

UNIVERSITÄT HOHENHEIM



Aus dem Institut für Phytomedizin
Fachgebiet Phytopathologie
Prof. Dr. Ralf Vögele

**Etablierung eines Wirts-induzierten
RNAi-Systems für die Kontrolle des
Asiatischen Sojabohnenrostes
*Phakopsora pachyrhizi***

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Agrarwissenschaften (Dr. sc. agr.)**

Vorgelegt der Fakultät Agrarwissenschaften
an der Universität Hohenheim

Von
Manuel Müller
(Dipl. Agr. Biol.)

2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iii
Tabellenverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Rostpilze	1
1.1.1 A	1
1.1.1.1 B	1
2 Material und Methoden	2
2.1 Chemikalien	2
2.1.1 Antibiotika und Naturstoffe	2
2.1.2 Nährmedien	3
2.1.3 Puffer und Lösungen	4
2.2 Verbrauchsmaterialien	7
2.2.1 Kits	7
2.2.2 Enzyme	7
2.2.3 Oligonukleotide	8
2.2.4 Klonierungsprimer	8
2.2.5 Primer und Sonden für real-time PCR-Anwendungen	9
2.3 Biologisches Material	12
2.3.1 Saatgut und Anzucht von <i>G. max</i>	12
2.3.2 Pilzisolat	12
2.3.2.1 Inokulation von <i>G. max</i> mit <i>P. pachyrhizi</i>	12
2.3.2.2 <i>In vitro</i> -Erzeugung von Keimschläuchen	12
2.3.2.3 <i>In vitro</i> -Erzeugung von Appressorien	12
2.3.3 Bakterienstämme	13
2.3.3.1 Herstellung SEM-kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	13
2.3.3.2 Transformation von <i>E. coli</i>	13
2.3.3.3 Herstellung elektro-kompetenter Zellen von <i>A. tumefaciens</i>	13
2.3.3.4 Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	14
2.4 Geräte	14
2.5 Software und Server	16
2.6 Plasmide	16
2.7 Molekularbiologische Methoden	16
2.7.1 RNA-Präparation	16
2.8 Isolierung von Nukleinsäuren	16
2.8.1 Isolation von Plasmid DNA	16
2.8.2 Isolation von RNA aus Pflanzenmaterial	17

2.8.3	Isolation von RNA aus Uredosporen und Keimschläuchen von <i>P. pachyrrhizi</i>	17
2.8.4	Isolation von RNA aus Appressorien von <i>P. pachyrrhizi</i>	17
2.9	cDNA-Synthese	18
Literaturverzeichnis		20

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Plasmid pHannibal	16
------------------------------------	----

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Antibiotika und Naturstoffe	2
Tab. 2	Verwendeten Kits	7
Tab. 3	Verwendete Enzyme	7
Tab. 4	Klonierungsprimer	8
Tab. 5	Primer und Sonden für real-time PCR-Anwendungen	10
Tab. 8	Reaktionsansatz für den Verdau mit DNase I	18
Tab. 9	Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	18

Abkürzungsverzeichnis

cDNA	engl. complementary DNA, komplementäre DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FAM	6-Carboxyfluorescein
GUS	β -Glucuronidase
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
H ₂ O _{VE}	Vollentsalztes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HPLC	engl. high performance liquid chromatography
LB	engl. lysogeny broth
MES	2-N-(Morpholino)ethansulfonsäure
mps	engl. movements per second, Bewegungen pro Sekunde
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PE	Polyethylen
PCR	engl. polymerase chain reaction
r _{cf}	engl. relative centrifugal force, relative Zentrifugalbeschleunigung
rpm	engl. rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SEM	engl. simple and efficient method
SOC	engl. super optimal broth with catabolite repression
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TB	engl. terrific broth
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gluc	Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure

1 Einleitung

1.1 Rostpilze

Rostpilze blabla (Link *et al.*, 2014)

1.1.1 A

Test YTM! (YTM!) blablabla YTM!

1.1.1.1 B

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden, soweit im Text nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern bezogen:

AppliChem	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fluka	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Merck	Merck KGaA, Darmstadt
Riedel-deHaën	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Roth	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serva	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
SIGMA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.1 Antibiotika und Naturstoffe

Für die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Naturstoffe wurden Stammlösungen angesetzt, welche bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert wurden. Die Konzentration der Stammlösungen sowie das jeweilige Lösungsmittel sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Liste der verwendeten Antibiotika und Naturstoffe

Substanz	Konzentration	Hersteller
Acetosyringon	200 mM in EtOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicilin	100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{reinst}$	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kanamycin	50 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{reinst}$	Duchefa B.V, Haarlem, NL
Spectinomycin	100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{reinst}$	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Rifampicin	50 mg/ml in DMSO	Duchefa B.V, Haarlem, NL

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden Ampicilin und Spectinomycin in einer Endkonzentration von $100\text{ }\mu\text{g/ml}$, Kanamycin und Rifampicin in einer Endkonzentration von $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Acetosyringon wurde in einer Endkonzentration von $200\text{ }\mu\text{M}$ verwendet.

2.1.2 Nährmedien

LB-Medium	Bacto-Trypton	1	%(w/v)
	Hefeextrakt	0,5	%(w/v)
	NaCl	1	%(w/v)
	pH	7,0	

TB-Medium	Bacto-Trypton	1	%(w/v)
	Hefeextrakt	2,4	%(w/v)
	Glycerin	0,4	%(v/v)
	Das Medium wurde autoklaviert und abgekühlt. Anschließend wurden 10 % (v/v) KPO ₄ -Puffer zugegeben. Die weitere Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.		

SOB-Medium	Bacto-Trypton	2	%(w/v)
	Hefeextrakt	0,5	%(w/v)
	KCL	2,5	mM
	NaCl	10	mM
Das Medium wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Direkt vor der Verwendung, wurde MgSO ₄ zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben.			

SOC-Medium	Bacto-Trypton	2	%(w/v)
	Hefeextrakt	0,5	%(w/v)
	NaCl	10	mM
	KCl	2,5	mM
	MgCl ₂	10	mM
	MgSO ₄	10	mM
Das Medium wurde autoklaviert und abgekühlt. Anschließend wurde Glukose zu einer Endkonzentration von 20 mM zugegeben. Die weitere Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.			

YEB-Medium	Pepton	5	% (w/v)
	Hefeextrakt	1	% (w/v)
	Fleischextrakt	5	% (w/v)
	Saccharose	5	% (w/v)
	MgSO ₄	2	mM
	pH	7,2	

2.1.3 Puffer und Lösungen

Anilinblau	Anilinblau	0,05	% (w/v)
	Glyzerin	50	% (v/v)
	Milchsäure	25	% (v/v)

EDTA	EDTA	0,5	M
	pH (NaOH)	8,0	
	Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.		

GUS-Färbepuffer	NaPO ₄ -Puffer (1M)	50	mM
	EDTA	10	mM
	K ₃ Fe(CN) ₆	0,5	mM
	K ₄ Fe(CN) ₆	0,5	mM
	Triton X-100	0,1	% (v/v)
	X-Gluc	2	mM
	Der Puffer ist nur eingeschränkt lagerfähig und wurde daher unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.		

HEPES	HEPES	1	mM
	pH (NaOH)	7,0	
	Der Puffer wurde durch einen Filter mit 0,2 µm Porenweite sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.		

HEPES-Puffer 1	HEPES	1	% (v/v)
	Der Puffer wurde durch einen Filter mit 0,2 µm Porenweite sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.		

HEPES-Puffer 2	HEPES	1	% (v/v)
	Glyzerin	10	% (v/v)
	Der Puffer wurde durch einen Filter mit 0,2 µm Porenweite sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.		
Infiltrationspuffer	MES	10	mM
	MgCl ₂	10	mM
	Acetosyringon	200	µM
	Der Puffer ist nur eingeschränkt lagerfähig und wurde daher unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.		
KPO ₄ -Puffer	KH ₂ PO ₄	0,17	M
	K ₂ HPO ₄	0,72	M
	Der Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.		
MES	MES	500	mM
	pH (NaOH)	5,6	
	Der Puffer wurde durch einen Filter mit 0,2 µm Porenweite sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.		
Na ₂ HPO ₄	Na ₂ HPO ₄	1	M
	Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.		
NaH ₂ PO ₄	NaH ₂ PO ₄	1	M
	Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.		
NaPO ₄ -Puffer	Na ₂ HPO ₄ (1M)	72	% (v/v)
	NaH ₂ PO ₄ (1M)	28	% (v/v)
	pH	7,2	
	Der Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.		

PIPES	Pipes- Na_2	500	mM
	pH	6,7	
	Der Puffer wurde durch einen Filter mit 0,2 μm Porenweite sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.		
TAE (50fach)	TRIS	2	M
	Eisessig	5,7	% (v/v)
	EDTA (0,5M)	50	mM
	pH	8,0	
	Zur Verwendung wurde der Puffer 1:50 mit H_2O_{VE} verdünnt.		
TB-Puffer	CaCl_2	15	mM
	KCL	250	mM
	PIPES	10	mM
	pH mit 1 M KOH auf 6,7 einstellen		
	MnCl_2	55	mM
	Der Puffer wurde durch einen Filter mit 0,2 μm Porenweite sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.		
TBE (5fach)	TRIS	445	mM
	Borsäure	445	mM
	EDTA	10	mM
	Zur Verwendung wurde der Puffer 1:10 mit H_2O_{VE} verdünnt.		

2.2 Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Kits sowie die jeweiligen Hersteller sind in Tab. 3 und Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Liste der verwendeten Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
peqGold Cycle Pure Kit	PCR-Aufreinigung	Peqlab GmbH, Erlangen
peqGold Gel Extraction Kit	DNA Gelextraktion	Peqlab GmbH, Erlangen
peqGold Plasmid Mini Kit	Plasmidisolation	Peqlab GmbH, Erlangen
Plant RNA Isolation Kit	RNA Isolation	Agilent GmbH, Böblingen
Qubit RNA BR Assay Kit	RNA-Quantifizierung	Life Technologies, Carlsbad, USA
Qubit DNA BR Assay Kit	DNA-Quantifizierung	Life Technologies, Carlsbad, USA
Sensifast Probe no-ROX Kit	Real Time PCR	Bioline GmbH, Luckenwalde
Sensifast Sybr no-ROX Kit	Real-Time PCR	Bioline GmbH, Luckenwalde
Tetro cDNA Synthese Kit	cDNA-Synthese	Bioline GmbH, Luckenwalde

2.2.2 Enzyme

Tab. 3: Liste der verwendeten Enzyme

Bezeichnung	Enzym	Hersteller
DNA-free	RNAse-freie DNase	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
FastAP	Alkalische Phosphatase	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
FastDigest <i>Bam</i> HI	Restriktionsendonuklease	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
FastDigest <i>Eco</i> RI	Restriktionsendonuklease	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
FastDigest <i>Cla</i> I	Restriktionsendonuklease	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
FastDigest <i>Kpn</i> I	Restriktionsendonuklease	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
FastDigest <i>Xba</i> I	Restriktionsendonuklease	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
FastDigest <i>Xho</i> I	Restriktionsendonuklease	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
MightyMix	T4 DNA Ligase	Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, FR
Phusion	DNA Polymerase	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
<i>Taq</i> Polymerase	DNA Polymerase	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

2.2.3 Oligonukleotide

Die Synthese von Oligonukleotiden für konventionelle PCR-Anwendungen erfolgte bei der Biomers.net GmbH, Ulm. Oligonukleotide und TaqMan[™]-Sonden für real-time PCR-Anwendungen waren HPLC-gereinigt und wurden von der Aparas Bioscience GmbH, Denzlingen bezogen.

2.2.4 Klonierungsprimer

Die in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsprimer sind in Tab. 4 aufgelistet. Diese Primer wurden mit 5'-Überhängen entworfen, um DNA-Fragmente mit Restriktionsschnittstellen zu amplifizieren. Die so erzeugten PCR-Produkten konnten nach einem Restriktionsverdau in Plasmidvektoren ligiert werden. Zusätzlich zu den palindromischen Erkennungssequenzen wurden jeweils drei Schutzbasen angehängt.

Tab. 4: Liste der verwendeten Klonierungsprimer

Bezeichnung	Überhang - Sequenz (5'→3')	T _m (°C)	Schnittstelle
00415fw	TGAGGATCC-CACCTGCTCGTCCTAC	70	<i>Bam</i> HI
00415rv	TGAGGATCC-TGCTTACGCCGTATATTGCC	71	<i>Bam</i> HI
01251fw	TGGGATCC-AAACTGTTGGCTTTTGATCCAT	70	<i>Bam</i> HI
01251rv	TGAGGATCC-TATCTGCCCCCTCATTTACACT	71	<i>Bam</i> HI
01371fw	CTGGGATCC-TGGCTTTTCTATCAGCAAGTGA	71	<i>Bam</i> HI
01371rv	TGAGGATCC-TCCCAGATCTAGTCCACCATCT	72	<i>Bam</i> HI

Bezeichnung	Überhang - Sequenz (5'→3')	T _m (°C)	Schnittstelle
01750fw	TGAGGATCC-GCCTTCGCCAAGGAGACTTA	72	<i>Bam</i> HI
01750rv	TGAGGATCC-GGCAGTTGGCACATCAGTTG	73	<i>Bam</i> HI
04224fw	TGAGGATCC-CAGTCGTTGCCACCAAGTGT	72	<i>Bam</i> HI
04224rv	TGAGGATCC-CACGGCGACACCAATCATT	74	<i>Bam</i> HI
04224 <i>Xho</i> I	CTACTCGAG-TTGCCACCAAGTGTACG	68	<i>Xho</i> I
04224 <i>Kpn</i> I	CTAGGTACC-TAGAGCACGGCGACACC	71	<i>Kpn</i> I
04224 <i>Xba</i> I	CTATCTAGAT-TGCCACCAAGTGTACG	64	<i>Xba</i> I
04224 <i>Cla</i> I	CTAATCGAT-TAGAGCACGGCGACACC	69	<i>Cla</i> I
05320fw	TGAGGATCC-GACTAGTGAAATATACCCTC	66	<i>Bam</i> HI
05320rv	TGAGGATCC-TCGCGTCTGTAAGCATCACT	72	<i>Bam</i> HI
06673fw	TGAGGATCC-CCTGGTTCCTTTGAACCACC	73	<i>Bam</i> HI
06673rv	TGAGGATCC-GATTTGATGTATTGATGTCTCTG	67	<i>Bam</i> HI
1976 <i>Xho</i> I	CTACTCGAG-GGTGCTAACTCTTC	67	<i>Xho</i> I
1976 <i>Kpn</i> I	CTAGGTACC-AGCCACAGTGACAATC	66	<i>Kpn</i> I
1976 <i>Xba</i> I	CTATCTAGA-GGTGCTAACACCTCTTC	63	<i>Xba</i> I
1976 <i>Cla</i> I	CTAATCGAT-AGCCACAGTGACAATC	63	<i>Cla</i> I
2356fw	TGAGGATCC-GGTGGGATGGGAACAGGTCGTAG	76	<i>Bam</i> HI
2356rv	TGAGGATCC-TGGTCTTGTCAGTGGGAGTGATTC	74	<i>Bam</i> HI
2683 <i>Xho</i> I	CTACTCGAG-GTTGCTCAGTGAATAAGTC	66	<i>Xho</i> I
2683 <i>Kpn</i> I	CTAGGTACC-ATATGATACGAGAGGCTGTAG	66	<i>Kpn</i> I
2683 <i>Xba</i> I	CTATCTAGA-GTTGCTCAGTGAATAAGTC	62	<i>Xba</i> I
2683 <i>Cla</i> I	CTAATCGAT-ATATGATACGAGAGGCTGTAG	63	<i>Cla</i> I
3015fw	TGAGGATCC-GAGTTTGTAGACGGTCTGTCTGC	73	<i>Bam</i> HI
3015rv	TGAGGATCC-GAATAGAGCTTCCAGAGTCATCTG	71	<i>Bam</i> HI
462 <i>Xho</i> I	CTACTCGAG-GCAAAGGCTTGTATTAACG	67	<i>Xho</i> I
462 <i>Kpn</i> I	CTAGGTACC-GGCTCTAATTGTTTGTTCAG	66	<i>Kpn</i> I
462 <i>Xba</i> I	CTATCTAGA-GCAAAGGCTTGTATTAACG	63	<i>Xba</i> I
462 <i>Cla</i> I	CTAATCGAT-GGCTCTAATTGTTTGTTCAG	64	<i>Cla</i> I
PDS <i>Xho</i> I	CTACTCGAG-AAAGAACAGCGCCTTCC	68	<i>Xho</i> I
PDS <i>Kpn</i> I	CTAGGTACC-GCCCAAACCAGTCAATG	69	<i>Kpn</i> I
PDS <i>Xba</i> I	CTATCTAGA-AAAGAACAGCGCCTTCC	65	<i>Xba</i> I
PDS <i>Cla</i> I	CTAATCGAT-GCCCAAACCAGTCAATG	66	<i>Cla</i> I
iGUSB <i>Bam</i> HI	CTAGGATCC-TCATTGTTTGCCTCCCTGCTGCGGT	76	<i>Bam</i> HI
iGUSE <i>Eco</i> RI	CTAGAATTC-ATGGTACGTCCTGTAGAAACCCCAA	70	<i>Eco</i> RI

2.2.5 Primer und Sonden für real-time PCR-Anwendungen

Die in Tab. 5 aufgelisteten Primer und Sonden wurden zur Genexpressionsanalyse eingesetzt. Die Amplifikationseffizienz (E) der einzelnen Primerpaare wurde über

Standardkurven bestimmt (Siehe MM Standardkurven, Siehe Anhang Stdcrv). Die verwendete TaqManTM-Sonde war mit dem Fluorophor FAM und dem Quencher TAMRA gelabelt.

Tab. 5: Liste der verwendeten Primer und Sonden für real-time PCR Anwendungen

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm (°C)	E (%)
ActinDis1f	ACAGTTTCACCACAACCGCC	65	
ActinDis1r	TGACCGTCGGGAAGTTCG	63	
AtubDis1f	CTGCGAACAACCTATGCTCGTC	63	
AtubDis1r	CACGAAGAAGCCTTGAGTCC	64	
CytB1f	TCAAGACGCATCCAAATTCTAGGTC	64	
CytB1r	GTGTTACACCCGTGATAATCTGAATGAT	65	
Elf1a1f	GTGAGCGTGGTATCACCATC	62	
Elf1a1r	CAGAATGGCGCAATCAGC	61	
Elf1a2f	GGAAATGGATACGCTCCTGTC	62	
Elf1a2r	CTTAACTAAGGCGGCGTCTC	62	
GAPDH1f	GGTATGGCTTTCCGAGTTCCA	64	
GAPDH1r	TCAGTTGATACCAAATCATCCTCAG	62	
Gmcons4fw	GATCAGCAATTATGCACAACG	60	
Gmcons4rv	CCGCCACCATTTCAGATTATGT	62	
Gmcons6fw	AGATAGGGAAATGGTGCAGGT	63	
Gmcons6rv	CTAATGGCAATTGCAGCTCTC	61	
Gmcons7fw	ATGAATGACGGTTCCCATGTA	61	
Gmcons7rv	GGCATTAAAGGCAGCTCACTCT	64	
Gmcons15fw	TAAAGAGCACCATGCCTATCC	61	
Gmcons15rv	TGGTTATGTGAGCAGATGCAA	62	
RibPro2f	CGGCAACAGTTGTATGACCTC	63	
RibPro2r	AGTGTCAGCCTCAGATCTTGG	63	
RibPro3f	GTGAATGGGAGACCAATCTCAG	62	
RibPro3r	TTGCCTCCTCCATGAGTCAG	63	
Ubc1f	CGGACCAGTACCCTTACAAATC	62	
Ubc1r	ATCAAACATCGGCGACCAG	62	
UbcE22f	ATATACCCTAACCCGGAGTCG	62	
UbcE22r	GTTCTGGCATGGATATCAGTC	62	
UbcE23f	GTCGAACTGTGACGAGTTTG	61	
UbcE23r	ACGGCCTTAGTCTTCGATG	61	
q00153fw	AGTTGATCGAGTGACTGGTG	61	
q00153rv	CATCTTGGGCAGCCAACATG	63	
q00239fw	GCGGAAAAGGATAAGGGG	59	
q00239rv	TCCGATCCTTAGTCTGGCCT	64	

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm (°C)	E (%)
q00241fw	CAATCGCCTGAGGACCGTAA	63	
q00241rv	CTGGGGCAACTTGTAGAGCA	64	
q00415Fw	CGAGAGTGTGCTGAAGCAGT	64	
q00415Rv	TCCTCAATTCCCAGGAGGTCT	64	
q00583fw	AATGCGTGGTCTCTCTGGTG	64	
q00583rv	GCTCGTCCAAGATCACCACA	64	
q00682fw	GGACTGGGCTTCAAGACTCC	64	
q00682rv	GAATCCTGCCCCTGATCGAG	64	
q01371fw	TGCCACTGGAGCAAAATCAC	63	
q01371rv	AGTGGAATAAGCAGGGAGG	62	
q01750fw	ATGTGGTGAATGGGTGAGGC	64	
q01750rv	CTTTCGAGGGGCCAGATTC	64	
q02726fw	ACCTCCCGTTCAGCTAGTCT	64	
q02726rv	AATTCATCAGAGTCGGCCCC	64	
q04224F1	CCTAAGAGGTTTGAGTTAGCTG	60	
q04224R1	CTGCAAAGATGATTTGCCTCTC	61	
q05106fw	CTTCGTGCCGCTTTGTGATT	63	
q05106rv	GGGGTTTGTCTGTCGGTTTTG	64	
q05320fw	GTTGCTTGCATTGGAACGTT	62	
q05320rv	TTTACAACGTTGCTGGCCAC	63	
q05320as-R1	TCGACGGTCTTGAAGAGTGA	62	
q1976Fw	TGCAGCATTGGTTTTGGGCG	66	
q1976Rv	AGGTTGCTGAGCCGCTTGTT	66	
q2356Fw	TAAACAGACCGCAGTGGTGG	64	
q2356Rv	CCTCGTTGTAGCCTGGTTGT	64	
q2683Rv	TGGAACACAGTTTTGGGCAGT	64	
q3015Fw	TCCAGCTATCGCCAACAACC	64	
q3015Rv	TCCACAGTTCCTCCTCCGTC	65	
q3015as-R1	CGACACAGATTGTGATGGAA	59	
q462Fw	CCGGCGCATAACCAACTCA	66	
q462Rv	GCGTCCAAAGCCCATAGTGC	64	
pBPMV-F1	ACATTCCTGGGAATTGATCTTCC	63	
pBPMV-R1	GATCGGGGAAATTCGAGCTATC	59	
qBPMV-Probe	FAM-TCCTCATGCAGAGGATTCGCA-TAMRA	69	
qGUS-Fw	CTGGGTGGACGATATCACCG	64	
qGUS-Rv	TCCAGTTGCAACCACCTGTT	64	
qPDK-Fw	TGTTAGAAATTCCAATCTGCTTGT	60	
qPDK-Rv	AATGATAGATCTTGCGCTTTGTT	61	

^a (Schmitz, 2013), ^b (Libault *et al.*, 2008)

2.3 Biologisches Material

2.3.1 Saatgut und Anzucht von *G. max*

Für die Anzucht von Sojabohnen (*Glycine max* (L.) Merr) wurde Saatgut der Sorte Thorne (Bayer CropScience AG, Lyon, Frankreich) verwendet. Die Kultivierung erfolgte ohne Düngung in Topfsubstrat (Einheitserde Typ T, Gebr. Patzer GmbH, Sinntal-Jossa) bei einer Tag/Nacht-Periode von 16 h/8 h und 22° C Umgebungstemperatur.

2.3.2 Pilzisolat

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Uredosporen eines kompatiblen Wildisolats (Thai 1) des Asiatischen Sojabohnenrostes *P. pachyrhizi* Syd. & P.Syd aus der Stammsammlung des Instituts für Phytomedizin, Universität Hohenheim verwendet.

2.3.2.1 Inokulation von *G. max* mit *P. pachyrhizi*

Zur Inokulation von *G. max* mit *P. pachyrhizi* wurden die Blätter 21-tage alter Sojabohnen gleichmäßig mittels eines DC-Zerstäubers (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) mit 0,002 % (w/v) Inokulationssuspension besprüht und anschließend bei Dunkelheit, 95% relativer Luftfeuchte und 20° C für 12 h inkubiert. Die weitere Kultivierung der Pflanzen erfolgte unter den in 2.3.1 beschriebenen Bedingungen.

2.3.2.2 *In vitro*-Erzeugung von Keimschläuchen

Die *in vitro*-Erzeugung von Keimschläuchen von *P. pachyrhizi* erfolgte nach der von Posada-Buitrago und Frederick (2005) beschriebenen Methode. Dafür wurden 100 mg tiefgefrorene Uredosporen für 5 min einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen und anschließend gleichmäßig auf die Wasseroberfläche einer mit H₂O_{VE} gefüllten Petrischale verteilt. Zur Keimung wurden die Uredopsoren für 12 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert.

2.3.2.3 *In vitro*-Erzeugung von Appressorien

Zur *in vitro*-Erzeugung von Appressorien wurden kreisrunde Stücke PE-Folie (Ø 20 cm) gleichmäßig mittels eines DC-Zerstäubers (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) mit 0,002 % Uredosporensuspension besprüht und in Glaspetrischalen für 16 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert.

2.3.3 Bakterienstämme

Die Vermehrung von Plasmidkonstrukten erfolgte in *Escherichia coli* DH10B (Grant *et al.*, 1990). Für die transiente Transformation von *G. max* und *N. benthamiana* wurde *A. tumefaciens* LBA 4404 (Ooms *et al.*, 1981) verwendet.

2.3.3.1 Herstellung SEM-kompetenter Zellen von *E. coli*

Die Herstellung SEM-kompetenter Zellen erfolgte nach der von Inoue *et al.* (1990) beschriebenen Methode. Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie *E. coli* DH10B angeimpft und über Nacht bei 37°C und 125 rpm auf einem Rotator inkubiert. Am Folgetag wurden 250 ml SOB-Medium mit 2 % (v/v) Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0,6$ auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in vorgekühlte 250 ml Zentrifugenbecher überführt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 2500 rcf. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut für 10 min bei 4°C und 2500 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Es wurde DMSO zu einer Endkonzentration von 7% (v/v) zugegeben und die Zellen erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zu je 100 µl in sterile 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

2.3.3.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation SEM-kompetenter Zellen von *E. coli* erfolgte mittels Hitzeschock. Dafür wurden 100 µl SEM-kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und 50-100 ng Plasmid-DNA dazupipettiert. Der Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock (60 s, 42°C) unterzogen. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis, wurde 1 ml SOC-Medium dazugegeben und behutsam auf- und abpipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 2 h bei 37°C und 125 rpm auf einem Rotator inkubiert. Abschließend wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf Selektivmedium ausplattiert und für 12-16 h bei 37°C inkubiert.

2.3.3.3 Herstellung elektro-kompetenter Zellen von *A. tumefaciens*

Die Herstellung elektro-kompetenter Zellen von *A. tumefaciens* erfolgte nach einer modifizierten Variante der von Seidman *et al.* (2001) beschriebenen Methode. Zur Herstellung einer Vorkultur, wurden 5 ml YEB-Medium_{Rif} mit einer Kolonie von *A. tumefaciens* LBA 4404 angeimpft und über Nacht bei 28°C und 125 rpm auf einem Rotator

inkubiert. Am Folgetag wurden 200 ml YEB-Medium_{Rif} mit 2 % (v/v) Vorkultur angeimpft und in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben bei 28°C und 150 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ = 0,6 auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden für 15 min in einem Eiswasserbad inkubiert und anschließend in vorgekühlte 250 ml Zentrifugenbecher überführt. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 1900 rcf. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Zellen in 20 ml eiskaltem HEPES-Puffer 1 resuspendiert. Die Zellen wurden erneut für 20 min bei 4°C und 1900 rcf zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 1 ml eiskaltem HEPES-Puffer 2 resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 4°C und 10000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Bakterien in 200 µl eiskaltem HEPES-Puffer 2 resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden zu 50 µl in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

2.3.3.4 Transformation von *A. tumefaciens*

Die Elektroporation von *A. tumefaciens* erfolgte mit einem ECM 600 Electro Cell Manipulator (BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Dafür wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und 25 - 50 ng Plasmid-DNA dazupipettiert. Die Zellen wurde für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Peqlab GmbH, Erlangen) mit 2 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. In die Elektroporationsküvette wurde 1 ml SOC-Medium gegeben und behutsam auf- und abpipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 h bei 28°C und 125 rpm auf einem Rotator inkubiert. Abschließend wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf Selektivmedium ausplattiert und für 48-72 h bei 28°C inkubiert.

2.4 Geräte

Gerät	Bezeichnung, Hersteller	Verwendung
Biolistik-System	PDS-100-He®, BioRad GmbH, München	Transformation von <i>G. max</i>
Elektro-Zell-Manipulator	ECM 600®, BTX Harvard Apparatus, Holliston, USA	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>
Fluorometer	Qubit 2.0®, Life Technologies GmbH, Darmstadt	Quantifizierung von Nukleinsäuren

Gerät	Bezeichnung, Hersteller	Verwendung
Geldokumentations- system	Quantum 1100 [®] , PEQLAB GmbH, Erlangen	Auswertung von Agarosegelen
Gelelektrophorese- kammer	wissenschaftliche Werkstätten, Universität Konstanz	Gelelektrophorese
Homogenisator	FastPrep [®] -24, MP Biomedicals GmbH, Eschwege	Aufschluss biologischer Materialien
Mikroskop	Primo Star, Zeiss AG	Mikroskopie
Orbitalschüttler	Shaker DOS 10L, LTF Labortechnik	Inkubation von Bakterienkulturen
PCR-Cycler	C1000 touch, BioRad GmbH, München	PCR
	Cfx96, BioRad GmbH, München	real-time PCR
	Masterycler gradient, Eppendorf AG, Hamburg	PCR
Rotator	Rotator, NeoLab GmbH, Heidelberg	Inkubation von Bakterienkulturen
Thermoblock	Thriller, PEQLAB GmbH, Erlangen	Inkubation von Reaktionsansätzen
Vortexmischer	VM-300, neolab GmbH, Heidelberg	Mischen von Reaktionsansätzen
Wasserbad	F12, Julabo GmbH, Seelbach	Inkubation von Reaktionsansätzen
Zentrifugen	Sorvall RC5B, DuPont 5417R, Eppendorf AG, Hamburg	Ultrazentrifugation Zentrifugation
	5415R, Eppendorf AG, Hamburg	Zentrifugation

2.5 Software und Server

2.6 Plasmide

Als Ausgangsplasmid für den Aufbau viraler Silencingkonstrukte diente pBPMV-IA-V1 (Quelle). Für den Aufbau hpRNA-exprimierender Genkonstrukte wurde das Plasmid pHannibal (Quelle) verwendet. Zur Transformation von *G. max* und *N. benthamiana* mit den in pHannibal aufgenauten Konstrukten, wurde das binäre Plasmid pART27 verwendet

pBPMV

pHannibal und pART27

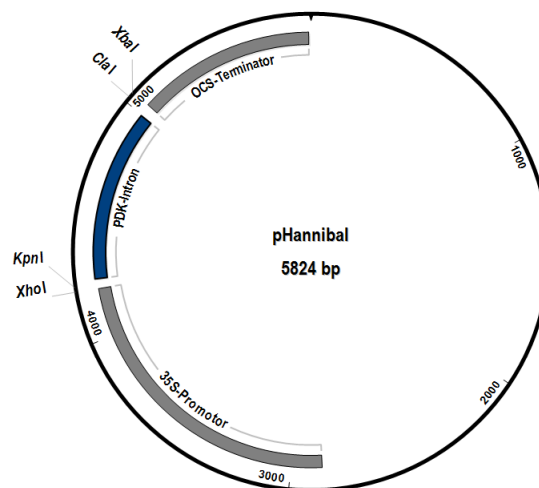


Abb. 1: Plasmid pHannibal für den Aufbau von hpRNA-Konstrukten
blablabla

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 RNA-Präparation

2.8 Isolierung von Nukleinsäuren

2.8.1 Isolation von Plasmid DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *A. tumefaciens* erfolgte mittels peqGold Plasmid Mini Kit (PepLab GmbH, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers.

2.8.2 Isolation von RNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolation von RNA aus infiziertem und nicht-infiziertem Pflanzenmaterial von *G. max* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll mittels Plant RNA Isolation Kit (Agilent GmbH, Böblingen). Dafür wurden bis zu 100 mg Pflanzenmaterial mit einem Korkbohrer ausgestanzt und zusammen mit zwei Edelstahlkügelchen (Ø4 mm) in 2 ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zweimal für 20 s bei 4000 mps im FastPrep®-24 homogenisiert, wobei das Material zwischen den Homogenisierungsschritten erneut schockgefroren wurde. Anschließend wurden 600 µl Extraktionslösung dazugegeben und durch vortexen gemischt. Das Homogenat wurde für 2 min bei 4°C und 16.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und auf ein Filtersäulchen überführt. Nach einer 3-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 16.000 rpm wurde der Durchfluß in ein RNase-freies 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 600 µl Isopropanol dazugegeben. Die Lösung wurde durch mehrfaches invertieren gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 600 µl der Lösung auf ein Isolationssäulchen überführt und für 30 s bei 4°C und 16.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Säulchen erneut mit 600 µl beladen und ein weiteres mal für 30 s bei 4°C und 16.000 rpm zentrifugiert. Es folgten 2 Waschschrte bei welchen jeweils 500 µl Waschlösung auf das Säulchen gegeben wurden und anschließend für 30 s bei 4°C und 16.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und das Säulchen zur Trocknung der gebundenen RNA für 2 min bei 4°C und 16.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 30-50 µl H₂O_{DEPC} auf die Mitte der Säulchenmembran pipettiert und das Säulchen auf ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei Raumtemperatur wurde die gelöste RNA durch Zentrifugation für 30 s bei 4°C und 16.000 rpm in das Reaktionsgefäß überführt. Die kurzzeitige Lagerung der RNA erfolgte auf Eis. Zur langfristigen Lagerung wurde die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (3M, pH irgendwas) und 2,5 Volumen EtOH gefällt und bei -80°C aufbewahrt.

2.8.3 Isolation von RNA aus Uredosporen und Keimschläuchen von *P. pachyrhizi*

Die Isolation von RNA aus Uredosporen und Keimschläuchen (siehe 2.3.2.2) erfolgte analog zu der in 2.8.2 beschriebenen Methode.

2.8.4 Isolation von RNA aus Appressorien von *P. pachyrhizi*

Zur Isolation von RNA aus Appressorien von *P. pachyrhizi* wurden die in 2.3.2.3 beschriebenen PE-Folie behutsam mit Filterpapier trocken getupft und anschließend

600 µl Extraktionslösung darauf gegeben. Die Extraktionslösung wurde mit einem Gummiwischer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verteilt, wodurch sich die pilzlichen Strukturen von der Folie lösten und mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit einer Mischung aus Quarzsand und Glaskügelchen (Lysing Matrix E, MP Biomedicals GmbH, Eschwege) überführt werden konnten. Die Appressorien wurden 2-mal für 20 s bei 6500 mps im FastPrep®-24 homogenisiert, wobei das Material zwischen den Homogenisierungsschritten auf Eis gekühlt wurde. Das Homogenat wurde für 2 min bei 4°C und 16.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und auf ein Filtersäulchen überführt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog zu der in 2.8.2 beschriebenen Methode.

2.9 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA aus pflanzlicher und pilzlicher RNA erfolgte mit dem Tetro cDNA Synthese Kit (Bioline GmbH, Luckenwalde). Für die Synthese von cDNA aus RNA von infiziertem und nicht-infiziertem Blattmaterial, sowie aus Sporen und Keimschläuchen von *P. pachyrrhizi* wurden 5 µg total RNA eingesetzt. Für die Synthese von cDNA aus Appressorien-RNA wurden 2,5 µg total RNA verwendet. Um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde vor der reversen Transkription ein DNase I-Verdau mit PerfeCTa DNase I (Quanta Bioscience, Gaithersburg, MD, USA) durchgeführt (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Reaktionsansatz für einen DNase I-Verdau

Reagenz	Volumen (µl)	
10x-Reaktionspuffer	1 µl	
PerfeCTa DNase I	1 µl	
RNA	bis	5 µg
H ₂ O _{reinst}	auf	10 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl Inaktivierungspuffer zugegeben und die Reaktion durch 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

Tab. 9: Reaktionsansatz cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen (µl)
10x-Reaktionspuffer	1 µl
dNTPS (10mM)	1 µl
Hexamer-Primer(10mM)	1 µl
RNA (aus ??)	11 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
H ₂ O _{reinst}	auf 20 µl

Literaturverzeichnis

- Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, und Hanahan D**, 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12):4645–4649.
- Inoue H, Nojima H, und Okayama H**, 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1):23–28.
- Libault M, Thibivilliers S, Bilgin DD, Radwan O, Benitez M, Clough SJ, und Stacey G**, 2008. Identification of Four Soybean Reference Genes for Gene Expression Normalization. *The Plant Genome*, 1(1):44–54.
- Link TI, Lang P, Scheffler BE, Duke MV, Graham MA, Cooper B, Tucker ML, van de Mortel M, Voegelé RT, Mendgen K, Baum TJ, und Whitham SA**, 2014. The haustorial transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizi* and their candidate effector families. *Molecular Plant Pathology*, 15(4):379–393.
- Ooms G, Hooykaas, Paul J J, Moolenaar G, und Schilperoort RA**, 1981. Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions. *Gene*, 14(1–2):33–50.
- Posada-Buitrago ML und Frederick RD**, 2005. Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(12):949–962.
- Schmitz HK**, 2013. In vivo und molekularbiologische Untersuchungen zur Sensitivität von *Phakopsora pachyrhizi* gegenüber Demethylierungs-Inhibitoren und Qo-Inhibitoren. Dissertation, Universität Hohenheim, Stuttgart-Hohenheim.
- Seidman CE, Struhl K, Sheen J, und Jessen T**, 2001. Introduction of Plasmid DNA into Cells. In **Ausubel FM** (Hg.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Band 37, 1.8.1–1.8.10. John Wiley & Sons, Inc.