., GRAMEGNA, G., CERVONE, F., DE LORENZO, G. (2013) Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science* 4: 49
- FOROUD, N., EUDES, F. (2009) Trichothecenes in Cereal Grains. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 147-173
- FORSYTH, D. M., YOSHIZAWA, T., MOROOKA, N., TUIITE, J. (1977) Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. *Applied and environmental microbiology* 34: 547-552
- GARVIN, D. F. (2007) *Brachypodium*: a new monocot model plant system emerges. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 1177-1179
- GILBERT, J., FERNANDO, W. G. D. (2004) Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae* / *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 464-472

- GOSWAMI, R. S., KISTLER, H. C. (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5: 515-525
- GOSWAMI, R. S., KISTLER, H. C. (2005) Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology* 95: 1397-1404
- GUILLOIN, F., BOUCHET, B., JAMME, F., ROBERT, P., QUÉMÉNER, B., BARRON, C., LARRÉ, C., DUMAS, P., SAULNIER, L. (2011) *Brachypodium distachyon* grain: characterization of endosperm cell walls. *Journal of Experimental Botany* 62: 1001-1015
- GUNNAIAH, R., KUSHALAPPA, A. C., DUGGAVATHI, R., FOX, S., SOMERS, D. J. (2012) Integrated metabolite-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (*Fhb1*) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 7: e40695
- HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773
- HATFIELD, R. D., WILSON, J. R., MERTENS, D. R. (1999) Composition of cell walls isolated from cell types of grain sorghum stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 891-899
- HENRY, R., HARRIS, P. (1997) Molecular Distinction between Monocotyledons and Dicotyledons: more than a simple dichotomy. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 216-218
- HEREDIA, A., JIMENEZ, A., GUILLEN, R. (1995) Composition of plant cell walls. *Z Lebensm Unters Forsch* 200: 24-31
- HOHN, T. M., DESJARDINS, A. E. (1992) Isolation and gene disruption of the *Tox5* gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 5: 249-256
- HONG, S. Y., PARK, J. H., CHO, S. H., YANG, M. S., PARK, C. M. (2011) Phenological growth stages of *Brachypodium distachyon*: codification and description. *Weed Research*: no-no
- HONG, Z., DELAUNEY, A. J., VERMA, D. P. S. (2001a) A Cell Plate-Specific Callose Synthase and Its Interaction with Phragmoplastin. *Plant Cell* 13: 755-768
- HONG, Z., ZHANG, Z., OLSON, J. M., VERMA, D. P. S. (2001b) A Novel UDP-Glucose Transferase Is Part of the Callose Synthase Complex and Interacts with Phragmoplastin at the Forming Cell Plate. *Plant Cell* 13: 769-780
- HOSON, T., NEVINS, D. J. (1989)  $\beta$ -d-Glucan antibodies inhibit auxin-induced cell elongation and changes in the cell wall of *Zea* coleoptile segments. *Plant Physiol* 90: 1353-1358
- HUGHES, J., GUNNING, B. (1980) Glutaraldehyde-induced deposition of callose. *Canadian Journal of Botany* 58: 250-258
- IYAMA, K., LAM, T. B. T., MEIKLE, P. J., NG, K., RHODES, D. I., STONE, B. A. (1993) Cell wall biosynthesis and its regulation. Forage cell wall structure and digestibility: 621-683

- ILGEN, P. (2010) Biotische und abiotische Faktoren der Induktion der Trichothecen-Biosynthese des Weizenpathogens *Fusarium graminearum* (Schwabe). Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg, Hamburg
- ILGEN, P., HADELER, B., MAIER, F. J., SCHAFFER, W. (2009) Developing kernel and rachis node induce the trichothecene pathway of *Fusarium graminearum* during wheat head infection. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 899-908
- INITIATIVE, I. B. (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463: 763-768
- IORDANOV, M. S., PRIBNOW, D., MAGUN, J. L., DINH, T.-H., PEARSON, J. A., CHEN, S., MAGUN, B. E. (1997) Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Molecular and cellular biology* 17: 3373-3381
- IVAKOV, A., PERSSON, S. (2001) Plant Cell Walls. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd
- JACOBS, A. K., LIPKA, V., BURTON, R. A., PANSTRUGA, R., STRIZHOV, N., SCHULZE-LEFERT, P., FINCHER, G. B. (2003) An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *Plant Cell* 15: 2503-2513
- JANSEN, C., VON WETTSTEIN, D., SCHAFFER, W., KOGEL, K. H., FELK, A., MAIER, F. J. (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16892-16897
- JENCZMIONKA, N. J., MAIER, F. J., LÖSCH, A. P., SCHÄFER, W. (2003) Mating, conidiation and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main causal agent of the head-blight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase gpmk1. *Current Genetics* 43: 87-95
- JENCZMIONKA, N. J., SCHÄFER, W. (2005) The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. *Current Genetics* 47: 29-36
- JONES, J. D. G., DANGL, J. L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- KANG, Z., BUCHENAUER, H. (2000) Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 255-268
- KANG, Z., BUCHENAUER, H. (2002) Studies on the Infection Process of *Fusarium Culmorum* in Wheat Spikes: Degradation of Host Cell Wall Components and Localization of Trichothecene Toxins in Infected Tissue. *European Journal of Plant Pathology* 108: 653-660
- KAUR, N., STREET, K., MACKAY, M., YAHIAOUI, N., KELLER, B. (2008) Molecular approaches for characterization and use of natural disease resistance in wheat. In Collinge, D., Munk, L., Cooke, B. M., eds, Sustainable disease management in a European context. Springer Netherlands, pp 387-397

- KAUSS, H., JEBLICK, W. (1986a) Influence of Free Fatty Acids, Lysophosphatidylcholine, Platelet-Activating Factor, Acylcarnitine, and Echinocandin B on 1,3- $\beta$ -D-Glucan Synthase and Callose Synthesis. *PLANT PHYSIOLOGY* 80: 7-13
- KAUSS, H., JEBLICK, W. (1986b) Synergistic activation of 1,3- $\beta$ -d-glucan synthase by Ca<sup>2+</sup> and polyamines. *Plant Science* 43: 103-107
- KAUSS, H., WALDMANN, T., QUADER, H. (1990) Ca<sup>2+</sup> as a signal in the induction of callose synthesis. Signal perception and transduction in higher plants, Ranjeva, R., Boudet, A., eds. Springer, Berlin Heidelberg New York
- KAZAN, K., GARDINER, D. M., MANNERS, J. M. (2012) On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Molecular Plant Pathology* 13: 399-413
- KIM, J.-B., OLEK, A. T., CARPITA, N. C. (2000) Cell Wall and Membrane-Associated Exo- $\beta$ -d-Glucanases from Developing Maize Seedlings. *Plant Physiol* 123: 471-486
- KIM, M. C., PANSTRUGA, R., ELLIOTT, C., MÜLLER, J., DEVOTO, A., YOON, H. W., PARK, H. C., CHO, M. J., SCHULZE-LEFERT, P. (2002) Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416: 447-451
- KOH, S., ANDRÉ, A., EDWARDS, H., EHRHARDT, D., SOMERVILLE, S. (2005) Arabidopsis thaliana subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections. *The Plant Journal* 44: 516-529
- KÖHLE, H., JEBLICK, W., POTEN, F., BLASCHEK, W., KAUSS, H. (1985) Chitosan-Elicited Callose Synthesis in Soybean Cells as a Ca<sup>2+</sup>-Dependent Process. *Plant Physiol.* 77: 544-551
- KONCZ, C., SCHELL, J. (1986) The promoter of T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* MGG 204: 383-396
- KRSKA, R., BAUMGARTNER, S., JOSEPHS, R. (2001) The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 371: 285-299
- LANGEVIN, F., EUDES, F., COMEAU, A. (2004) Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during Fusarium head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology* 110: 735-746
- LAZO, G. R., STEIN, P. A., LUDWIG, R. A. (1991) A DNA Transformation-Competent Arabidopsis Genomic Library in *Agrobacterium*. *Nat Biotech* 9: 963-967
- LEACH, J., LANG, B. R., YODER, O. C. (1982) Methods for Selection of Mutants and In Vitro Culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *Journal of General Microbiology* 128: 1719-1729
- LEMMENS, M., SCHOLZ, U., BERTHILLER, F., DALL'ASTA, C., KOUTNIK, A., SCHUHMACHER, R., ADAM, G., BUERSTMAYR, H., MESTERHÁZY, Á., KRSKA, R. (2005) The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for Fusarium head blight resistance in wheat. *Molecular plant-microbe interactions* 18: 1318-1324

- LEVY, A., EPEL, B. L. (2009) Cytology of the (1→3)-beta-glucan (callose) in plasmodesmata and sieve plate pores. *Chemistry, biochemistry and biology of (1, 3)-beta glucans and related polysaccharides*. Academic, San Diego: 439-463
- LEVY, S., STAEHELIN, L. A. (1992) Synthesis, assembly and function of plant cell wall macromolecules. *Current Opinion in Cell Biology* 4: 856-862
- MADGWICK, J. W., WEST, J. S., WHITE, R. P., SEMENOV, M. A., TOWNSEND, J. A., TURNER, J. A., FITT, B. D. L. (2011) Impacts of climate change on wheat anthesis and fusarium ear blight in the UK. *European Journal of Plant Pathology* 130: 117-131
- MAIER, F. J., MIEDANER, T., HADELER, B., FELK, A., SALOMON, S., LEMMENS, M., KASSNER, H., SCHÄFER, W. (2006) Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* 7: 449-461
- MARCIA, M. D. O. (2009) Feruloylation in grasses: current and future perspectives. *Molecular Plant* 2: 861-872
- MAURITZ, R., MOURITZEN, P., PFUNDHELLER, H., TOLSTRUP, N., LOMHOLT, C. (2005) Universal ProbeLibrary Set: One Transcriptome-One Kit. *BIOCHEMICAL-MANNHEIM- 2*: 22
- MAZUR, P., BAGINSKY, W. (1996) In vitro activity of 1, 3-β-d-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *Journal of Biological Chemistry* 271: 14604-14609
- MCLUSKY, S. R., BENNETT, M. H., BEALE, M. H., LEWIS, M. J., GASKIN, P., MANSFIELD, J. W. (1999) Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal* 17: 523-534
- MCMULLEN, M., JONES, R., GALLENBERG, D. (1997) Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease* 81: 1340-1348
- MEIKLE, P. J., BONIG, I., HOOGENRAAD, N. J., CLARKE, A. E., STONE, B. A. (1991) The location of (1→3)-β-glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1→3)-β-glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* 185: 1-8
- MEINKE, D. W., CHERRY, J. M., DEAN, C., ROUNSLEY, S. D., KOORNNEEF, M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282: 662-682
- MESTERHÁZY, A. (1995) Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. *Plant Breeding* 114: 377-386
- MESTERHÁZY, A., BARTOK, T., MIROCHA, C., KOMOROCZY, R. (1999) Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding* 118: 97-110
- MIEDANER, T. (1997) Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant Breeding* 116: 201-220
- MIEDANER, T., REINBRECHT, C., SCHILLING, A. G. (2000) Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of

- Fusarium graminearum* in winter rye head blight, Vol 107. Ulmer, Stuttgart, ALLEMAGNE
- MILLER, J. D., ARNISON, P. G. (1986) Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the fusarium head blight resistant wheat cultivar Frontana. Canadian Journal of Plant Pathology 8: 147-150
- MILLER, J. D., YOUNG, J. C., SAMPSON, D. R. (1985) Deoxynivalenol and Fusarium Head Blight Resistance in Spring Cereals. Journal of Phytopathology 113: 359-367
- MILLER, S. S., CHABOT, D. M. P., OUELLET, T. R. S., HARRIS, L. J., FEDAK, G. (2004) Use of a *Fusarium graminearum* strain transformed with green fluorescent protein to study infection in wheat (*Triticum aestivum*). Canadian Journal of Plant Pathology 26: 453-463
- MOERSCHBACHER, B. M., NOLL, U., GORRICHON, L., REISNER, H.-J. (1990) Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. Plant Physiol 93: 465-470
- MOURA, J. C. M. S., BONINE, C. A. V., DE OLIVEIRA FERNANDES VIANA, J., DORNELAS, M. C., MAZZAFERA, P. (2010) Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants. Journal of Integrative Plant Biology 52: 360-376
- MUR, L. A. J., ALLAINGUILLAUME, J., CATALÁN, P., HASTEROK, R., JENKINS, G., LESNIEWSKA, K., THOMAS, I., VOGEL, J. (2011) Exploiting the Brachypodium Tool Box in cereal and grass research. New Phytologist 191: no-no
- MÜSE, G., SCHINDLER, T., BERGFELD, R., RUEL, K., JACQUET, G., LAPIERRE, C., SPETH, V., SCHOPFER, P. (1997) Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. Planta 201: 146-159
- NAKASHIMA, J., LAOSINCHAI, W., CUI, X., MALCOLM BROWN, R. (2003) New insight into the mechanism of cellulose and callose biosynthesis: proteases may regulate callose biosynthesis upon wounding. Cellulose 10: 369-389
- NAUMANN, M., SOMERVILLE, S., VOIGT, C. (2013) Differences in early callose deposition during adapted and non-adapted powdery mildew infection of resistant Arabidopsis lines. Plant Signaling & Behavior 8: e24408
- NICHOLSON, P. (2001) *Fusarium* and *Fusarium*-Cereal Interactions. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd
- NICHOLSON, R. L., HAMMERSCHMIDT, R. (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annual Review of Phytopathology 30: 369-389
- NIRENBERG, H. I. (1981) A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. Canadian Journal of Botany 59: 1599-1609
- NISHIMURA, M. T., STEIN, M., HOU, B.-H., VOGEL, J. P., EDWARDS, H., SOMERVILLE, S. C. (2003) Loss of a Callose Synthase Results in Salicylic Acid-Dependent Disease Resistance. Science 301: 969-972

- NISHIUCHI, T., MASUDA, D., NAKASHITA, H., ICHIMURA, K., SHINOZAKI, K., YOSHIDA, S., KIMURA, M., YAMAGUCHI, I., YAMAGUCHI, K. (2006) *Fusarium* Phytotoxin Trichothecenes Have an Elicitor-Like Activity in *Arabidopsis thaliana*, but the Activity Differed Significantly Among Their Molecular Species. *Molecular plant-microbe interactions* 19: 512-520
- NÜHSE, T. S. (2012) Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* 3
- ØBRO, J., HARHOLT, J., SCHELLER, H. V., ORFILA, C. (2004) Rhamnogalacturonan I in *Solanum tuberosum* tubers contains complex arabinogalactan structures. *Phytochemistry* 65: 1429-1438
- OCHOA-VILLARREAL, M., AISPURÓ-HERNÁNDEZ, E., VARGAS-ARISPURO, I., MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. Á. (2012) Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In Gomes, A. D. S., ed, *Polymerization*. InTech
- OPANOWICZ, M., VAIN, P., DRAPER, J., PARKER, D., DOONAN, J. H. (2008) *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild grass. *Trends in Plant Science* 13: 172-177
- OPDENAKKER, K., REMANS, T., VANGRONSVELD, J., CUYPERS, A. (2012) Mitogen-activated protein (MAP) kinases in plant metal stress: regulation and responses in comparison to other biotic and abiotic stresses. *International journal of molecular sciences* 13: 7828-7853
- ØSTERGAARD, L., PETERSEN, M., MATTSSON, O., MUNDY, J. (2002) An *Arabidopsis* callose synthase. *Plant Molecular Biology* 49: 559-566
- OZDEMIR, B. S., HERNANDEZ, P., FILIZ, E., BUDAK, H. (2008) *Brachypodium* genomics. *Int J Plant Genomics* 2008: 536104
- PALLOTTA, M. A., GRAHAM, R. D., LANGRIDGE, P., SPARROW, D. H. B., BARKER, S. J. (2000) RFLP mapping of manganese efficiency in barley. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 101: 1100-1108
- PARKER, D., BECKMANN, M., ENOT, D. P., OVERY, D. P., RIOS, Z. C., GILBERT, M., TALBOT, N., DRAPER, J. (2008) Rice blast infection of *Brachypodium distachyon* as a model system to study dynamic host/pathogen interactions. *Nat Protoc* 3: 435-445
- PARRY, D. W., JENKINSON, P., MCLEOD, L. (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology* 44: 207-238
- PATTATHIL, S., AVCI, U., BALDWIN, D., SWENNES, A. G., MCGILL, J. A., POPPER, Z., BOOTTEN, T., ALBERT, A., DAVIS, R. H., CHENNAREDDY, C., DONG, R., O'SHEA, B., ROSSI, R., LEOFF, C., FRESHOUR, G., NARRA, R., O'NEIL, M., YORK, W. S., HAHN, M. G. (2010) A Comprehensive Toolkit of Plant Cell Wall Glycan-Directed Monoclonal Antibodies. *PLANT PHYSIOLOGY* 153: 514-525
- PERALDI, A., BECCARI, G., STEED, A., NICHOLSON, P. (2011) *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study *Fusarium* head blight and other *Fusarium* diseases of wheat. *BMC Plant Biology* 11: 100
- PESTKA, J. J. (2007) Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137: 283-298

- PESTKA, J. J. (2008) Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Additives & Contaminants: Part A* 25: 1128-1140
- PESTKA, J. J., SMOLINSKI, A. T. (2005) Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* 8: 39-69
- PETERHÄNSEL, C., FREIALDENHOVEN, A., KURTH, J., KOLSCH, R., SCHULZE-LEFERT, P. (1997) Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *The Plant Cell Online* 9: 1397-1409
- PFAFFL, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45-e45
- PFAFFL, M. W. (2003) *Livestock Transcriptomics: Quantitative mRNA Analytics in Molecular Endocrinology and Physiology*. Habilitation. Technische Universität München - Weihenstephan
- PIFFANELLI, P., ZHOU, F., CASAIS, C., ORME, J., JAROSCH, B., SCHAFFRATH, U., COLLINS, N. C., PANSTRUGA, R., SCHULZE-LEFERT, P. (2002) The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol* 129: 1076-1085
- PILLING, E., HÖFTE, H. (2003) Feedback from the wall. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 611-616
- PLACINTA, C. M., D'MELLO, J. P. F., MACDONALD, A. M. C. (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78: 21-37
- POPENBERGER, B., BERTHILLER, F., LUCYSHYN, D., SIEBERER, T., SCHUHMACHER, R., KRŠKA, R., KUCHLER, K., GLÖSSL, J., LUSCHNIG, C., ADAM, G. (2003) Detoxification of the *Fusarium* Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 278: 47905-47914
- PRASHER, D. C. (1995) Using GFP to see the light. *Trends in genetics: TIG* 11: 320
- PRITSCH, C., MUEHLBAUER, G. J., BUSHNELL, W. R., SOMERS, D. A., VANCE, C. P. (2000) Fungal Development and Induction of Defense Response Genes During Early Infection of Wheat Spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular plant-microbe interactions* 13: 159-169
- PRITSCH, C., VANCE, C. P., BUSHNELL, W. R., SOMERS, D. A., HOHN, T. M., MUEHLBAUER, G. J. (2001) Systemic expression of defense response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 1-12
- PROCTOR, R. H., HOHN, T. M., MCCORMICK, S. P. (1995) Reduced Virulence of *Gibberella zeae* Caused by Disruption of a Trichthecine Toxin Biosynthetic Gene. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8: 1995-1908

- QADOTA, H., PYTHON, C. P., INOUE, S. B., ARISAWA, M., ANRAKU, Y., ZHENG, Y., WATANABE, T., LEVIN, D. E., OHYA, Y. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1, 3-beta-glucan synthase. *Science* 272: 279
- RANCOUR, D. M., MARITA, J. M., HATFIELD, R. D. (2012) Cell wall composition throughout development for the model grass *Brachypodium distachyon*. *Frontiers in Plant Science* 3: 266
- REN, D., YANG, H., ZHANG, S. (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 277: 559-565
- RIBICHICH, K. F., LOPEZ, S. E., VEGETTI, A. C. (2000) Histopathological Spikelet Changes Produced by *Fusarium graminearum* in Susceptible and Resistant Wheat Cultivars. *Plant disease* 84: 794-802
- RICHMOND, T. A., SOMERVILLE, C. R. (2000) The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiol* 124: 495-498
- ROCHA, O., ANSARI, K., DOOHAN, F. M. (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants* 22: 369-378
- ROUTLEDGE, A. P., SHELLEY, G., SMITH, J. V., TALBOT, N. J., DRAPER, J., MUR, L. A. (2004) *Magnaporthe grisea* interactions with the model grass *Brachypodium distachyon* closely resemble those with rice (*Oryza sativa*). *Mol Plant Pathol* 5: 253-265
- SALAMINI, F., OZKAN, H., BRANDOLINI, A., SCHAFER-PREGL, R., MARTIN, W. (2002) Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nat Rev Genet* 3: 429-441
- SALOMON, S., GÁCSER, A., FRERICHMANN, S., KRÖGER, C., SCHÄFER, W., VOIGT, C. (2012) The secreted lipase FGL1 is sufficient to restore the initial infection step to the apathogenic *Fusarium graminearum* MAP kinase disruption mutant *Δgpmk1*. *European Journal of Plant Pathology*: 1-15
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Vol 2. CSHL press
- SAMUELS, A. L., GIDDINGS, T. H., STAEHELIN, L. A. (1995) Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *The Journal of cell biology* 130: 1345-1357
- SCALBERT, A., MONTIES, B., LALLEMAND, J.-Y., GUITTET, E., ROLANDO, C. (1985) Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24: 1359-1362
- SHELLER, H. V., ULVSKOV, P. (2010) Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61: 263-289
- SCHROEDER, H. W., CHRISTENSEN, J. J. (1963) Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831-838

- SCHULZE-LEFERT, P., PANSTRUGA, R. (2003) Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 41: 641-667
- SEIFERT, G. J., BLAUKOPF, C. (2010) Irritable walls: the plant extracellular matrix and signaling. *Plant Physiol* 153: 467-478
- SHAN, Q., WANG, Y., CHEN, K., LIANG, Z., LI, J., ZHANG, Y., ZHANG, K., LIU, J., VOYTAS, D. F., ZHENG, X. (2013) Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Molecular Plant*
- SHIFRIN, V. I., ANDERSON, P. (1999) Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 274: 13985-13992
- SKOU, J. P., JØRGENSEN, J. H., LILHOLT, U. (1984) Comparative Studies on Callose Formation in Powdery Mildew Compatible and Incompatible Barley. *Journal of Phytopathology* 109: 147-168
- SLIKOVA, S., HAVRLETOVA, M., SUDYOVA, V., MIHALIK, D., GREGOVA, E. (2008) Cell wall beta-D-glucan during disease progress (*Fusarium* head blight) in wheat spikes. *Cereal Research Communications* 36: 167-169
- SMART, M. G., AIST, J. R., ISRAEL, H. W. (1986) Structure and function of wall appositions. 1. General histochemistry of papillae in barley coleoptiles attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Canadian Journal of Botany* 64: 793-801
- STACK, R. W. (2000) Return of an old problem: *Fusarium* head blight of small grains. *APSnet Plant Health Reviews*
- STASS, A., HORST, W. J. (2009) Callose in Abiotic Stress. In Antony, B., Geoffrey, B. F., Bruce A. Stone A2 - Antony Bacic, G. B. F., Bruce, A. S., eds, *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*. Academic Press, San Diego, pp 499-524
- STEIN, M., DITTGEN, J., SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C., HOU, B.-H., MOLINA, A., SCHULZE-LEFERT, P., LIPKA, V., SOMERVILLE, S. (2006) *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *The Plant Cell Online* 18: 731-746
- STONE, B. (2001) Callose and Related Glucans. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd
- STONE, B. A., CLARKE, A. E. (1992) *Chemistry and Biology of (1→3)-β-glucans*. La Trobe University Press, Bundoora
- SUBBAIAH, C. C., SACHS, M. M. (2001) Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedlings. *Plant Physiol* 125: 585-594
- THIELE, K., WANNER, G., KINDZIERSKI, V., JÜRGENS, G., MAYER, U., PACHL, F., ASSAAD, F. F. (2009) The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 58: 13-26

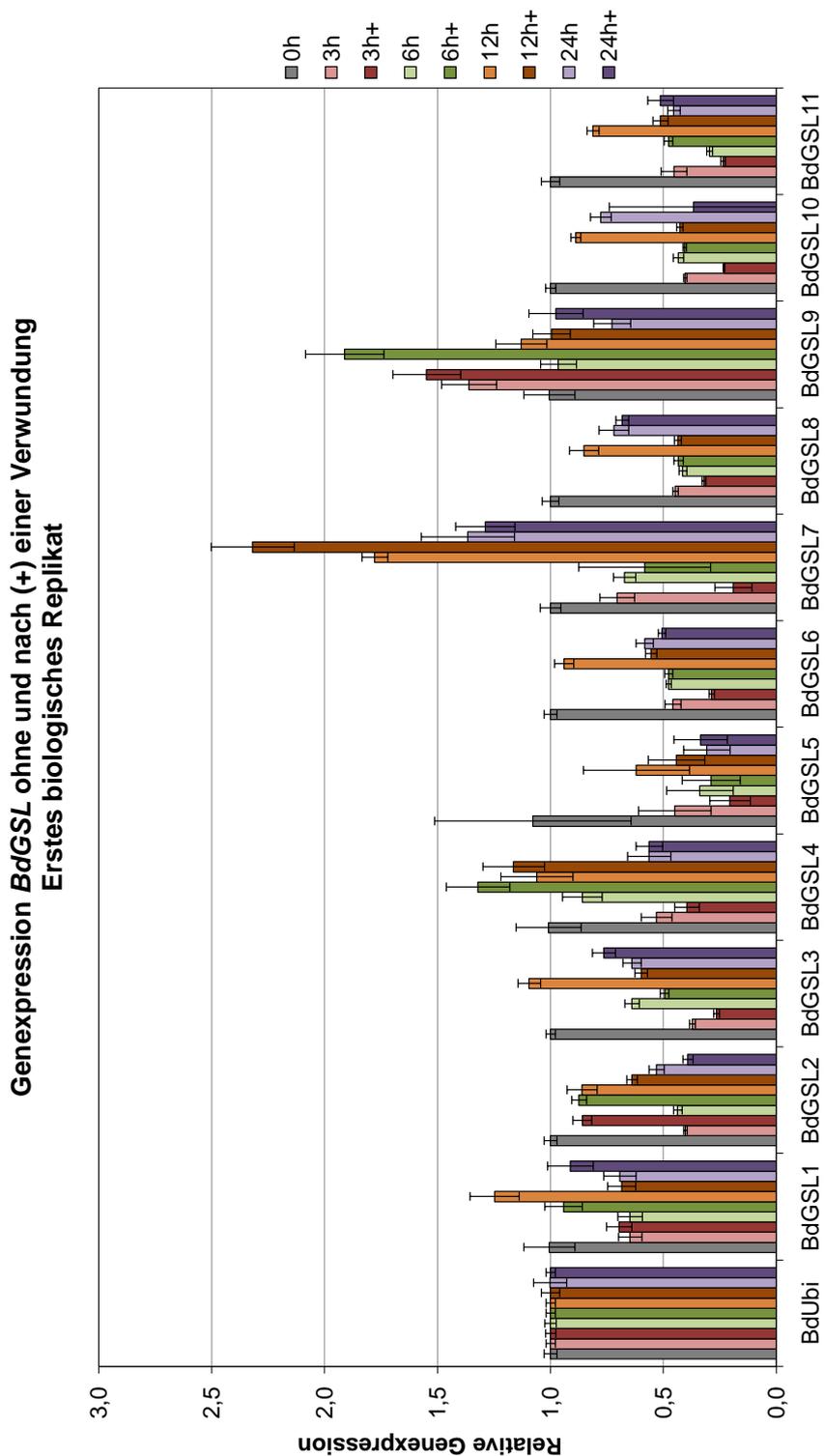
- THOLE, V., WORLAND, B., WRIGHT, J., BEVAN, M. W., VAIN, P. (2010) Distribution and characterization of more than 1000 T-DNA tags in the genome of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Plant Biotechnology Journal* 8: 734-747
- THORDAL-CHRISTENSEN, H., ZHANG, Z., WEI, Y., COLLINGE, D. B. (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11: 1187-1194
- TRAIL, F. (2009) For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiol* 149: 103-110
- TRENHOLM, H. L., HAMILTON, R. M., FRIEND, D. W., THOMPSON, B. K., HARTIN, K. E. (1984) Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat: effects on swine, poultry, and dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 185: 527-531
- TUCKER, M. R., PAECH, N. A., WILLEMSE, M. T., KOLTUNOW, A. M. (2001) Dynamics of callose deposition and  $\beta$ -1, 3-glucanase expression during reproductive events in sexual and apomictic *Hieracium*. *Planta* 212: 487-498
- UENO, Y. (1977) Mode of action of trichothecenes. *Annales de la nutrition et de l'alimentation* 31: 885-900
- UENO, Y. (1984) Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundamental and Applied Toxicology* 4: S124-S132
- URBAN, M., DANIELS, S., MOTT, E., HAMMOND-KOSACK, K. (2002) *Arabidopsis* is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *The Plant Journal* 32: 961-973
- URBAN, M., MOTT, E., FARLEY, T., HAMMOND-KOSACK, K. (2003) The *Fusarium graminearum* *MAPI* gene is essential for pathogenicity and development of perithecia. *Molecular Plant Pathology* 4: 347-359
- VAIN, P., WORLAND, B., THOLE, V., MCKENZIE, N., ALVES, S. C., OPANOWICZ, M., FISH, L. J., BEVAN, M. W., SNAPE, J. W. (2008) Agrobacterium-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnol J* 6: 236-245
- VAN PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J. P. (2008) Technical Aspects and Principles of PCR Amplification. *Recherche* 67: 02
- VANCE, C., KIRK, T., SHERWOOD, R. (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 18: 259-288
- VEGA-SÁNCHEZ, M. E., VERHERTBRUGGEN, Y., CHRISTENSEN, U., CHEN, X., SHARMA, V., VARANASI, P., JOBLING, S. A., TALBOT, M., WHITE, R. G., JOO, M. (2012) Loss of *Cellulose synthase-like F6* function affects mixed-linkage glucan deposition, cell wall mechanical properties, and defense responses in vegetative tissues of rice. *Plant Physiol* 159: 56-69
- VERMA, D. P., HONG, Z. (2001) Plant callose synthase complexes. *Plant Mol Biol* 47: 693-701

- VERMA, D. P. S. (2001) Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annual Review of Plant Biology* 52: 751-784
- VLOT, A. C., DEMPSEY, D. M. A., KLESSIG, D. F. (2009) Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206
- VOGEL, J. (2008) Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 301-307
- VOGEL, J., BRAGG, J. (2009) *Brachypodium distachyon*, a New Model for the Triticeae *In* Genetics and Genomics of the Triticeae, Ed First Vol Volume 7. Springer New York, pp 427-449
- VOGEL, J., GARVIN, D., LEONG, O., HAYDEN, D. (2006a) Agrobacterium -mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84: 100179-100191
- VOGEL, J., HILL, T. (2008) High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* 27: 471-478
- VOGEL, J., SOMERVILLE, S. (2000) Isolation and characterization of powdery mildew-resistant Arabidopsis mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 1897-1902
- VOGEL, J. P., GU, Y. Q., TWIGG, P., LAZO, G. R., LAUDENCIA-CHINGCUANCO, D., HAYDEN, D. M., DONZE, T. J., VIVIAN, L. A., STAMOVA, B., COLEMAN-DERR, D. (2006b) EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Theor Appl Genet* 113: 186-195
- VOIGT, C. A. (2006) The secreted lipase FGL1 of the phytopathogenic fungus *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch) is a novel virulence factor and suppresses plant defense in *Triticum aestivum* (L.). Dissertation. Universität Hamburg, Hamburg
- VOIGT, C. A., SCHAFER, W., SALOMON, S. (2005) A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *Plant Journal* 42: 364-375
- VOIGT, C. A., SCHÄFER, W., SALOMON, S. (2006) A comprehensive view on organ-specific callose synthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.): glucan synthase-like gene expression, callose synthase activity, callose quantification and deposition. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 242-247
- VOIGT, C. A., VON SCHEIDT, B., GÁCSEK, A., KASSNER, H., LIEBEREI, R., SCHÄFER, W., SALOMON, S. (2007) Enhanced mycotoxin production of a lipase-deficient *Fusarium graminearum* mutant correlates to toxin-related gene expression. *European Journal of Plant Pathology* 117: 1-12
- WALTER, S., NICHOLSON, P., DOOHAN, F. M. (2010) Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist* 185: 54-66
- WALTON, J. D. (1994) Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol* 104: 1113-1118

- WANJIRU, W. M., ZHENSHENG, K., BUCHENAUER, H. (2002) Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology* 108: 803-810
- WANNEMACHER, R., WIENER, S. L., SIDELL, F. R., TAKAFUJI, E. T., FRANZ, D. R. (1997) Trichothecene mycotoxins. *Medical aspects of chemical and biological warfare* 6: 655-676
- WILKIE, K. C. (1979) The hemicelluloses of grasses and cereals. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 36: 215-264
- WILLATS, W. G., MCCARTNEY, L., MACKIE, W., KNOX, J. P. (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *In Plant Cell Walls*. Springer, pp 9-27
- XU, X., NICHOLSON, P. (2009) Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* 47: 83-103
- YAMAGUCHI, T., HAYASHI, T., NAKAYAMA, K., KOIKE, S. (2006) Expression analysis of genes for callose synthases and Rho-type small GTP-binding proteins that are related to callose synthesis in rice anther. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 70: 639-645
- YOSHIDA, M., KAWADA, N., TOHNOOKA, T. (2005) Effect of row type, flowering type and several other spike characters on resistance to *Fusarium* head blight in barley. *Euphytica* 141: 217-227
- ZADOKS, J. C., CHANG, T. T., KONZAK, C. F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14: 415-421
- ZEYEN, R. J., KRUGER, W. M., LYNCKJÆR, M. F., CARVER, T. L. W. (2002) Differential effects of D-mannose and 2-deoxy-D-glucose on attempted powdery mildew fungal infection of inappropriate and appropriate Gramineae. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 315-323
- ZHONG, R., YE, Z.-H. (2007) Regulation of cell wall biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 564-572

## 8. ANHANG

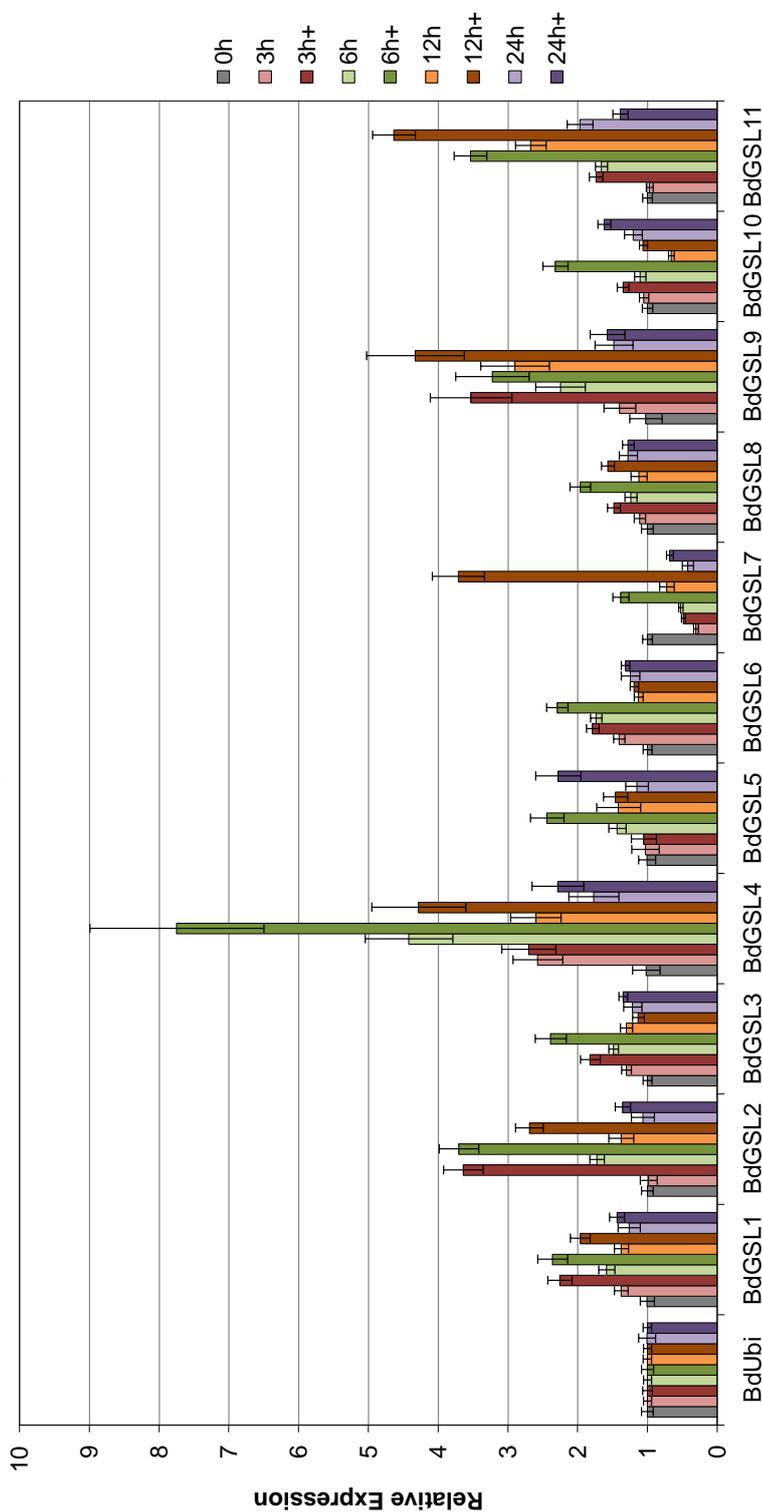
### 8.1 Genexpression der Callosesynthasen aus *B. distachyon* nach Verwundung



**Abbildung 6-1: Übersicht der Expression aller indentifizierten Callosesynthasen aus *B. distachyon* nach der ersten Verwundung.**

Die Berechnung erfolgte nach Pfaffl (2001), wobei als internes Referenzgen *BdUbi*, sowie als Kalibrator der unverwundete 0 Stunden Zeitpunkt diente.

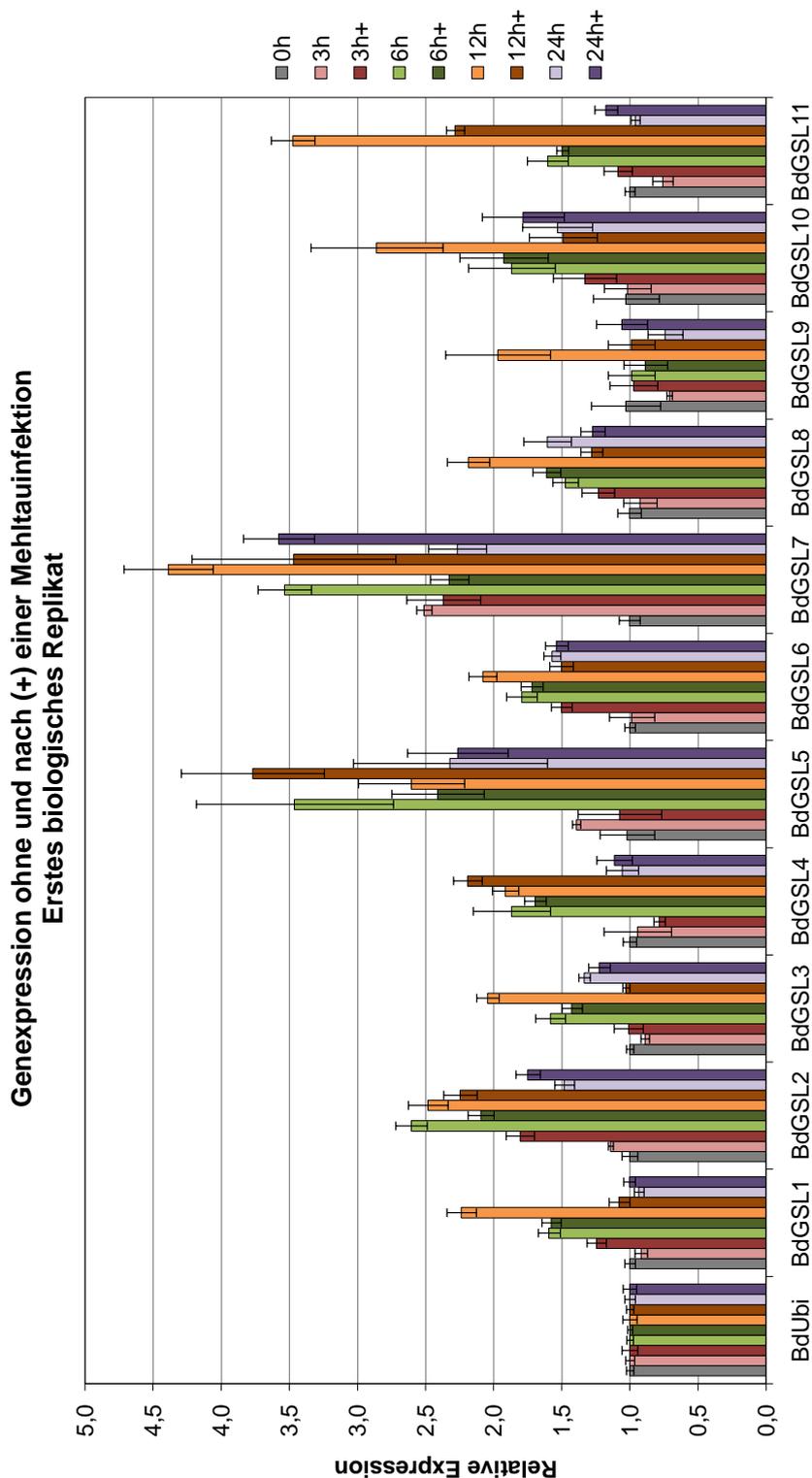
**Genexpression BdGSL ohne und nach (+) einer Verwundung  
Zweites biologisches Replikat**



**Abbildung 6-2: Übersicht der Expression aller indentifizierten Callosesynthasen aus *B. distachyon* nach der zweiten Verwundung.**

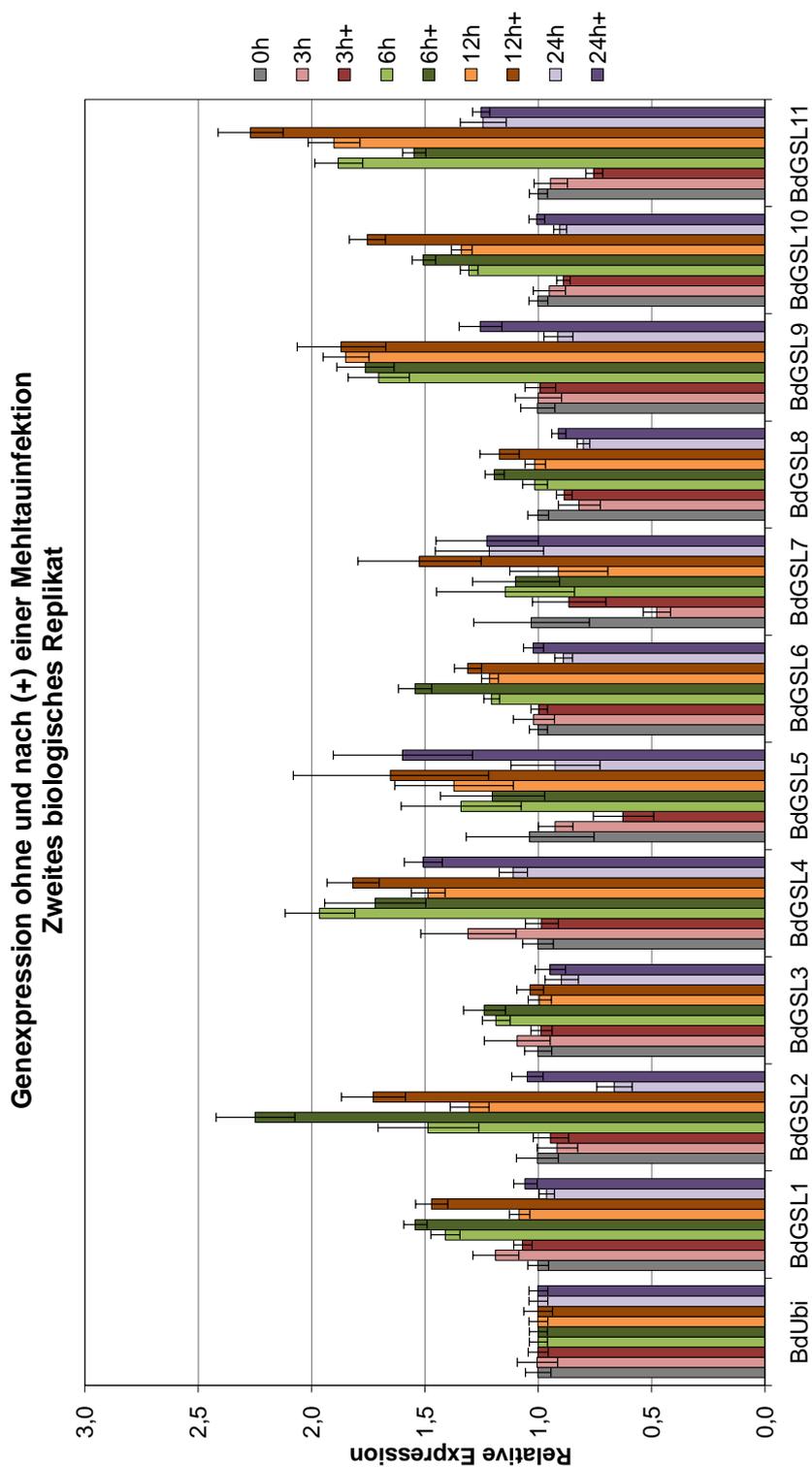
Die Berechnung erfolgte nach Pfaffl (2001), wobei als internes Referenzgen *BdUbi*, sowie als Kalibrator der unverwundete 0 Stunden Zeitpunkt diente.

## 8.2 Genexpression der Callosesynthasen aus *B. distachyon* nach Mehltauinfektion



**Abbildung 6-2: Übersicht der Expression aller indentifizierten Callosesynthasen aus *B. distachyon* nach der ersten Mehltauinfektion.**

Die Berechnung erfolgte nach Pfaffl (2001), wobei als internes Referenzgen *BdUbi*, sowie als Kalibrator der unverwundete 0 Stunden Zeitpunkt diente.



**Abbildung 6-2: Übersicht der Expression aller indentifizierten Callosesynthasen aus *B. distachyon* nach der zweiten Mehltauinfektion.**

Die Berechnung erfolgte nach Pfaffl (2001), wobei als internes Referenzgen *BdUbi*, sowie als Kalibrator der unverwundete 0 Stunden Zeitpunkt diente.

---

## Danksagung

Ein besonderer Dank gebührt Christian Voigt, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und der mich wissenschaftlich betreut und gefördert hat. Ein Dank geht auch an Prof. Willi Schäfer für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Desweiteren möchte ich mich bei all meine Laborpartnern und Leidensgenossen bedanken. Besonders der „Callosegruppe“ mit Marcel, Christian, Björn, Claudia, Natalie und Behrend für: das erträglich machen von unendlichen Inokulationsexperimenten; das nicht alleine sein, bei diversen Gelbildern mit fehlender oder falscher Bande; sowie für den Hinweis, das es auch ein Leben außerhalb des Labors gibt. Ebenso geht ein Dank an die „Pilzgruppe“ Jakob, Marike, Thuat, Christiane, Conni, Peter und Giang. Thanks for your support and all the discussions.

Ein riesiges Dankeschön geht an Kerstin, die oft als „meine TA“ herhalten musste, und ohne die diese Arbeit wahrscheinlich nur aus Transformationen bestehen würde! Auch möchte ich mich herzlich bei all den anderen guten Seelen der Labore bedanken: Birgit, Cathrin und Barbara, die mir gerade in der Anfangszeit viel geholfen haben und immer wussten, was man tun muss, um ein Gerät wieder zum Laufen zu bringen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Family, die immer an mich geglaubt und unterstützt hat ...und an Jan... für die Ablenkung; für die Schulter zum Anlehnen; für das Erklären der „richtigen“ Welt; für das Kochen; für das Verstehen; für die Liebe!