

**UNTERSUCHUNGEN ZUR RELEVANZ DER REVERSIBLEN
METHYLIERUNG VON JASMONSÄURE
IN *SOLANUM LYCOPERSICUM***



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von
Simone Findling
Geboren in Datteln

Würzburg, 2012

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

1. Gutachter : PD Dr. Susanne Berger

2. Gutachter : Prof. Dr. Dietmar Geiger

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

FÜR MEINE ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Summary	1
2	Einleitung	4
2.1	Jasmonate	4
2.2	JA-Biosynthese	5
2.2.1	Metabolisierung von JA	7
2.2.2	Reversible Methylierung von JA	10
2.3	Funktion der Jasmonate in Entwicklung und Abwehrreaktionen	13
2.3.1	Interaktion der Phytohormon-Signalwege	13
2.3.2	Jasmonate in der Entwicklung	15
2.3.3	Jasmonate in der Wundantwort in Tomate	16
2.3.4	Jasmonate in der Pathogenabwehr:	20
2.4	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	22
3	Zielsetzung	25
4	Materialien	27
4.1.1	Pflanzenmaterial	27
4.1.2	Antibiotika	27
4.1.3	Chemikalien	27
4.1.4	Verbrauchsmaterial	29
4.1.5	Geräte	29
4.1.6	Phytohormone und synthetische Analoga	30
4.1.7	Puffer	30
4.1.8	Medien:	31
4.1.9	Enzyme	33
4.1.10	Primer	34
4.1.11	Vektoren	36
5	Methoden	38
5.1	Arbeiten mit Bakterien	38
5.1.1	Kultivierung und Stammhaltung	38
5.1.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	38
5.1.1.2	Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i>	38

5.1.2	Herstellung kompetenter Zellen.....	38
5.1.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	38
5.1.2.2	Herstellung kompetenter <i>A. tumefaciens</i>	39
5.1.3	Transformation.....	39
5.1.3.1	Transformation von <i>E. coli</i>	39
5.1.3.2	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	40
5.1.4	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	40
5.1.4.1	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
5.1.4.2	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels Kit.....	40
5.1.4.3	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i>	41
5.1.5	Colony screen PCR.....	42
5.1.5.1	„Colony screen“-PCR von <i>E. coli</i>	42
5.1.5.2	„Colony screen“-PCR von <i>A. tumefaciens</i>	42
5.2	Arbeiten mit <i>S. lycopersicum</i>	43
5.2.1	Oberflächensterilisation der Samen.....	43
5.2.2	Pflanzenanzucht.....	43
5.2.3	„Leaf disc“-Transformation.....	43
5.2.4	Samengewinnung.....	44
5.2.5	Pfropfung durch Kopulation.....	45
5.3	Arbeiten mit <i>S. sclerotiorum</i>	46
5.3.1	Kultivierung.....	46
5.3.2	Gewinnung infektiöser Hyphen.....	46
5.3.3	Inokulation von <i>S. lycopersicum</i>	46
5.4	DNA-technische Methoden.....	47
5.4.1	Quantifizierung von DNA.....	47
5.4.2	DNA-Isolierung aus Blattmaterial.....	47
5.4.3	PCR.....	48
5.4.4	Aufreinigung von PCR Produkten.....	49
5.4.5	Restriktionsverdau.....	49
5.4.6	Dephosphorylierung.....	50
5.4.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	50
5.4.8	Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen.....	51

5.4.9	Ligation	51
5.5	RNA-technische Methoden.....	52
5.5.1	Quantifizierung von RNA.....	52
5.5.2	RNA-Isolation aus Blattmaterial	52
5.5.3	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese.....	52
5.5.4	DNase-Verdau	53
5.5.5	cDNA-Synthese	53
5.5.6	qPCR	54
5.6	Protein-technische Methoden.....	56
5.6.1	Herstellung des Proteinrohextraktes	56
5.6.2	Proteingehaltsbestimmung nach Bradford	56
5.6.3	Bestimmung der MJE-Proteinaktivität	56
5.7	Analytik	57
5.7.1	Extraktion von Phytohormonen (Verwundungsexperimente)	57
5.7.2	Extraktion von JA, JA-Ile, OPDA, 12-OH-JA-Ile (Pathogenexperimente) ...	58
5.7.3	Quantifizierung der Analyten mittels UPLC-Q-TOF	58
5.8	Lumineszenzmessungen	60
6	Ergebnisse	61
6.1	Generierung transgener Linien	61
6.2	Funktionelle Charakterisierung transgener Linien auf RNA-Ebene.....	62
6.2.1	Charakterisierung der MJE-OE-Linien	63
6.2.2	Charakterisierung der MJE-RNAi-Linien	64
6.2.3	Charakterisierung der JMT-OE-Linien	65
6.3	Bestimmung der MJE-Hydrolyseaktivität	66
6.3.1	MJE-OE-Linien.....	67
6.3.2	MJE-RNAi-Linien	68
6.4	Habitus der transgenen Linien	69
6.5	Untersuchung der Keimungsrate	70
6.6	MeJA-Applikationsversuche.....	71
6.7	Etablierung eines Verwundungs-Testsystems.....	76
6.8	Lokale Verwundungsantwort	79
6.8.1	Genexpression nach Verwundung	79

6.8.1.1	Genexpressionsanalyse der MJE-OE-Linien	80
6.8.1.2	Genexpressionsanalyse der MJE-RNAi-Linien	81
6.8.1.3	Genexpressionsanalyse der JMT-OE-Linien	82
6.8.2	Oxylipinprofil nach Verwundung.....	83
6.8.2.1	Oxylipinprofil der MJE-OE-Linien nach Verwundung.....	83
6.8.2.2	Oxylipinprofil der MJE-RNAi-Linien nach Verwundung.....	85
6.8.2.3	Oxylipinprofil der JMT-OE-Linien nach Verwundung.....	87
6.8.3	SA-Akkumulation nach Verwundung.....	88
6.8.3.1	SA-Akkumulation in MJE-OE-Linien.....	88
6.8.3.2	SA-Akkumulation in MJE-RNAi-Linien	89
6.8.3.3	SA-Akkumulation in JMT-OE-Linien	90
6.9	Distale Verwundungsreaktion	91
6.10	Einfluss der reversiblen Methylierung auf die Pathogenresistenz gegenüber <i>S. sclerotiorum</i>	93
6.10.1	MJE-OE-Linien.....	94
6.10.1.1	Läsionen.....	94
6.10.1.2	Analyse des Pathogenwachstums :	95
6.10.1.3	Genexpressionsanalyse von <i>AOC</i> und <i>PINII</i>	96
6.10.1.4	Oxylipinprofil	98
6.10.2	MJE-RNAi-Linien.....	100
6.10.2.1	Läsionen.....	100
6.10.2.2	Analyse des Pathogenwachstums	101
6.10.2.3	Genexpression von <i>AOC</i> und <i>PINII</i>	102
6.10.2.4	Oxylipinprofil	104
6.10.3	JMT-OE-Linien.....	106
6.10.3.1	Läsionen.....	106
6.10.3.2	Analyse des Pathogenwachstums	107
6.10.3.3	Genexpression von <i>AOC</i> und <i>PINII</i>	108
6.10.3.4	Oxylipinprofil	109
6.10.4	Bedeutung des JA-Biosyntheseweges	111
6.11	Etablierung eines <i>in vivo</i> Reportersystems.....	113

6.11.1	<i>In vivo</i> Ausbreitung des systemischen Signals in <i>S. lycopersicum</i> nach Verwundung	115
7	Diskussion	118
7.1	Ist die MJE die einzige, spezifische MeJA Esterase?	119
7.2	Einfluss der Modifizierung der reversiblen Methylierung auf den Phänotyp ...	120
7.2.1	Einfluss auf das vegetative Wachstum	120
7.2.2	Einfluss auf die Keimungsrate	121
7.3	Biologische Aktivität von MeJA	122
7.4	Die Relevanz von MeJA als parakrines oder systemisches Signal der Verwundung	125
7.5	Bedeutung der reversiblen Methylierung für die Pathogenresistenz gegenüber <i>S. sclerotiorum</i>	134
8	Zusammenfassung und Ausblick	140
9	Abkürzungsverzeichnis	143
9.1	Glossar	146
10	Literaturverzeichnis	147
11	Anhang	166
11.1	Bestimmung der MJE-Hydrolyseaktivität transgener Linien	166
11.1.1	MJE-OE-Linien	166
11.1.2	MJE-RNAi-Linien	167
11.2	Verwundung lokal	168
11.2.1	MJE-OE-Linien	168
11.2.1.1	AOC-Expression	168
11.2.1.2	<i>PINII</i> -Expression	169
11.2.1.3	JA-Spiegel	170
11.2.1.4	JA-Ile-Spiegel	171
11.2.1.5	12-OH-JA-Ile-Spiegel	172
11.2.1.6	OPDA-Spiegel	173
11.2.1.7	SA-Spiegel	174
11.2.2	MJE-RNAi-Linien	175
11.2.2.1	AOC-Expression	175
11.2.2.2	<i>PINII</i> -Expression	176

11.2.2.3 JA-Spiegel	177
11.2.2.4 JA-Ile-Spiegel	178
11.2.2.5 12-OH-JA-Ile-Spiegel.....	179
11.2.2.6 OPDA-Spiegel.....	180
11.2.2.7 SA-Spiegel.....	181
11.2.3 JMT-OE-Linien	182
11.2.3.1 AOC-Expression	182
11.2.3.2 <i>PINII</i> -Expression.....	182
11.2.3.3 JA-Spiegel	183
11.2.3.4 JA-Ile-Spiegel	183
11.3 Pfropfungsexperimente	184
11.3.1 AOC-Expression	184
11.3.2 <i>PINII</i> -Expression	185
11.4 Pathogenexperimente mit <i>S. sclerotiorum</i>	186
11.4.1 AOC-Expression der MJE-OE-Linien	186
11.4.2 AOC-Expression der MJE-RNAi-Linien	187
11.4.3 AOC-Expression der JMT-OE-Linien	188
11.4.4 <i>PINII</i> -Expression der MJE-OE-Linien.....	189
11.4.5 <i>PINII</i> -Expression der MJE-RNAi-Linien	190
11.4.6 <i>PINII</i> -Expression der JMT-OE-Linien.....	191
11.4.7 Expression des fugalen <i>Aktins</i> in MJE-OE-Linien.....	192
11.4.8 Expression des fugalen <i>Aktins</i> in MJE-RNAi-Linien	193
11.4.9 Expression des fungalen <i>Aktins</i> in JMT-OE-Linien.....	194
11.4.10 Läsionsgrößen der MJE-OE-Linien.....	195
11.4.11 Läsionsgrößen der MJE-RNAi-Linien	196
11.4.12 Läsionsgrößen der JMT-OE-Linien.....	197
11.4.13 JA-Ile-Akkumulation der MJE-OE-Linien	198
11.4.14 JA-Ile Akkumulation der MJE-RNAi-Linien	199
11.4.15 JA-Ile-Akkumulation der JMT-OE-Linien	200
11.4.16 12-OH-JA-Ile-Akkumulation der MJE-OE-Linien.....	201
11.4.17 12-OH-JA-Ile-Akkumulation der MJE-RNAi-Linien	202
11.4.18 OPDA-Spiegel der MJE-OE-Linien.....	203

11.4.19	OPDA-Spiegel der MJE-RNAi-Linien	204
11.4.20	OPDA-Spiegel der JMT-OE-Linien.....	205
11.4.21	SA-Akkumulation in MJE-OE-Linien	205
12	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
13	Eidesstattliche Erklärung	206

1 Zusammenfassung/Summary

Jasmonate sind wichtige zelluläre Mediatoren, die eine essentielle Rolle in der Pflanzenentwicklung und Abwehr von biotischem und abiotischem Stress spielen. Jasmonsäure (JA) als zentrales Intermediat kann dabei auf unterschiedlichste Art und Weise metabolisiert werden. Eine Möglichkeit der Metabolisierung ist die Veresterung der JA zu Methyljasmonat (MeJA) durch die Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferase (JMT). Interessanterweise ist diese Reaktion reversibel, da die Methyljasmonatesterase (MJE) die Hydrolyse zu JA katalysiert. Obwohl die Funktion diverser Metabolite, wie die des biologisch aktivsten Metaboliten JA-Isoleucin, aufgeklärt wurde, ist die Rolle der reversiblen Methylierung noch weitestgehend unklar. Aufgrund der differentiellen physikochemischen Eigenschaften von JA und MeJA wird diskutiert ob MeJA von JA unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweist und/oder als transzelluläres oder systemisches Signal fungiert. Anhand der Generierung transgener Pflanzen, in denen die Umwandlung zwischen JA und MeJA gestört ist, sollten diese Hypothesen überprüft werden. Dazu wurden Tomatenlinien hergestellt, die die Enzyme der reversiblen Methylierung (JMT, MJE) überexprimieren (JMT-OE, MJE-OE) sowie Linien, in denen durch „Post transcriptional gene silencing“ die *MJE* verringert exprimiert wird.

Basierend auf MJE-RNAi-Linien, die eine reduzierte *in vitro* MeJA-Hydrolyseaktivität aufweisen, sollte durch exogene Applikation von MeJA analysiert werden, ob MeJA selbst biologische Aktivitäten aufweist oder zunächst mittels MJE in JA umgewandelt werden muss. Es war kein reproduzierbarer Unterschied der Reaktion auf die MeJA-Applikation über die wässrige Phase und über die Gasphase zwischen Kontroll- und MJE-RNAi-Linien festzustellen.

Um zu eruieren, ob MeJA als transzelluläres, parakrines Signal agiert, wurden die Genexpression und das Oxylinprofil in verwundeten Blättern der transgenen Linien untersucht. Ob MeJA als systemisches Signal dient, sollte anhand der Verwundung von Pfropfkombinationen aus Kontrolllinie als Unterlage und MJE-RNAi als Spross anhand der Analyse der Genexpression in distalen Bereichen festgestellt werden. Die Ergebnisse der Studien deuten daraufhin, dass MeJA weder als transzelluläres Signal noch als systemisches Signal bei der Verwundungsantwort agiert. Zudem kann ausgeschlossen wer-

den, dass die MJE in distalen Bereichen der Pflanze in der Perzeption des systemischen Signals involviert ist.

Da Jasmonate an der Abwehr von Pathogenen beteiligt sind, wurde die Empfindlichkeit gegenüber dem nekrotrophen Pilz *S. sclerotiorum* getestet. Alle transgenen Linien mit Veränderung der reversiblen Methylierung wiesen erhöhte Läsionsgrößen, stärkeres Pilzwachstum und erhöhte JA-Isoleucin und 12-OH-JA-Isoleucin Spiegel auf. Allerdings war keine Korrelation zwischen den erhöhten JA-Isoleucin Spiegeln und der Expression von Abwehrgenen wie *PIN1* und JA-Biosyntheseenzymen wie *AOC* zu verzeichnen. Somit scheint die reversible Methylierung eine Rolle in der Pathogenabwehr gegenüber *S. sclerotiorum* zu spielen jedoch sind die Mechanismen, die zur erhöhten Suszeptibilität der Linien führen, noch unklar.

Summary:

Jasmonates are essential cellular mediators that play an important role in development and defense of biotic and abiotic stress stimuli. Jasmonic acid (JA) as central intermediate can be metabolised in different ways. One possibility is the esterification of JA *via* jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT) to methyl jasmonate (MeJA). Interestingly, this reaction is reversible as methyl jasmonate esterase (MJE) is able to hydrolyse MeJA into JA. Although the function of several JA metabolites such as JA-isoleucine, the biological most active one was elucidated, the *in vivo* function of reversible methylation is still unknown. Because JA and MeJA harbour different physicochemical properties, MeJA is assumed to function as transcellular and/or even systemic signal. This hypothesis was addressed by the analysis of transgenic plants disturbed in JA and MeJA conversion. Tomato plants overexpressing the enzymes of the reversible methylation as well as transgenic plants with reduced *MJE* expression induced *via* post transcriptional gene silencing of *MJE* were generated. Based upon *MJE*-RNAi-lines with reduced MeJA *in vitro* cleaving activity, it was analysed if MeJA is biologically active *per se* or if it only exerts its effects after hydrolysis to JA. There was no reproducible difference between control line and *MJE*-RNAi-line observed in response to MeJA application by vapor and liquid phase. To evaluate the role of MeJA as transcellular or paracrine signal, wounded leaves of all

transgenic lines were analysed with respect to changes in gene expression and oxylipin profile. To analyse if MeJA may act as a systemic signal, wounding experiments with grafting combinations of wildtype stock and MJE-RNAi scion were performed and distal gene expression was observed. The experimental results suggest that MeJA acts neither as transcellular nor as systemic signal. Furthermore, it can be excluded that MJE is involved in the perception of the systemic signal in distal tissues of the plant. Because jasmonates are involved in pathogen defense, the susceptibility against the necrotrophic pathogen *S. sclerotiorum* was also tested. All transgenic lines with alterations in reversible methylation exhibit a higher lesion diameter, enhanced growth of fungi and higher JA-isoleucine and 12-OH-JA-isoleucine levels. However, there was no correlation between high JA-isoleucine levels and expression of defense genes such as *PIN1* and JA-biosynthesis genes, e.g. *AOC*. Hence, reversible methylation seems to be involved in the pathogen response towards *S. sclerotiorum* but the mechanisms responsible for the higher susceptibility are still unknown.

2 Einleitung

Analog zum tierischen Organismus spielen auch in höheren Pflanzen Hormone eine essentielle Rolle in der Regulation von Wachstums- und Entwicklungsprozessen sowie der Reaktion auf äußere biotische und abiotische Umweltbedingungen. Jedoch entsprechen die ebenfalls in niedermolekularen Konzentrationen wirkenden Phytohormone der Pflanzen nicht dem tierischen Hormonkonzept. Tierische Hormone sind streng wirkungs- und organspezifisch, Phytohormone hingegen weisen keine obligatorische Trennung des Bildungs- und Wirkortes auf und entfalten ihre Wirksamkeit erst, wenn mehrere Hormone in definierten Mengenverhältnissen am Wirkort auftreten. So können durch Variation der endogenen Konzentration von ein und demselben Hormon lokal unterschiedliche physiologische Reaktionen ausgelöst werden. Phytohormone werden in 11 Klassen unterteilt [Schopfer & Brennicke, 2010]. Zu ihnen zählen Auxine, Gibbereline, Zytokine, Abscisinsäure, Ethylen, Brassinosteroide, Salicylsäure, Systemin, Strigolactone, Florigen und die Jasmonate. Dabei umfassen die meisten Klassen eine Gruppe strukturell ähnlicher Verbindungen, von denen allerdings nur wenige biologische Aktivitäten besitzen. Die verschiedenen Phytohormone können sowohl synergistische als auch antagonistische Funktionen zueinander aufweisen, die durch die Bindung der Substanzen an spezifische Rezeptoren und deren nachgeschaltete Signaltransduktionswege koordiniert werden. So gestaltet sich ein hochkomplexes Netzwerk, welches in jeder Zelle durch die Hormongradienten vom Entstehungs- zum Wirkort hin zu einer anderen Reaktion führen kann. [Santner *et al.*, 2009].

2.1 Jasmonate

Jasmonate sind aus Lipiden gebildete Oxylipine. Zu ihnen zählen die Jasmonsäure (jasmonic acid, JA) sowie alle Metabolite und deren Biosynthesestufen [Wasternack & Hause., 2002]. Der Name Jasmonate resultiert aus der Entdeckung des ersten Jasmonates, des Methyljasmonates, als flüchtige Verbindung im ätherischen Öl des Jasmins [Demole *et al.*, 1962]. Jasmonate ähneln sowohl strukturell als auch funktionell den in Tieren vorkommenden Prostaglandinen und werden ebenfalls durch Lipid-Oxidations-Wege

gebildet [Liechti und Farmer, 2002]. In Kombination mit anderen Phytohormonen sind sie in diverse Entwicklungsvorgänge und Abwehrreaktionen involviert, wobei die Biosynthese durch abiotische und biotische Stressfaktoren induziert wird [Wasternack *et al.*, 2012].

2.2 JA-Biosynthese

JA ist als ubiquitär auftretendes Phytohormon in nahezu allen höheren Pflanzen vertreten. Daher handelt es sich bei der Biosynthese um einen evolutionär hochkonservierten Mechanismus der zwischen den Spezies lediglich in der Anzahl der homologen Biosyntheseenzyme variiert. Die Biosynthese, bis hin zu den Metaboliten der JA, erstreckt sich über drei Kompartimente und wird initiiert durch die enzymatische Spaltung von Lipiden der Chloroplastenmembran. Die Spaltung der plastidären Lipide kann durch Phospholipasen wie GDL, Phospholipase A2 oder eine DAD ähnliche Phospholipase A1 erfolgen und führt zur Bereitstellung der Substrate [Ishiguro *et al.*, 2001; Narvaez-Vasquez *et al.*, 1999; Hyun *et al.*, 2008]. Neben dem klassischen, bereits vor fast 30 Jahren von Vick und Zimmermann aufgeklärten Biosyntheseweg, existiert ein alternativer JA-Biosyntheseweg, dessen Ausgangsverbindung die Hexadecatriensäure (16:3) darstellt (siehe Abb.1)[Vick & Zimmermann, 1983; Vick & Zimmermann, 1984; Weber *et al.*, 1997]. Ausgangsverbindung des klassischen Biosyntheseweges ist die α -Linolensäure (18:3), welche durch eine plastidäre 13-Lipoxygenase zu 13-(S)-Hydroperoxyoctadecatriensäure (HPOT) oxidiert wird. 13-HPOT ist zentrales Intermediat des LOX-Biosyntheseweges und kann auf sieben unterschiedliche Arten metabolisiert werden. Nur der Allenoxidsynthase (AOS)-Zweig des Lipoxygenase (LOX)-Biosyntheseweges führt jedoch zur Biosynthese der Jasmonate. In *S. lycopersicum* existieren zwei homologe 13-Allenoxidsynthasen (AOS) die die Bildung des instabilen Allenoxids 12,13-(S)-Epoxy-9,11,15-Octadecatriensäure (EOT) katalysieren. Aufgrund der geringen Halbwertszeit von 12,13-(S)-EOT wird ein Synthase-Cyclase Komplex postuliert der zur direkten Bildung von 9(S),13(S)-12-Oxophytodiensäure (OPDA) durch die bislang einzig identifizierte AOC in Tomate führt [Ziegler *et al.*, 2000; Brash *et al.*, 1988; Wasternack & Kombrink, 2010]. Nach der Bildung von OPDA, des ersten biologisch aktiven Jas-

monats, wird diese auf noch unbekannte Weise aus den Chloroplasten exportiert und anschließend durch den für *Arabidopsis* identifizierten ABC-Transporter COMATOSE (CTS1/PXA1/PED3) und/oder passiven Transport auf Basis des Ionenfallenprinzips in die Peroxisomen transloziert [Wasternack, 2007]. Im Peroxisom wird OPDA durch die Flavin- und NADPH-abhängige Oxidoreduktase OPR3 zu 10,11-Dihydro-12-Oxo-Phytodiensäure (OPC-8) reduziert. Bislang konnten drei Isoformen der OPR in Tomate identifiziert werden, jedoch sind OPR1 und OPR2 stereoselektiv und nur fähig 9(R),13(R)-OPDA zu reduzieren, OPR3 hingegen kann beide Isomere binden und wie AtOPR3 9(S),13(R)-OPDA in OPC-8 überführen [Breithaupt *et al.*, 2006; Schaller *et al.*, 2000]. Nachfolgend schließen sich drei Zyklen einer β -Oxidation an, die jeweils die Verkürzung der Carbonsäureseitenkette um zwei C-Atome zur Folge haben. Für Tomate sind bislang noch nicht alle beteiligten Isoenzyme identifiziert worden. Bekannt ist allerdings, dass OPC-8, OPC-6 und OPC-4 in ihre korrespondierenden Acyl-CoA-Ester überführt werden müssen. Auch wird postuliert, dass *LeACX1A* den ersten und Geschwindigkeits-limitierenden Schritt der β -Oxidation katalysiert [Li *et al.*, 2005]. Weiterhin sind an den β -Oxidationsschritten ein multifunktionelles Enzym (MFP) mit 2-trans-Enoyl-CoA-Hydratase- und L-3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität und eine 3-Keto-Acyl-CoA-Thiolase (KAT) beteiligt. Noch unbekannt ist die Umwandlung des JA-CoA-Esters durch eine Thioesterase in (+)-7-iso-Jasmonsäure, dem Endprodukt der β -Oxidation [Shockey *et al.*, 2003; Reumann, 2004; Tilton *et al.*, 2004; Wasternack & Kombrink 2010].

Neben dem Octadecanoid-Biosyntheseweg wurde für *Arabidopsis* der alternative Hexadecanoid-Biosyntheseweg entdeckt, der ausgehend von Hexadecatriensäure über das zentrale Intermediat dinorOPDA (dnOPDA) ebenfalls zur Bildung von JA führt. Für Tomate ist der Biosyntheseweg nicht aufgeklärt. Da dieser aber auf den gleichen Biosynthesenzymen wie der Octadecanoid-Biosyntheseweg beruht, 16:3-Hexadecatriensäure neben 18:3 eine Haupt-Lipid-Komponente des Tomatenblattes darstellt, sowie in anderen *Solanaceen* dnOPDA nachgewiesen wurde, könnte spekuliert werden, ob der 16:3-Biosyntheseweg auch in Tomate anzutreffen ist [Li *et al.*, 2003, Weber *et al.*, 1997, Wasternack & Kombrink, 2010].

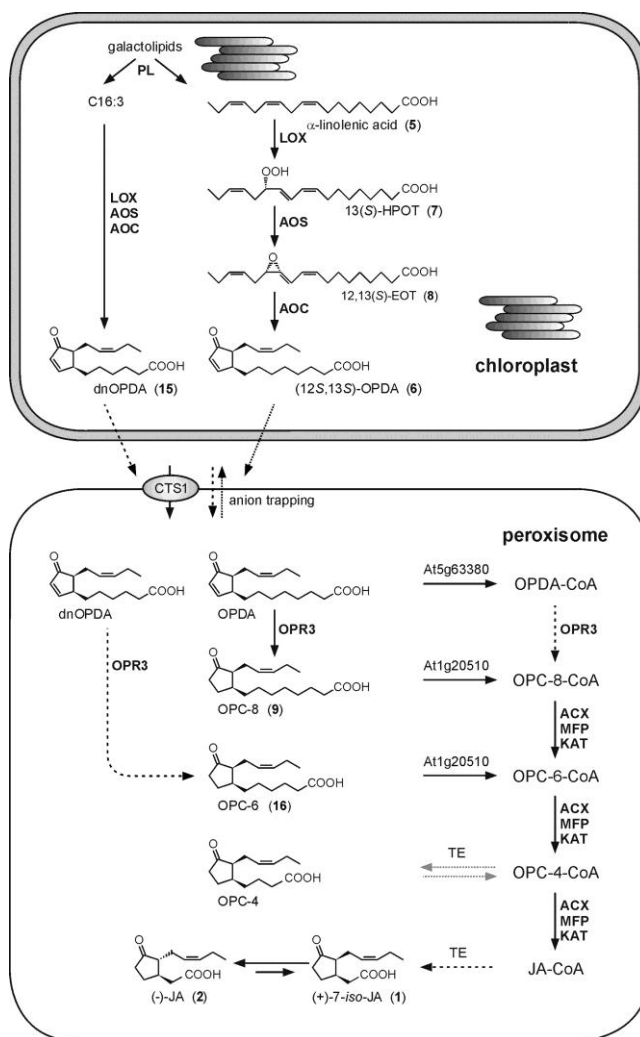


Abbildung 1: Biosynthesewege der Jasmonsäure [Wasternack & Kombrink, 2010]

2.2.1 Metabolisierung von JA

Jasmonsäure kann auf unterschiedliche Art und Weise metabolisiert werden, woraus die Bildung einer Vielzahl von Derivaten resultiert (siehe Abb.2). Diese variieren stark in ihren vorherrschenden Konzentrationen und ihren biologischen Aktivitäten. Allgemeine Voraussetzung für biologisch aktive Metabolite ist der Cyclopentanon-Ring, eine intakte Pentenyl-Seitenkette, sowie eine Carboxyl-Seitenkette mit einer geraden Anzahl von C-Atomen [Wasternack & Kombrink, 2010]. Obwohl Sembner und Parthier bereits vor fast 20 Jahren mehr als 24 Substanzen (inkl. Isomere) identifizierten, welche *in vivo* vorkommen und sich von der Jasmonsäure ableiten, sind bislang nur wenige Enzyme des JA-Metabolismus identifiziert worden [Sembner & Parthier, 1993]. Die wohl bedeutendste Form der Metabolisierung ist die Konjugation von JA mit Aminosäuren (AS) die in Toma-

te und *Arabidopsis* durch JASMONATE RESISTANT1 (JAR1) katalysiert wird [Suza *et al.*, 2010; Suza & Staswick, 2008]. Im Gegensatz zu den Auxinen, die durch Konjugation mit Aminosäuren inaktiviert werden, ist JA-Ile die biologisch aktivste Substanz, die durch die SCF^{COI}-abhängige Degradation von Transkriptionseinhibitoren eine Vielzahl von Genen aktiviert. Neben Isoleucin (Ile) können auch andere aliphatische AS wie Leucin, Valin, Phenylalanin und Methionin in Tomate mit JA durch *S/JAR1* amidiert werden, jedoch mit wesentlich geringerer Präferenz [Suza *et al.*, 2010]. Des Weiteren kann JAR1 neben JA auch andere Substrate binden, woraus die Produkte 9,10-dihydro-JA-Ile, 12-OH-JA-Ile, 11-OH-JA-Ile, OPC-8-Ile, OPC-6-Ile und OPC-4-Ile resultieren [Guranowski *et al.*, 2007]. Die Bildung von 12-OH-JA-Ile und 11-OH-JA-Ile setzt jedoch eine weitere Form der Metabolisierung, die Hydroxylierung, voraus. 12-OH-JA konnte ebenfalls als biologisch aktive Substanz identifiziert werden, die in *Solanaceen* die Knollenbildung induziert und aufgrund dessen auch als Tuberonsäure bezeichnet wird [Nakamura *et al.*, 2011]. Tuberonsäure kann neben der Konjugation mit Ile glykosyliert oder durch eine Sulfotransferase sulfatisiert werden [Wasternack & Kombrink, 2010]. Zudem konnten aufgrund redundanter Substratspezifität beteiligter Enzyme, Metabolite wie JA-Ile-Me in Tomate identifiziert werden [Hause *et al.*, 2000]. Bislang unbekannt ist das Enzym, welches für die Reduktion der JA zur Curcubinsäure verantwortlich ist [Dathe *et al.*, 1991]. Neben den bereits genannten Derivaten treten zudem flüchtige Verbindungen auf. Cis-Jasmon wird durch Decarboxylierung nach Verwundung oder Herbivorbefall gebildet und dient der direkten Abwehr und der Anlockung von Predatoren [Koch *et al.*, 1997]. Ferner kann Methyljasmonat durch die Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferase gebildet werden, welches andere biologische Eigenschaften als das flüchtigere cis-Jasmon aufweist und differente Gene induziert [Seo *et al.*, 2001; Birkett *et al.*, 2000].

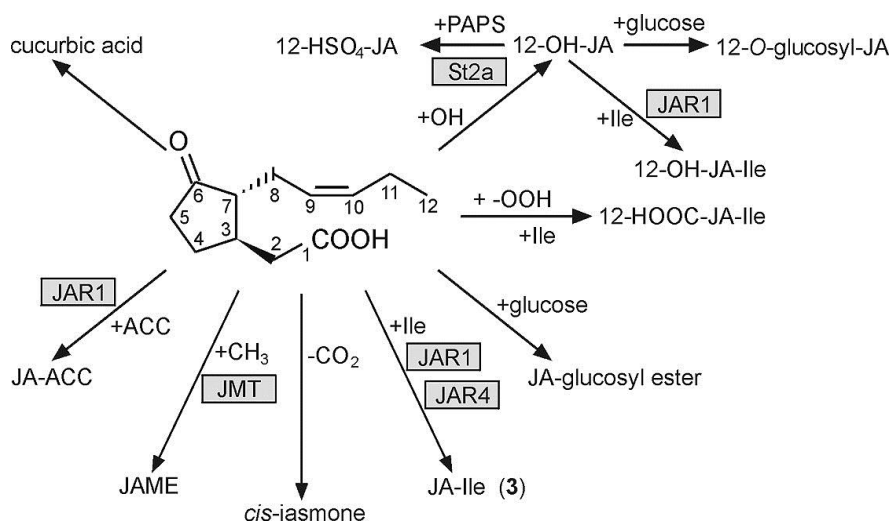


Abbildung 2: Metabolisierung der Jasmonsäure [Wasternack & Kombrink, 2010]

Nach Akkumulation biologisch aktiver Derivate müssen diese abgebaut oder metabolisiert werden um eine konstitutive Genexpression zu vermeiden. Die Inaktivierung der Metabolite kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen.

Aufgrund der Chiralität der JA wird zum einen angenommen, dass eine pH-abhängige Epimerisierung der Jasmonsäure oder ihrer Derivate zur Inaktivierung führen könnte. Fonseca *et al.*, 2009 konnten für JA-Ile eine pH-abhängige Epimerisierung des aktiven Liganden (+)-7-iso-JA-Ile nachweisen. Der nach Stress modifizierte Ionenfluss könnte somit zu einer Regulation durch Überführung in das inaktive trans-Isomer führen. JA-Ile kann aber auch durch Bildung von JA-Ile-Me inaktiviert werden da eine Methylierung von (+)-7-iso-JA-Ile die Fähigkeit der Interaktion mit dem SCF^{Coi}-Komplex verringert [Fonseca *et al.*, 2009]. Auch hydroxylierte und sulfatisierte Metabolite wie 12-OH-JA-Ile sind weniger biologisch aktiv und führen sogar in einigen Fällen zu einer Deregulierung von verwundungs-assoziierten Genen. Daher postulierten Miersch *et al.*, 2008 eine Abschaltung des JA/JA-Ile vermittelten Signals bzw. eine weitere Möglichkeit der Feinabstimmung der Signaltransduktion durch Hydroxylierung von JA-Ile zu 12-OH-JA-Ile [Miersch *et al.*, 2008]. Aufgrund der geringen biologischen Aktivität wäre zudem eine Depletion der akkumulierten JA durch Bildung des flüchtigen cis-Jasmons plausibel [Koch *et al.*, 1997].

2.2.2 Reversible Methylierung von JA

Wie unter Kapitel 1.2.1 beschrieben, ist eine der Metabolisierungsarten die Veresterung der JA zu MeJA. Interessanterweise ist diese Reaktion *in vivo* reversibel, da Methyljasmonat durch eine Methyljasmonatesterase (MJE) zu JA hydrolysiert werden kann [Stuhlfelder *et al.*, 2002]. Seo *et al.*, konnten bereits 2001 das für die Methylierung der JA verantwortliche Enzym, eine S-Adenosyl-L-Methionin-Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferase (JMT), in *A. thaliana*, identifizieren. Das 389 AS umfassende, „single copy“ Enzym gehört zur Gruppe der O-Methyltransferasen und weist starke Homologien zu anderen Vertretern dieser Gruppe, wie dem Nektar spezifischen Enzym NTR1 aus *Brassica campestris*, der Salicylsäuremethyltransferase (SAMT) aus *Clarkia breweri* und der in Tomate identifizierten Salicylsäuremethyltransferase LeSAMT auf [Seo *et al.*, 2001; Ament *et al.*, 2004]. Die in *A. thaliana* identifizierte JMT ist hoch substratspezifisch und metabolisiert neben dem primären Substrat JA nur Dihydro-Jasmonsäure (dhJA). Als Methylgruppendonator der JA-Veresterung dient das Cosubstrat SAM (S-Adenosylmethionin). Im Gegensatz zu anderen Methyltransferasen befindet sich das SAMT-Bindemotiv der JMT und der NTR1 nicht C- sondern N-terminal. Optimale Enzymbedingungen liegen *in vitro* bei einer Temperatur von 20°C, einem pH-Wert von 7,0-8,0 in Gegenwart von KCl [100 mM] vor. Die Genexpression der *A. thaliana* JMT, sowie des homologen Enzyms aus *Capsicum annuum* wird durch Verwundung, sowie MeJA-Behandlung induziert, was zu einer Selbstampfifikation führen könnte [Seo *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2005]. Inhibierend auf die *A. thaliana* JMT wirken divalente Ionen wie Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} und die monovalenten Ionen Na^+ und NH_4^+ . Die zu 92 % auf AS-Ebene übereinstimmenden Enzyme besitzen weder ein Transitpeptid noch hydrophobe Regionen, was auf eine Lokalisierung im Zytoplasma schließen lässt. Beide Enzyme werden stark in Blüten und Blättern exprimiert, die *A. thaliana* JMT jedoch nicht in jungen Blättern. Zudem ist die basale Expression in den Blättern beider Spezies relativ gering. [Seo *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2005]. Bislang konnte jedoch für Tomate kein homologes Enzym identifiziert werden.

Im Gegensatz dazu konnte das MeJA hydrolysierende Enzym in *S. lycopersicum* von C. Stuhlfelder identifiziert werden. Die MJE mit einem ORF von 789 bp kodiert für ein 262 AS langes Enzym, welches aufgrund des fehlenden Transitpeptids wahrscheinlich ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert ist. Die nur in einer Kopie im Genom vorliegende MJE ge-

hört zur Superfamilie der Hydrolasen mit α/β -Faltblattstruktur, die sich durch das hochkonservierte Motiv der katalytischen Triade auszeichnet. Homologe Enzyme konnten in unterschiedlichen Spezies identifiziert werden, wie etwa das SA-bindende Enzym SABP2 aus Tabak [Stuhlfelder *et al.*, 2002, Stuhlfelder *et al.*, 2004]. In *A. thaliana* wurde eine Familie von 20 homologen Esterasen identifiziert. Ähnlich wie die *MJE* weisen diese eine geringe Substratspezifität auf und spalten unterschiedliche Methylester. Lediglich *At-MES10* spaltet präferentiell MeJA [Vlot *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008]. Analog dazu zeigt die *SIMJE* die höchste Affinität für MeJA, hydrolysiert aber auch ABA-Me, IAA-Me, MeSA und methylierte Fettsäuren. Optimale katalytische Effizienzen werden bei einem pH-Wert von 9,0 und einer Temperatur von 40°C erzielt. Höchste Transkriptlevel wurden in Blüten und Wurzeln detektiert. Im Gegensatz zur *JMT*-Expression ist die Expression der *MJE* konstitutiv hoch und kann durch MeJA selbst sowie durch Chitosan (Bestandteil einiger Pilzzellwände) inhibiert werden. Keinen Einfluss auf die *MJE*-Expression hat dagegen MeSA. Durch die unterschiedliche Organ-spezifische Expression der *MJE* und *JMT* variieren die Verhältnisse der Substrate der reversiblen Methylierung. In Tomatenblüten ist beispielsweise ein JA:MeJA Verhältnis von 10:1 zu detektieren, wohingegen Tomatenzellkulturen ein 1:1 Verhältnis aufweisen [Stuhlfelder *et al.*, 2002; Stuhlfelder *et al.*, 2004].

Jasmonsäure konnte erstmals 1971 aus dem pathogenen Pilz *Lasiodiplodia theobromae* isoliert werden [Aldridge *et al.*, 1971]. Aufgrund zweier chiraler Zentren an C3 und C7 existieren vier theoretisch mögliche Stereoisomere. Biologisch relevant sind aber nur die endogen vorkommende trans (-)-iso-JA und cis(+)-7-iso-JA [Sembdner & Parthier, 1993]. Bedingt durch die sterische Hinderung ist cis-JA weniger stabil und epimerisiert präferentiell durch Keto-Enol-Tautomerie zu trans-JA, woraus *in vivo* ein 9:1 Verhältnis resultiert [Qunkert *et al.*, 1982]. Analog zur JA sind für MeJA prinzipiell unterschiedliche Stereoisomere möglich, jedoch ist *in vivo* nur der Ester der 3R,7S (cis)-JA zu detektieren [Farmer, 2001]. Durch die endständige Methylgruppe ist MeJA (3-oxo-2[2'-cis-pentyl]cyclopentan-1-Acetat) im Gegensatz zur JA lipophil und flüchtig. Daher wird postuliert, dass MeJA durch Membranen diffundieren kann und möglicherweise als interzelluläres Signal fungiert [Farmer, 2001; Seo *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Schillmiller & Howe, 2005]. Durch die konstitutive Expression der Enzyme der reversiblen Methylierung ist es aller-

dings schwierig Unterschiede bezüglich der biologischen Aktivitäten von JA und MeJA herauszufinden, da die exogene Applikation von JA und MeJA zur Induktion gleicher Gene führt [Taki *et al.*, 2005]. Um dennoch die Funktion von JA/MeJA innerhalb der Pflanze aufzuklären, wurden in den letzten Jahren transgene Pflanzen mit Veränderungen der reversiblen Methylierung generiert, die zu Veränderungen der endogenen JA/MeJA-Spiegel führen sollen. So konnten Seo *et al.*, 2001 die für *Arabidopsis* spezifische *JMT* klonieren und Pflanzen generieren, die das Enzym überexprimieren. Die transgenen *Arabidopsis*-Linien wiesen dreifach höhere MeJA-Level bei konstantem JA-Gehalt auf. Daher postulierten sie, dass die erhöhte Pathogenresistenz gegenüber dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* und eine konstitutive Expression der JA-Biosynthesegene *LOX* und *AOS* auf die veränderten MeJA-Level zurückzuführen sind [Seo *et al.*, 2001]. Allerdings führte eine Überexpression der *A. thaliana JMT* in Tabak zu gegenläufigen Ergebnissen. Weder eine erhöhte MeJA-Emission, noch eine Induktion der JA-Biosynthesenzyme *AOS*, *LOX* und *OPR3* konnten in dieser Spezies unter basalen Bedingungen detektiert werden [Stitz *et al.*, 2011]. Jedoch konnte in Pflanzen, in denen die *JMT* überexprimiert und zusätzlich die *MJE* durch PTGS reprimiert wurden, eine Abnahme anderer Metabolite, wie z.B. JA-Ile nach Stressinduktion, beobachtet werden. Sie schlussfolgerten daher, dass zwischen der transkriptionellen Regulierung der JA-Biosynthese und der Veränderung der Jasmonatspiegel kein direkter Zusammenhang besteht [Stitz *et al.*, 2011]. Weiterhin deuten Experimente mit transient transformierten *MJE*-RNAi-Linien darauf hin, dass exogen appliziertes MeJA nicht direkt die Expression von Abwehrgenen induziert, sondern zunächst in JA umgewandelt werden muss [Wu *et al.*, 2008]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass MeJA aufgrund seiner chemischen Eigenschaften als flüchtiges Molekül von verwundeten Pflanzen emittiert wird und in benachbarten Pflanzen die Genexpression von Abwehrgenen induziert. Da JA nicht flüchtig ist, grenzt dies die biologischen Funktionen in dieser Hinsicht klar voneinander ab. Farmer und Ryan konnten bereits 1990 in Laborversuchen die Expression von Proteinaseinhibitoren (*PIN*) in Tomaten nachweisen, die sich in relativer Nähe zu verwundeten, MeJA emittierenden *Artemisia tridentata* Pflanzen befanden [Farmer & Ryan, 1990]. Ein weiterer Beweis für die Funktion von MeJA als Inter- und Intraspezies-Langstreckensignal konnten Karban & Baldwin, 2000 auch in Freilandstudien belegen. Tabakpflanzen, die neben MeJA freisetzen den *A. tridentata* Pflanzen wuchsen, zeigten eine erhöhte Herbivor-Resistenz [Karbon & Bald-

win 2000]. Allerdings ist die MeJA-Emission Spezies-abhängig und die meisten Pflanzen weisen kaum messbare Konzentrationen an MeJA auf [Farmer, 2001]. Dies führte zur Hypothese, dass MeJA nicht als Langstreckensignal fungiert, sondern eher als flüchtiges Signal zwischen einzelnen Fiederblättchen des gleichen Blattes, die nicht direkt über das vaskuläre Gewebe miteinander in Verbindung stehen, aber ebenfalls auf Pathogenbefall und Verwundung reagieren [Tamogami *et al.*, 2008]. Bisher ist die Funktion der reversiblen Methylierung und der beteiligten Enzyme noch weitgehend unklar und bedarf weiterer Studien anhand von transgenen Linien, die zu Veränderungen des Gleichgewichtes zwischen MeJA und JA führen. Interessanterweise belegen Studien der reversiblen Methylierung von Salicylsäure, dass MeSA, eine ebenfalls flüchtige Verbindung, als Langstreckensignal zur Induktion der systemisch erworbenen Resistenz (SAR) in distalen Bereichen der Pflanze führt und dass das MeSA hydrolysierende Enzym SABP2 in diesen Teilen der Pflanze essentiell für die Perzeption des systemischen Signals ist [Park *et al.*, 2007; Vlot *et al.*, 2008]. Im Gegensatz zu MeSA ist die *in vivo* Funktion von MeJA allerdings bisher unklar. Jedoch kann ausgeschlossen werden, dass MeJA nur der Depletion eines JA-Anstieges durch Emission dient. Experimente anhand von Tabakpflanzen belegen zwar einen endogenen 70-100 fachen Anstieg der flüchtigen Verbindungen MeJA und cis-Jasmon nach Herbivorbefall, jedoch konnten durch Headspace-Analysen keine Veränderung der Emissionsrate beobachtet werden. Zudem beträgt der Anteil beider Verbindungen am Gesamt-Jasmonatgehalt nur 9 %, was für eine Inaktivierung durch Emission zu gering wäre [von Dahl & Baldwin, 2004].

2.3 Funktion der Jasmonate in Entwicklung und Abwehrreaktionen

2.3.1 Interaktion der Phytohormon-Signalwege

Wie bereits unter Kapitel 2.1 erwähnt, üben Jasmonate in Kombination mit anderen Phytohormonen wichtige Funktionen in der Entwicklung und in diversen Abwehrreaktionen der Pflanze aus. Die Verknüpfung der einzelnen Signaltransduktionswege, die zu einer fein abgestimmten, spezifischen Reaktion der Pflanze führt, kann dabei durch gemeinsame Faktoren, allgemein genutzte „second messenger“ (Ca^{2+} , H_2O_2) oder den Einfluss der Reaktion eines oder mehrerer Signaltransduktionswege auf andere erfolgen

[Kuppusamy *et al.*, 2009]. Wichtige Faktoren, die die Jasmonat-abhängigen Signaltransduktionswege mit anderen Phytohormonsignalwegen verknüpfen, sind unter anderem die Signaltransduktionsmediatoren ERF (ethylen response factor) und NPR (nonexpressor of pathogen related genes) [Bostock, 2005]. ERFs sind DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, die in unterschiedlichen Spezies identifiziert wurden [Ohme-Takagi & Shinshi, 1995; Solano, *et al.*, 1998]. In *S.lycopersicum* konnten bislang drei unterschiedliche Klassen identifiziert werden. ERF der Klasse I (ERF1) und der Klasse III (ERF4) stellen transkriptionelle Aktivatoren dar. Transkriptionsfaktoren der Klasse II, wie ERF3, hingegen fungieren als Repressoren [Tournier *et al.*, 2003]. In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass ERF1 für die Signalintegration der JA- und Ethylen-vermittelten Signaltransduktionswege zuständig ist. Ähnliche Funktionen werden für andere Vertreter dieser Gruppe postuliert [Lorenzo *et al.*, 2003]. Interessanterweise belegten Chen *et al.*, 2007, dass die Verwundungsreaktion (siehe Kapitel 2.3.3), die durch ein Zusammenspiel der JA-, Ethylen- und Systemin-Signalwege reguliert wird, keinen Einfluss auf die Expression von *LeERF3b* hat [Chen *et al.*, 2008].

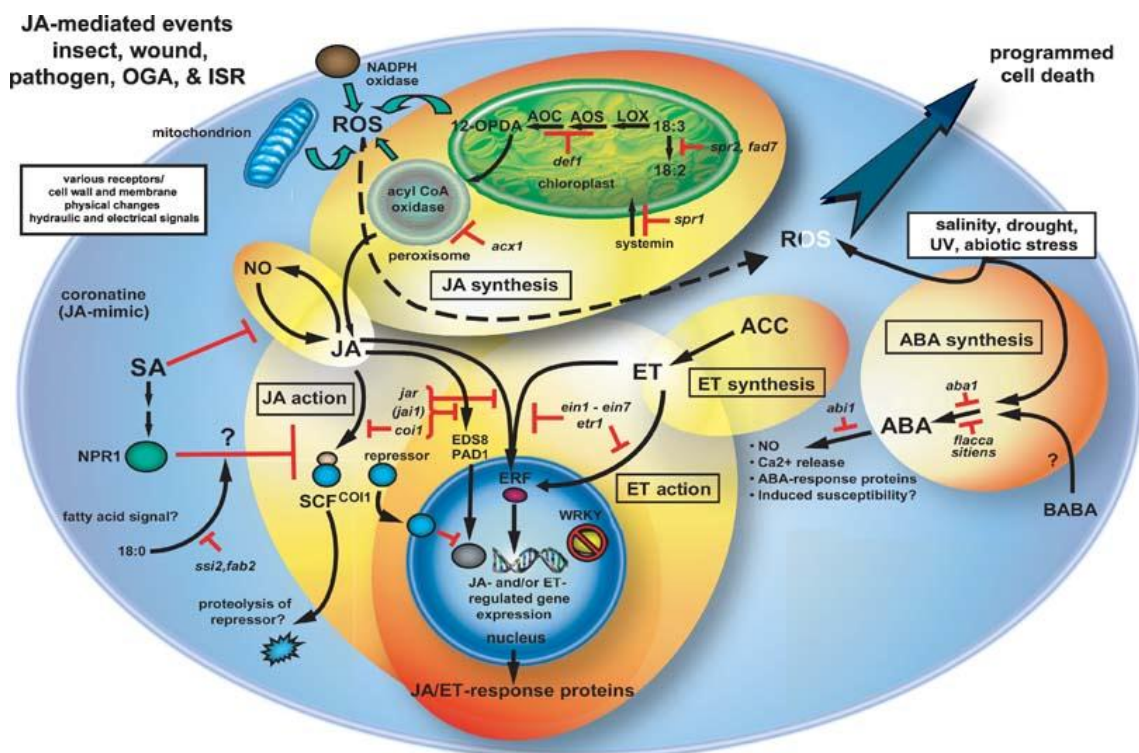


Abbildung 3: Interaktion des JA-Weges mit anderen Phytohormon-Signalwegen [Bostock, 2005]
Schwarze Pfeile: positive Wirkung; rote Balken Hemmung/Inhibierung

NPR1 konnte ebenfalls in unterschiedlichen Spezies identifiziert werden und stellt ein für die SA-induzierte Genexpression essentielles Protein dar. Die Lokalisation des Proteins sowie dessen Quartärstruktur ist abhängig von der vorherrschenden SA-Konzentration. Bei niedrigen SA-Konzentrationen liegt NPR1 im Zytoplasma als Oligomer vor. Steigt die SA-Konzentration an, werden die Redox-sensitiven Disulfidbrücken reduziert und NPR1 transloziert als Monomer in den Nukleus, induziert Abwehrgene und wirkt antagonistisch auf die JA-induzierte Genexpression. Notwendig für die Interaktion des JA/SA-Signalweges ist die nukleare Lokalisation allerdings nicht [Spoel *et al.*, 2003]. Bislang ist jedoch unklar, ob NPR1 selbst der SA-Rezeptor ist, wie es Wu *et al.*, 2012 schlussfolgern, oder ob NPR1 als Adapter für die als Rezeptor agierenden Paralogen NPR3 und NPR4 dient [Wu *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2012].

2.3.2 Jasmonate in der Entwicklung

Seit der Entdeckung der Jasmonate als Wachstums-Inhibitoren vor über 30 Jahren wird ihre Funktion in der pflanzlichen Entwicklung untersucht [Dathe *et al.*, 1981]. Da Jasmonate von Pflanzen aufgenommen werden, konnten viele Wirkungen der Jasmonate durch Applikationsstudien aufgeklärt werden. So konnte Beispielsweise gezeigt werden, dass die exogene Applikation von MeJA zu einer temporären Verzögerung des Wachstums von *S. lycopersicum* führt und α -Linolensäure und diverse Derivate die Rankenkrümmung von *B. dioica* induzieren [Boughton *et al.*, 2006; Falkenstein *et al.*, 1991]. Weitere Applikationsstudien belegten die Involvierung von JA am Stomata-Schluss, die Induktion der Knollenbildung durch 12-OH-JA und die Stimulation der Nyctinastie durch 12-OH-JA-Glu [Herde *et al.*, 1997; Yoshihara *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2006]. Der jedoch bedeutendste Effekt ist die Inhibierung des Wurzelwachstums durch JA und MeJA [Dathe *et al.*, 1981], da durch Untersuchung des Wurzelwachstums nach exogener Behandlung mit JA und MeJA zahlreiche JA-insensitive Mutanten identifiziert werden konnten. Anhand JA-insensitiver und JA-defizienter Mutanten wurden zahlreiche Funktionen endogener Jasmonate aufgeklärt. Vor allem wurde gezeigt, dass Jasmonate für die Blütenentwicklung essentiell sind. Interessanterweise führt im Hinblick auf die Fertilität die Mutation des F-Box-Proteins COI1 in *Arabidopsis* zu männlicher Sterilität, wohingegen Tomaten mit analoger Mutation weiblich steril sind, was auf Spezies-spezifische Unterschiede der Funktion der Jasmonate hindeutet und in dem unterschiedlichen Gehalt und

Konzentration der Jasmonate in verschiedenen Spezies während der Blütenentwicklung begründet sein könnte [Feys *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2004; Wasternack *et al.*, 2012]. Auch im Falle der Entwicklung sind die meisten Prozesse der JA-Ile/COI-vermittelten Genexpression zuzuschreiben, allerdings konnten Ausnahmen beobachtet werden. So ist in *S. lycopersicum* OPDA, nicht aber JA-Ile, für die embryonale Entwicklung entscheidend, da *acx1* Linien eine normale Entwicklung aufweisen [Wasternack *et al.*, 2012]. Abgesehen davon scheinen auch einige JA-Biosynthesegene während der Entwicklung JA-Ile-unabhängig reguliert zu werden, da die AOC in Samenanlagen der *jai1* Mutanten von *S. lycopersicum* akkumuliert, die eine Mutation in dem zu *COI* orthologen Gen aus *Arabidopsis* tragen [Goetz *et al.*, 2012].

Jedoch sind die zu verzeichnenden Effekte, wie bereits erwähnt, meist nie allein auf die Akkumulation der JA in den entsprechenden Geweben zurückzuführen, sondern eher auf eine Veränderung der Verhältnisse der Phytohormone untereinander. So führt die vermehrte Bildung der JA beispielsweise zu einer Inhibierung des Auxin-induzierten Streckungswachstums bzw. der Auxin- und Zytokinin-induzierten Samenkeimung [Sembner & Parthier *et al.*, 1993]. Interessanterweise sind viele der Wachstumsregulierenden Phytohormone auch in diverse Abwehrprozesse involviert, was die Vermutung nahelegt, dass Entwicklungs- und Abwehrprozesse in einem komplexen Netzwerk unterschiedlicher Phytohormon-Signalwege eng miteinander verknüpft sein müssen [Pieterse *et al.*, 2009].

2.3.3 Jasmonate in der Wundantwort in Tomate

Seit der Entdeckung der wundinduzierten Expression der Proteinase-Inhibitoren (PIN) vor 40 Jahren [Green & Ryan, 1972] gilt *S. lycopersicum* als Modellorganismus zur Analyse Wund-abhängiger Prozesse. Bei der Wundantwort handelt es sich nicht um die Aktivierung eines linearen, autonomen Signalweges, sondern um eine fein abgestimmte Interaktion mehrerer Signale, die je nach Art, Stärke und Dauer der Verwundung zu unterschiedlichen Ausprägungen der Abwehr führt [Schillmiller & Howe, 2005; Stork *et al.*, 2009]. Die Hauptmediatoren der lokalen Verwundungsreaktion stellen die Phytohormone JA und Systemin dar, die über einen gemeinsamen Signalweg agieren (siehe Abb.4)[Farmer & Ryan, 1992; Lee & Howe., 2003; Sun *et al.*, 2011]. Ausgelöst durch lokale Verwundung werden die in Phloem-Parenchymzellen lokalisierten Vorläuferproteine

Prosystemin A und B zu Systemin prozessiert [Li & Howe, 2001]. Das 18 AS lange Peptid wird in das vaskuläre System sekretiert und fungiert dort als Ligand des auf der Oberfläche der Begleitzellen lokalisierten Rezeptors SR160 [Schillmiller & Howe 2005], welcher zur Klasse der „*Leucine-Rich Repeat (LRR)-Receptor Like Kinases*“ (RLK) gehört. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Reihe von schnell ablaufenden Signal-Ereignissen, wie der Membran-Depolarisierung, Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration und Aktivierung einer MAP-Kinase-Kaskade [Felix & Boller 1995; Stratmann & Ryan 1997; Schaller & Oecking, 1999]. Allerdings ist bislang unklar, was zur Aktivierung der JA-Biosynthese führt. Studien mit *spr1*-Linien deuten allerdings darauf hin, dass SPR1 die Systemin-Perzeption an der Plasmamembran mit der Aktivierung der PLA1 im Chloroplasten verknüpft [Ishiguro *et al.*, 2001; Schillmiller & Howe, 2005]. Alternativ könnte die ebenfalls durch Verwundung aktivierte PLA2 zur Bereitstellung des JA-Vorläufers Linsäure führen [Navàez-Vàsquez *et al.*, 1999]. Die konstitutive Expression der JA-Biosyntheseenzyme ermöglicht einen rapiden, ersten JA-Anstieg vor Veränderung der Genexpression [Hause *et al.*, 2003; Stenzel *et al.*, 2003; Koo & Howe 2009]. Ein weiterer JA-Anstieg erfolgt über die Amplifikation der JA-Biosyntheseenzyme durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus zwischen Prosystemin, JA und AOC. JA induziert endo- und exogen sowohl die eigenen Biosyntheseenzyme als auch die Expression von Prosystemin. (Pro)systemin wiederum induziert die Transkription von JA-Biosyntheseenzymen [Ryan & Moura, 2002; Schillmiller & Howe, 2005]. Der daraus resultierende Anstieg von JA geht mit einer lokalen Expression früh- und spät-responsiver Abwehrgene, wie der Polygalacturonase und *PIN* einher [Orozco-Cardenas *et al.*, 2001].

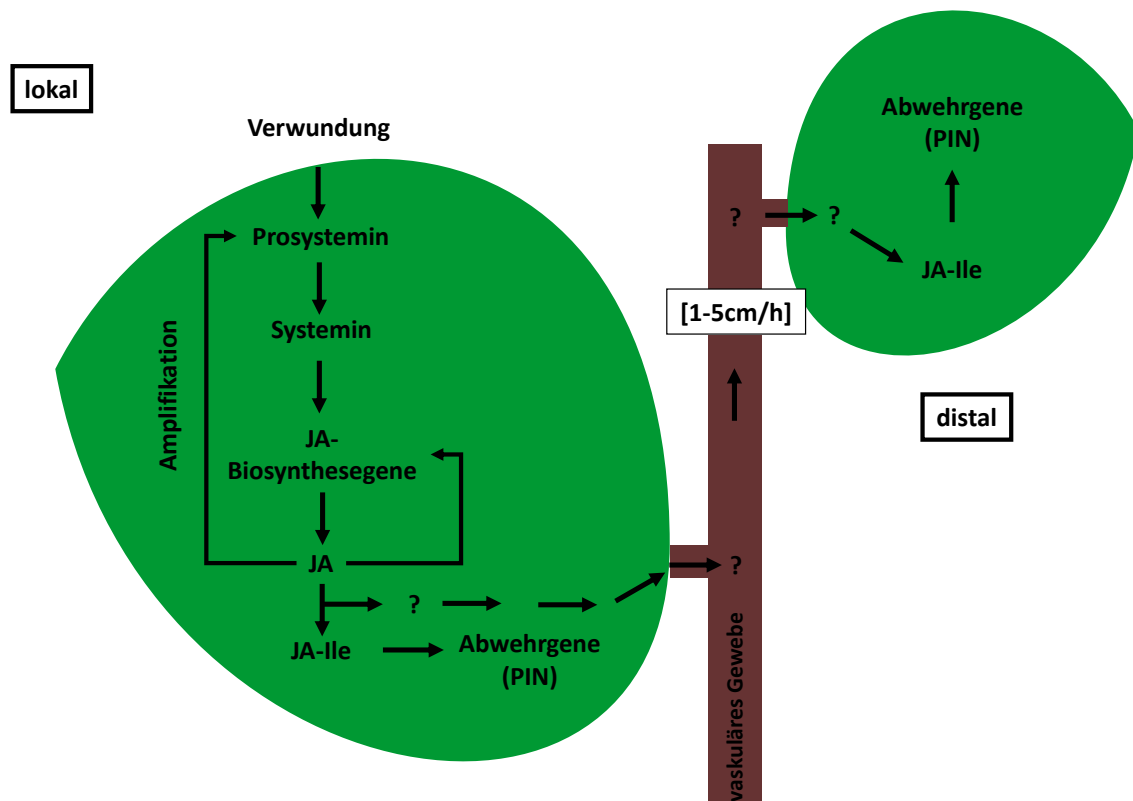


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Verwundungsreaktion (modifiziert nach Schillmiller & Howe, 2005; Wasternack *et al.*, 2006)

Interessanterweise führt die Verwundung nicht nur zu einer lokalen Reaktion sondern auch zu einer Expression der JA-abhängigen Gene in entfernten, unverwundeten Bereichen der Pflanze [Green & Ryan 1992]. Bislang ist aber unklar, welche Mechanismen zur Regulation der distalen Genexpression führen, bzw. was als systemisches Signal fungiert. Reziproke Pfropfungsexperimente mit den Linien *acx1*, *spr1* und *jai1* erwiesen sich als hilfreiches Mittel um herauszufinden, welche Gene für die Generierung bzw. für die Perzeption des systemischen Signals notwendig sind [Li *et al.*, 2005; Lee & Howe, 2003; Li *et al.*, 2002]. Die Experimente führten zur Erkenntnis, dass eine lokale *de novo* Biosynthese, sowie eine distale Perzeption des Signals essentiell sind. Nicht relevant ist anscheinend die distale *de novo* JA-Biosynthese. Somit konnten anfängliche Vermutungen, Systemin fungiere allein als systemisches Signal, verworfen werden [McGurl *et al.*, 1994; Wasternack, 2007]. Auch eine iterative Propagation zwischen JA und Prosystemin im vaskulären Gewebe kann aufgrund der Geschwindigkeit der distalen Genexpression [1-5 cm/h] ausgeschlossen werden [Ryan, 2000; Schillmiller & Howe, 2005]. Aufgrund der primären Lokalisation der Biosyntheseenzyme des JA-Biosyntheseweges im vaskulären

Gewebe, der ausschließlichen Expression der AOC mRNA in den Geleitzellen und der distalen Genexpression, die mit der Transportgeschwindigkeit im Phloem einhergeht [40 cm/h] wird postuliert, dass ein Jasmonat als systemisches Signal fungiert [Stenzel *et al.*, 2003; Wasternack, 2007]. Zudem können Jasmonate ihren eigenen Transport fördern [Heil & Ton, 2008]. Immunolokalisierungs-Studien belegen eine basale, sowie wundinduzierte Akkumulation von JA und JA-Ile in Mesophyllzellen, Xylem und Phloem-Parenchymzellen. Distal ist eine ähnliche, allerdings schwächere Verteilung zu beobachten, die mit den vorherrschenden JA-Spiegeln korreliert. Strassner *et al.*, 2002 detektierten nach Verwundung in distalen Bereichen der Pflanze nur 10 % der lokalen JA-Spiegel [Mielke *et al.*, 2011; Strassner 2002]. Weiterhin ist in Versuchen, in denen Pflanzen radioaktiv-markierte JA oder MeJA appliziert wurde, ein bidirektionaler Transport von MeJA, nicht aber von JA, im vaskulären Gewebe nachgewiesen worden [Thrope *et al.*, 2007].

Allerdings belegen Pfropfungsexperimente, dass COI wichtig für die Perzeption des systemischen Signals in distalen Blättern ist [Li *et al.*, 2004]. Somit müsste MeJA, falls es als systemisches Signal agiert, distal mittels MJE in JA konvertiert und anschließend zu JA-Ile amidiert werden. Eine genaue Aufklärung, ob JA, JA-Ile oder MeJA von der lokalen Verwundungsstelle in entlegene, nicht verwundete Bereiche der Pflanze transportiert wird, könnten Pfropfungsexperimente mit JMT-OE, MJE-RNAi oder *jar1*-Linien liefern.

Fraglich bleibt aber, wie ein durch das Phloem transportiertes Signal auch in Blättern, zwischen denen keine vaskuläre Verbindung besteht, eine rasche Genexpression hervorrufen kann. Heil & Ton stellten daher die Hypothese auf, MeJA könnte als Kurzstreckensignal benachbarter, nicht über das vaskuläre Gewebe verbundener Blätter dienen, da die geringen Emissionsraten hierfür ausreichend wären [Heil & Ton, 2008]. Andere Theorien sprechen für die Involvierung physikalischer Signale sowie für die Kombination aus einem schnellen elektrischen Signal, welches zu einer rapiden, allgemeinen Reaktion aller benachbarten Zellen entlang des vaskulären Gewebes führt, die durch ein späteres, langsames Phloem-transportiertes Signal letztlich spezifiziert wird [Koo & Howe, 2009; Zimmermann 2009].

Eine Differenzierung unterschiedlicher Wundsignale erfolgt weiterhin durch eine Involvierung der Phytohormone Ethylen, Abscisinsäure, Auxin und Gibberellin, sowie der ROS Spezies H₂O₂, die einen positiven Effekt auf die Wundantwort ausüben, sowie der SA, welche antagonistisch wirksam ist [Wasternack, 2006].

Die Entdeckung von H_2O_2 als „second messenger“ der Wundantwort lieferte zudem eine Erklärung für die *PIN*-Expression in den Mesophyllzellen, die in keinem direkten Kontakt zum vaskulären Gewebe stehen. Die Aktivierung des JA-Biosyntheseweges im vaskulären Gewebe induziert die Expression dort lokalisierter, früh responsiver Gene wie der Polygalacturonase, die die Freisetzung von Oligogalacturoniden zur Folge hat. Diese aktivieren die NADPH-Oxidase-vermittelte Bildung von H_2O_2 in den Leitbündelzellen, von wo aus der „second messenger“ in wässriger Lösung durch den Apoplasten transportiert wird und anschließend in Mesophyllzellen nahe des vaskulären Gewebes diffundiert. Dort findet letztlich die H_2O_2 vermittelte Induktion der *PIN*-Expression statt [Orozco-Cardenas *et al.*, 2001].

Neben den zahlreichen Reaktionen die innerhalb der Pflanze ablaufen, werden auch flüchtige Verbindungen von der Pflanze freigesetzt, wie etwa Ethylen, GLV (green leaf volatiles) und MeJA. Für MeJA konnte eine Rolle als Intraspezies- und Interspezies- Langstreckensignal zur Induktion der Abwehrreaktionen in benachbarten Pflanzen belegt werden [Farmer & Ryan 1990; Karban & Baldwin, 2000]. Heil & Ton vermuten, dass abhängig von der Konzentration der flüchtigen Verbindungen unterschiedliche Reaktionen ausgelöst werden. Hohe Konzentrationen könnten eine direkte Aktivierung der Abwehrprozesse einleiten, wohingegen geringe Konzentrationen das „Priming“ der Pflanze verursachen. Erst die Erkennung eines vaskulären Signals würde zu einer schnelleren, vollständigen Reaktion der vorgewarnten Pflanze führen [Heil & Ton 2008].

2.3.4 Jasmonate in der Pathogenabwehr:

Kulturpflanzen sind in ihrer Umwelt täglich diversen Pathogenen ausgesetzt. Da sie im Gegensatz zu Tieren kein adaptives Immunsystem besitzen, sind sie auf das angeborene Immunsystem jeder Zelle und der Fähigkeit ausgehend von der Infektionsstelle systemische Signale generieren zu können, angewiesen. Obwohl die Abwehr von bakteriellen Pathogenen intensiv untersucht wurde („zigzag-Modell“), ist bislang wenig über die Pathogenabwehr gegenüber Eukaryoten, wie Pilzen, erforscht worden [Jones & Dangl, 2006]. Bekannt ist, dass die Abwehrstrategien auf der heterotrophen Ernährungsweise und der Infektionsstrategie der Pathogene basieren [Pieterse *et al.*, 2009]. Generell zeigen sich biotrophe Pathogene empfänglich gegenüber SA-vermittelten Abwehrprozessen, nekrotrophe Pathogene hingegen sind anfällig gegenüber JA- und Ethylen-

vermittelten Abwehrstrategien (Abb. 5)[Glazebrook 2005; Thomma *et al.*, 2001]. Biotrophe Mikroorganismen, die sich von lebendem Gewebe ernähren, werden lokal durch die SA-abhängige Induktion der hypersensitiven Reaktion (HR, hypersensitive response) und des damit einhergehenden programmierten Zelltodes (PCD, programmed cell death) an ihrer Ausbreitung gehindert. Zudem wird durch die SA-Akkumulation im Phloem die systemisch erworbene Resistenz (SAR, systemic acquired resistance) hervorgerufen, die in den nicht infizierten distalen Geweben zur Expression von Abwehrgenen führt [Yalpani *et al.*, 1991]. Pfropfungsexperimente an Tabakpflanzen konnten zudem zeigen, dass die SA-Methyltransferase SABP2 sowohl im lokalen Gewebe, in dem das systemische Signal entsteht, als auch im distalen Gewebe für die Signalerkennung notwendig ist. Dies führt zu der Annahme, dass MeSA das systemische Signal der Pathogenresistenz darstellt [Park *et al.*, 2007]. Allerdings wird auch über die Involvierung von Jasmonaten und einem Lipid-Transfer-Protein spekuliert [Vlot *et al.*, 2008]. Nekrotrophe Pathogene, wie *S. sclerotiorum* und *B. cinerea*, welche sich von totem Gewebe ernähren, profitieren vom Zelltod der Pflanze und haben im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, HR-ähnliche Symptome zu induzieren, die ebenfalls zu PCD-ähnlichem Absterben des Pflanzengewebes führen [Govrine & Levine, 2000]. Infektionen mit *B. cinerea* induzieren in Tomate einen Anstieg von JA, OPDA, JA-Ile und Systemin und aktivieren entsprechende Abwehrreaktionen. Allerdings sezerniert das nekrotrophe Pathogen ein Exopolysaccharid, was in einer vermehrten SA-Bildung und *NPR1*-Expression resultiert. *NPR1* interagiert mit dem JA-Biosyntheseweg, indem es die Expression von *PIN1* und *PIN2* hemmt, was die Suszeptibilität der Pflanze erhöht [El Oirdi *et al.*, 2011].

Wie auch in der Verwundungsreaktion, ist in der Pathogenabwehr das Verhältnis der unterschiedlichen Phytohormone entscheidend für die Feinabstimmung der Signalwege. Geringe SA-Konzentrationen scheinen die JA/Ethylen-abhängige Pathogenresistenz zu begünstigen, wohingegen hohe Konzentrationen antagonistisch wirken [Spoel *et al.*, 2007]. Weiterhin scheinen nicht nur die absoluten Konzentrationen und Verhältnisse der Phytohormone von Bedeutung zu sein, sondern auch die zeitliche Abfolge der Aktivierung ihrer Signalwege, die wiederum aus einer Vielzahl von Signaltransduktionskomponenten bestehen, die ebenfalls miteinander interagieren, was die Komplexität der Netzwerke erhöht und das Verständnis erschwert [O'Donnell, 2003, Pieterse *et al.*, 2009].

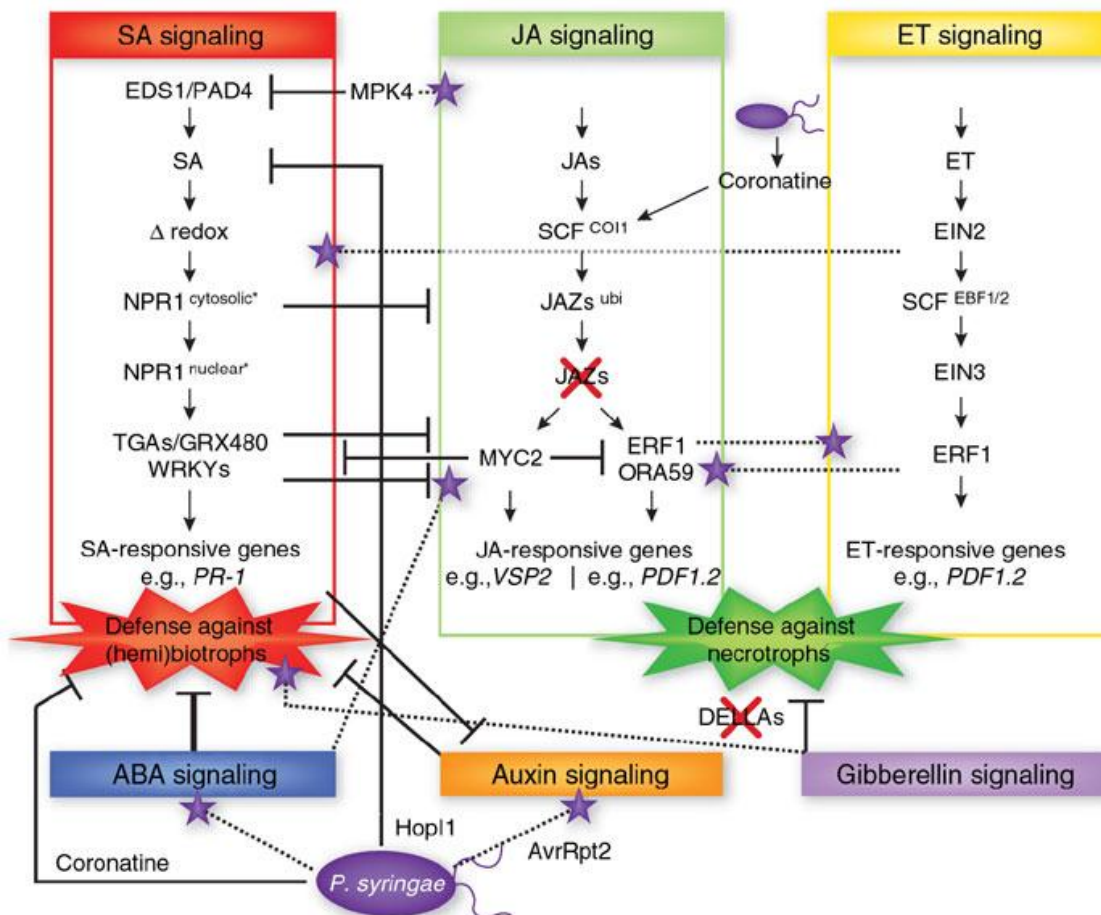


Abbildung 5: Interaktion der Phytohormonsignalwege in der Pathogenabwehr (Pieterse *et al.*, 2009)

Die Basis der Pathogenabwehr bilden SA-, JA- und Ethylen-Signalwege, die durch weitere Phytohormone beeinflusst werden. Schwarze Balken: negativer Effekt; Sternchen: positiver Effekt

2.4 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Sclerotinia sclerotiorum ist ein homothallischer, nekrotropher Organismus, der aufgrund seiner geringen Wirts-Spezifität über 400 hauptsächlich dikotyledone Pflanzenspezies infiziert [Boland & Hall, 1994]. Pflanzen, die von dem nekrotrophen Pilz befallen sind, zeigen zunächst an der Infektionsstelle bräunliche, wassergefüllte Läsionen, die sich rasch über das Blatt zum Stamm hin ausdehnen. In späteren Stadien treten weiße Myzelablagerungen, meist in Kombination mit der Bildung von Sklerotien und welke Blätter oberhalb der Infektionsstelle als Symptome auf [Bolton *et al.*, 2006]. Sklerotien stellen melanisierte Aggregate der Hyphen dar, die als Langzeit-Überlebensformen des Pilzes dienen und bis zu acht Jahre keimungsfähig bleiben [Ayers & Adams 1979]. In Abhängigkeit vom Wirt und den vorherrschenden Umweltbedingungen kann die Keimung der Sklerotien über die Ausbildung eines Apotheticums (carpogene Keimung) oder direkt

über das Myzel erfolgen (myzeliogene Keimung)(siehe Abb. 6). Die Ausbildung infektiöser Hyphen durch die carpogene Keimung erfordert die Ausbildung eines Fruchtkörpers, des Apotheticums und den darin entstehenden Ascosporen. Nach impulsartiger Freisetzung der Ascosporen können diese keimen und den Wirt infiltrieren [Bolton *et al.*, 2006]. Im Gegensatz dazu entstehen durch myzeliogene Keimung infektiöse Hyphen, die die Pflanze direkt penetrieren können [Le Tourneau, 1979].

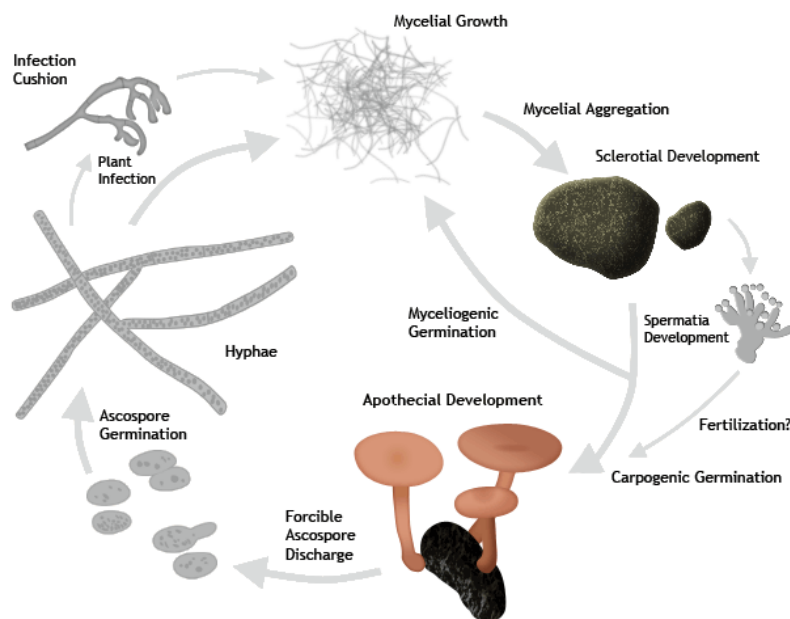


Abbildung 6: Lebenszyklus von *S. sclerotiorum* [<http://www.sclerotia.org>]

Die Pathogenese von *S. sclerotiorum* kann generell in 3 Phasen unterteilt werden. Die erste, saprophytische, opportunistische Phase umfasst die Kolonisierung und die Penetration des Wirtes durch Ausbildung eines Apressoriums, Bildung hydrolytischer Enzyme oder durch die direkte Penetration über die Stomata. Die zweite, pathogene Phase beginnt mit der konstitutiven Expression der Polygalacturonase (SSPG1) und einer Protease, was zur Freisetzung von Oligogalacturonsäure (OGA) und Peptiden führt. Zudem sekretiert *S. sclerotiorum* in dieser frühen pathogenen Phase Oxalsäure. Der spätere Abschnitt der pathogenen Phase wird durch die Expression der Zellwanddegradierenden Enzyme (CWDE) und der Ausbildung nekrotischer Läsionen geprägt. In der letzten, saprophytischen, nekrotischen Phase wird die vorab induzierte Expression der CWDE reprimiert und es kommt zur Bildung von Sklerotien, welche zuvor durch hohe

cAMP-Konzentrationen und geringe Glukosespiegel unterdrückt wurde [Hegedus & Rimmer, 2005]. Essentiell für die Pathogenität des Pilzes und die damit einhergehende Ausbildung der Läsionen ist die Sekretion der Oxalsäure (OA). Mutanten, die keine OA produzieren, sind nicht infektiös und bilden keine Sklerotien [Dickman & Mitra, 1992; Godoy *et al.*, 1990; Tu, 1985]. Oxalsäure akkumuliert in der frühen Phase der Infektion und wirkt durch pH-Wert-Senkung indirekt toxisch auf den Wirt, jedoch aktivierend bezüglich der Aktivität der CWDE [Noyes & Hancock, 1981; Favaron *et al.*, 2004]. Weiterhin unterdrückt sie den NADPH-Oxidase-abhängigen „oxidative-Burst“ und ermöglicht durch Chelatierung von Ca^{2+} die Polygalacturonase-abhängige Hydrolyse von Ca^{2+} -Pectat, was die Zellwandintegrität zerstört [Cessna *et al.*, 2000; Bateman and Beer, 1965]. Außerdem kann Oxalsäure zur Öffnung der Stomata und zur Verhinderung des ABA-abhängigen Stoma-Schlusses führen [Guimarães and Stotz, 2004]. Neben Oxalsäure wird das Polyketid Sclerin produziert, welches phytotoxisch wirkt und zur Ausbildung von Nekrosen führt. Andere Polyketide, wie Scleron, sind hingegen nicht toxisch [Pedras & Ahiahonu, 2004].

3 Zielsetzung

JA kann durch das Enzym JMT zu MeJA verestert werden, sowie MeJA durch die MJE zu JA umgewandelt werden kann. Aufgrund der endständigen Methylgruppe ist MeJA flüchtiger und lipophiler als JA und wird daher neben seiner Funktion als Inter- und Intraspezies Signal der Verwundung als mobiles, systemisches Signal diskutiert. Allerdings ist noch weitestgehend unklar, ob MeJA direkt oder aber indirekt nach Hydrolyse und Amidierung zu JA-Ile Abwehrreaktionen der Pflanze vermittelt.

Daher sollte zunächst analysiert werden, ob MeJA und JA unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen, was aufgrund der differenten physikochemischen Eigenschaften der Substanzen plausibel wäre. Dieser Hypothese kann aber nicht durch exogene Applikation der Substanzen an Wildtyp (Wt)-Pflanzen nachgegangen werden, da dies aufgrund der konstitutiven Expression der Enzyme der reversiblen Methylierung zu einer raschen Einstellung des endogen bestehenden Gleichgewichtes führen würde. Daher sollten u.a. MJE-RNAi-Linien generiert werden, die durch PTGS (Post transcriptional gene silencing) reduzierte Transkriptmengen der *MJE* und eine verminderte MeJA-Hydrolyseaktivität aufweisen. Die Analyse der Geninduktion durch exogen appliziertes MeJA in diesen transgenen Linien sollte zeigen, ob MeJA direkt zur Induktion der Genexpression führt oder ob die Hydrolyse mittels MJE zu JA notwendig ist.

Um zu klären, ob MeJA ein parakrines Signal darstellt, sollten das Oxylinprofil und die Expression Jasmonat-responsiver Gene nach Verwundung in Linien mit verringerter Expression der *MJE* oder mit verstärkter Expression der *JMT* oder *MJE* analysiert werden. Der Frage nach einer Rolle von MeJA als systemischem Signal sowie einer Funktion von MJE bei der Signalperzeption im distalen Gewebe wurde mit Pfropfungsexperimenten nachgegangen. Nach der zu testenden Hypothese wird JA im verwundeten Gewebe zu MeJA verestert und zu unverwundeten Geweben transportiert, wo es nach Umwandlung zu JA durch die MJE und Amidierung zu JA-Ile die Genexpression induziert. MJE-RNAi-Sprosse sollten auf Kontrolllinien-Unterlagen gepfropft und die Genexpression nach Verwundung im distalen Gewebe analysiert werden.

Weiterhin galt es die Rolle der reversiblen Methylierung in der Pflanzen-Pathogenen-Interaktion festzustellen. Da bekannt ist, dass Jasmonate an der Abwehr von nekrotro-

phen Pilzen beteiligt sind, sollte die Suszeptibilität der transgenen Linien gegenüber *S. sclerotiorum* untersucht werden. Analysiert wurden die Läsionsgrößen, das Wachstum des Pilzes, das Oxylinprofil und die Expression JA-responsiver Gene.

Um die JA-abhängige Genexpression auch räumlich und zeitlich beobachten zu können, wurde das Luziferase-Gen unter der Kontrolle des JA-responsiven *Arabidopsis OPR3*-Promotors stabil in *S. lycopersicum* transformiert. Zusätzlich wurden VIGS-Vektoren zum PTGS der *JMT* und *MJE* kloniert um den Einfluss der reversiblen Methylierung in Bezug auf diverse Stimuli anhand des Reportersystems *in vivo* nachvollziehen zu können.

4 Materialien

4.1.1 Pflanzenmaterial

Alle Versuche fanden im Hintergrund von Wt-Pflanzen oder transgenen Linien von *S. lycopersicum* Mill. cv. Moneymaker statt. Eine Übersicht der transgenen Linien ist Tabelle 5 zu entnehmen.

4.1.2 Antibiotika

Antibiotikum	Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Cefotaxim	50 mg/ml	50 µg/ml
Gentamicin	15 mg/ml	15 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Spectinomycin	100 mg/ ml	100 µg/ml
Streptomycin	100mg/ml	100 µg/ml
Ticarcillin (Timentin)	160mg/ml	160 µg/ml

4.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	Merck (Darmstadt)
Agar	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	peqGOLD Universal Agarose, PEQLAB (Erlangen)
Acetosyringon	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumacetat	AppliChem (Darmstadt)
Beef-Extrakt	Becton, Dickinson and Company (Heidelberg)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich® Chemie (Steinheim)
Coomassie-Brillant-Blau G 250	AppliChem (Darmstadt)
Chloroform	AppliChem (Darmstadt)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem (Darmstadt)
Ethanol	AppliChem (Darmstadt)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt)

Formaldehyd	AppliChem (Darmstadt)
Formamid	AppliChem (Darmstadt)
Gelrite	Duchefa (Haarlem, NL)
Glucuronsäure	Sigma-Aldrich® Chemie (Steinheim)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
Glycogen	Fermentas (St. Leon-Roth)
Guanidiniumthiocyanat	Peqlab (Erlangen)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt)
Isopropanol	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem (Darmstadt)
Di-Kaliumhydrogenphosphat	AppliChem (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Fermentas (St. Leon-Roth)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Methyljasmonat	Sigma-Aldrich® Chemie (Steinheim)
Microagar	Duchefa (Haarlem, NL)
Murashige & Skoog (MS) Salze	Duchefa (Haarlem, NL)
Natriumacetat - Trihydrat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich® Chemie (Steinheim)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem (Darmstadt)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	AppliChem (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumhypochlorid (NaOCl)	AppliChem (Darmstadt)
Saccharose	Südzucker AG (Mannheim)
Sucrose	Südzucker AG (Mannheim)
Tris	Sigma-Aldrich® Chemie (Steinheim); Fluka
Triton X-100	AppliChem (Darmstadt)
Trypton	AppliChem (Darmstadt)
Tween 20	AppliChem (Darmstadt)
Wasser (HPLC-Grade)	

4.1.4 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Bakterienkulturröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
HPLC-Gefäß	Chromacol (Welwyn Garden City, England)
Klebefolie für 96-Well Platte	Sarstedt (Nümbrecht)
96-Loch Platte	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
Petrischalen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
RE-Becher (10,8x8,2x9,6mm)	Wächter (Leopoldshöhe)
Reaktionsgefäß (1,5ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäß (2,0ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäß (15ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäß (50ml)	Hartenstein (Saustedt)
Schraubdeckelgefäße (2ml)	Hartenstein (Saustedt)
Whatman-Papier	GE-Healthcare (Freiburg)

4.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	AT200, Mettler-Toledo (Giessen)
Autoklav	Systec 5075ELV, Tuttnauer (NY, USA)
CCD-Kamera	VisiLuxx Imager, Visitron Systems (Puchheim)
Geldokumentation	UV-Systeme, Intas (Göttingen)
Inkubator 28°C / 37°C	Thermo Scientific Heraeus B6120
HPLC	ACQUITY-UPLC®-System Waters/Micromass (Milford, USA)
Kugelmühle	MM 301, Retsch (Haan)
Kühl- und Gefrierschränke	8°C/-20°C, Liebherr (Ochsenhausen)
Massenspektrometer	Quattro Premier triple-quadrupole mass spectrometer, Waters (Milford, MA, USA)
Mikrowelle	Privileg 8020 (Fürth)
pH-Meter	inoLAB pH 720, WTW (Weilheim)
qRT-PCR-Gerät	C1000TM Thermal Cycler, Bio-Rad Labora-

	tories, (Hercules, CA, USA)
Rotations-Vakuumkonzentrator	RVC 2-25, Heraeus-Christ (Osterode)
Spektralphotometer	Nanodrop 1000, Thermo Scientific (Hamburg)
Thermocycler	Mastercycler ep gradient S, Eppendorf (Hamburg)
Thermo-Schüttler	Thermomixer comfort, Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugen	Centrifuge 5417 R, Eppendorf (Hamburg) Centrifuge 5804 R, Eppendorf (Hamburg)

4.1.6 Phytohormone und synthetische Analoga

Phytohormon/Analogon	Stocklösung	Endkonzentration
Benzylaminopurin (BAP)	1mg/ml	1 µg/ml
1-Naphthylelessigsäure (NAA)	2mg/ml	2 µg/ml
Zeatin	2mg/ml	2 µg/ml

4.1.7 Puffer

DNA-Ladepuffer (6x):

Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %
EDTA	20 mM
Glycerin	30 %

MinA-Puffer:

K ₂ HPO ₄	52,5 g/l
KH ₂ PO ₄	22,5 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
Na-Citrat	2,5 g/l

4.1.8 Medien:

Agro-Induktionsmedium:

MS-222	6,6 g/l
NAPO ₄ [400 mM]	313 µl
BAP	1 µg/ml
Acetosyringon [50 mM]	10 µl
AB-Stocks	1:1000
<hr/>	
add	10 ml

MinA Medium (pH=5,7):

MinA-Puffer	10 ml
MgSO ₄ [20 %]	50 µl
Glucose [20 %]	500 µl
<hr/>	
add	50 ml

MS2-Medium (pH= 5,4):

MS222	4,4 g/l
Sucrose	20 g/l
Gelrite	3 g/l

MSO-Medium (pH=5,4):

MS-231	4,4 g/l
Glucose	30 g/l

2N1B-Medium (pH=5,8):

MS-222	4,4 g/l
Sucrose	20 g/l
NAA	2 µg/ml
BAP	1 µg/ml
Acetosyringon	40 µg/ml
Glucuronsäure	160 µg/ml
Micro-Agar	8 g/l

SSR-Kallus-Medium (pH=5,7):

MS-231	4,4 g/l
Sucrose	20 g/l
Zeatin	1 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Ticarcillin	160 µg/ml
Cefotaxim	50 µg/ml
Micro-Agar	8 g/l

SSR-Wurzel-Medium (pH=5,7):

MS-231	4,4 g/l
Sucrose	20 g/l
Kanamycin	50 µg/ml
Ticarcillin	160 µg/ml
Cefotaxim	50 µg/ml
Micro-Agar	8 g/l

LB-Medium (pH 7):

Trypton	10g/l
Hefeextrakt	5g/l
NaCl	10g/l

YEB-Medium (pH 7,2):

Beef-Extrakt	5g/l
Hefe-Extrakt	1g/l
Trypton	5g/l
Saccharose	5g/l
MgSO ₄	0,49g/l
(Agar)	15g/l

Die Medien wurden bei 3bar und 121°C 1,5 autoklaviert. Antibiotika, Phytohormone und synthetische Analoga wurden nach dem Autoklavieren zugegeben und zuvor sterilfiltriert.

4.1.9 Enzyme

Enzym	Hersteller
Absolute™ QPCR SYBR Green Capillary Mix	Thermo Fischer (Hamburg)
Calf Intestine Alkaline Phosphatase [1 U/μL]	Fermentas (St. Leon-Roth)
DNase I, RNase free [1 U/μL]	Fermentas (St. Leon-Roth)
M-MLV Reverse Transkriptase RNase H (-)	Promega (Mannheim)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase [10 U/μL]	Fermentas (St. Leon-Roth)
RNase H	Invitrogen (Carlsbad, USA)
True Start™ Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase [5 U/μL]	Fermentas (St. Leon-Roth)
T4 DNA Ligase [1 U/μL]	Fermentas (St. Leon-Roth)
XbaI [10 U/μL]	Fermentas (St. Leon-Roth)

4.1.10 Primer**Primer zur Klonierung der pHannibal-RNAi Vektoren:**

Primer	Sequenz 5`-3`	Bezeichnung	Bp
MJEfor-XhoI	CTCGAGCCTGAAGTCTTAGCAACC	sense	453-757
MJErev-KpnI	GGTACCACAAGAAGAAAGATCCCT		
MJEfor-XbaI	TCTAGACCTGAAGTCTTAGCAACC	antisense	453-757
MJErev-HindIII	AAGCTTACAAGAAGAAAGATCCCT		

Primer zum Transgennachweis:

Primer	Sequenz 5`-3`	Bemerkung
MJEF0509	GATAAAGGAAAGGCTATCA	MJE-RNAi
MJER0509	GTAGTATTTGCCAATAGG	
MJErevzu35S 35SF17	GTAGTATTTGCCAATAGG TCTCCACTGACGTAAGG	MJE-Überexpression
JMTF0509	TAAAGGAAAGGCTATCAT	JMT-RNAi/Überexpression
JMTR0509	TGTTATTATTAACCCGGTC	
pHan201 S35intern	CAACTTTTATCTTCTTCGTCTTACACATC TGAGACTTTTCAACAAAGGATAATTTTCG	RNAi-Leervektor
Tom-RbcS-Forw	CGTGGAATGTTTGACTAATGTAGG	Rubisco
Tom-RbcS-Rev	CAAGCCTGGGTTCGTATTATC	

Light cycler Primer:

Primer	Sequenz 5`-3`	Amplikon
<i>AOC</i>	ATCGCCGTT CAGGGAGC TCAGTGCGGCCCTTC	252
<i>EF-1α</i>	TACTGGTGGTTTTGAAGCTG AACTTCCTTCACGATTTTCATCATA	124
<i>ERF3</i>	TCATCATCGCCGTTAGATCT TTCCGGTGGAGGAAAGTTGA	300
<i>JMT</i>	GAATCGCCGACTTAGGCTGC GTCCGTAGAACGAACCTGGG	275
<i>MJE</i>	CCACCTCTCTCGTGTTAGGC CTGGACCTCATCTGGTGGA	262
<i>NPR1</i>	CAGCTGTGGCCTTCATGGTT GGCCCTTGCAGACCAAGTTC	298
<i>PINII</i>	CACAGGGTACAAGGGTTGCTA TATTTGCCTTGGGTTTCATCAC	83
fungales Aktin	TCTTGAGAGCGGTGGTATCC GATGATGGTGCAAGAGCAGT	167

4.1.11 Vektoren

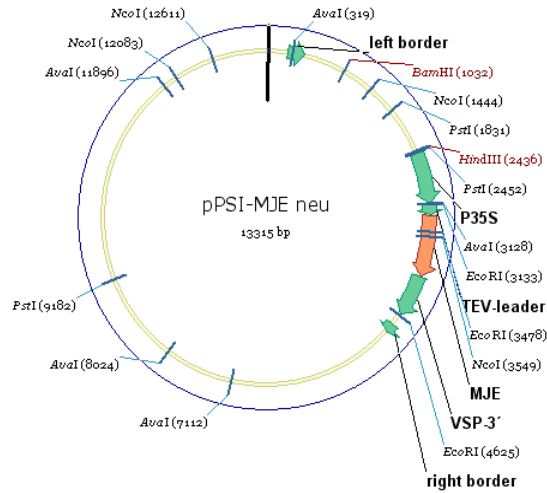


Abbildung 7: Vektorkarte pPSI-MJE neu

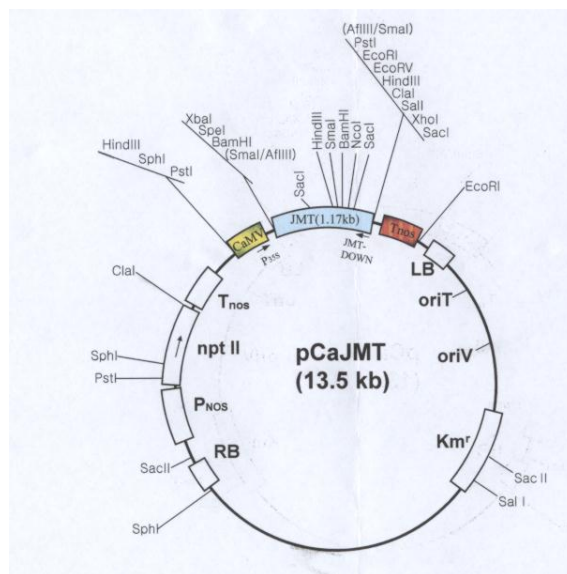


Abbildung 8: Vektorkarte pCaJMT [Seo *et al.*, 2001]

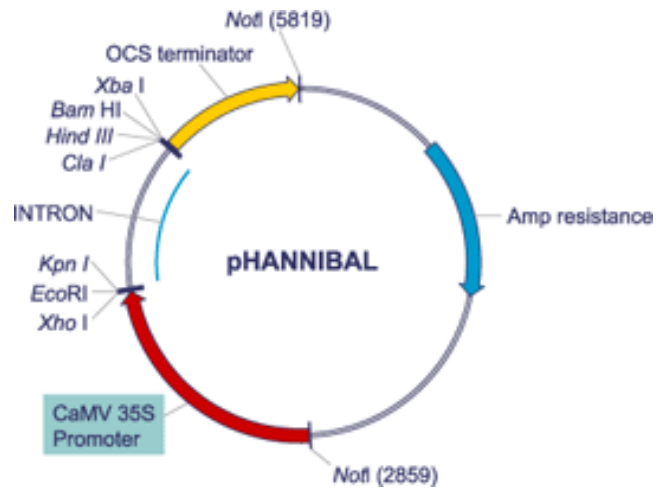


Abbildung 9: Vektorkarte pHANNIBAL zur Klonierung von RNAi-Vektoren
 [http://www.pi.csiro.au/RNAi/vectors.htm]

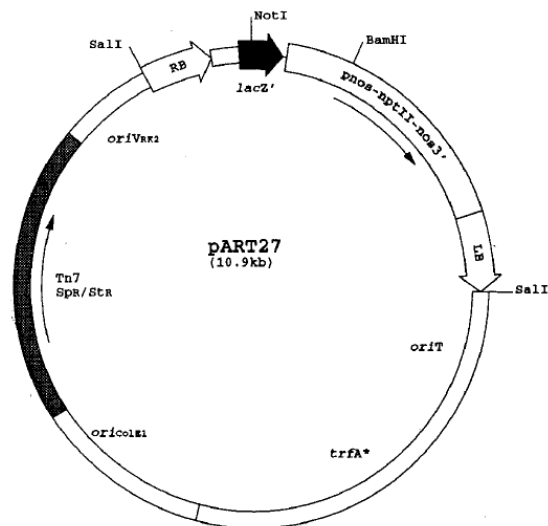


Abbildung 10: Vektorkarte des binären Konstruktes pART27 [Glaeve, 1992]

5 Methoden

5.1 Arbeiten mit Bakterien

5.1.1 Kultivierung und Stammhaltung

5.1.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssig- und auf LB-Festmedium. Für die Flüssigkulturen wurden 4 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika [1:1000] (siehe Kapitel 4.1.2) verwendet und ÜN-Kulturen nach dem Animpfen bei 37°C und 500 rpm kultiviert. Die Konservierung erfolgte durch Vermischung von 650 µl Bakterien-ÜN-Kultur in 2 ml Schraubdeckelgefäßen mit 150 µl Glycerin [50 %]. Gelagert wurden die Glycerinstocks bei -80°C. Die Stammhaltung auf LB-Platten erfolgte durch Ausstreichen der Flüssigkulturen der Glycerin-Stocks, Inkubation bei 37°C ÜN und weiterer Lagerung bei 4°C.

5.1.1.2 Kultivierung von *A. tumefaciens*

Die Kultivierung von *A. tumefaciens* erfolgte in YEB-Flüssig- und YEB-Festmedium. Flüssigkulturen wurden ÜN in sterilen Bakterienröhrchen mit 4 ml YEB-Medium und den entsprechenden Antibiotika (1:1000 Verdünnung der Stocks, siehe Kapitel 4.1.2) bei 28°C und 500 rpm kultiviert. Die Propagation auf Festmedium erfolgte durch Ausstreichen der Flüssigkulturen oder Glycerinstocks. Nach 2 d Inkubation bei 28°C konnten die YEB-Platten 6-8 Wochen bei 4°C gelagert werden.

5.1.2 Herstellung kompetenter Zellen

5.1.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Um Bakterienzellen für eine Transformation empfänglich zu machen, wurde die Calciumchlorid-Methode angewandt. Diese basiert darauf, dass divalente und multivalente Kationen die Kompetenz zur Aufnahme von endogener DNA erhöhen bzw. erst ermöglichen. Hierzu wurden 150 ml LB-Medium in einem 500 ml Schikanekolben mit 1,5 ml einer Vorkultur beimpft und auf dem Schüttler bei 37°C und 350 rpm weiterkultiviert. Die Hauptkultur wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 in 50 ml Reagiergefäße überführt und 7

min bei 2700 rcf und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die entstandenen Pellets vorsichtig in 25 ml CaCl₂ [100 mM] resuspendiert. Nach 30 min Lagerung auf Eis wurde erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Pellet in 7,5 ml eiskaltem CaCl₂ [100 mM] aufgenommen. Nach 2-3 h Lagerung auf Eis erfolgte die Zugabe von 1,5 ml Glycerin, die Aliquotierung zu je 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen sowie die Endlagerung bei -80°C. Für eine direkte Transformation empfahl sich die weitere Lagerung bei 4°C ohne Zugabe von Glycerin. Maximale Transformationseffizienzen wurden 12-24 h nach der Resuspendierung erzielt.

5.1.2.2 Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*

Für die Herstellung kompetenter Agrobakterien wurde eine ÜN-Vorkultur (siehe Kapitel 5.1.1.2) in einen 300 ml Schikanekolben mit 100 ml YEB Medium überführt und bis zu Beginn der exponentiellen Phase auf dem Schüttler kultiviert. Idealerweise wurden Kulturen mit einer OD von 0,5-0,6 in 50 ml Falcontubes überführt und 5 min bei 3700 rcf und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in 5 ml eiskaltem TE Puffer resuspendiert. Erneut wurde 5 min bei 3700 rcf bei 4°C pelletiert und anschließend in 7 ml eisgekühltem YEB-Medium resuspendiert. 200 µl der Zellsuspension wurden direkt zur Transformation verwendet oder für eine Lagerung bei -80°C mit 150 µl 10 % Glycerin [v/v] versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

5.1.3 Transformation

5.1.3.1 Transformation von *E. coli*

Chemisch kompetente Zellen wurden für die Hitzeschocktransformation auf Eis aufgetaut, bzw. konnten direkt verwendet werden (siehe 5.1.2.1). Nach Zugabe der Plasmid-DNA (1-100 ng, bzw. 10 µl eines 20 µl Ligationsansatzes) folgte eine 30 min Inkubationsperiode auf Eis. Nach der Präzipitation der Plasmid DNA an der Bakterienzellwand erfolgte die Aufnahme der Plasmide durch eine 70 s Inkubation bei 42°C und eine ebenfalls 70 s Lagerung auf Eis. Zur Regeneration wurden 350 µl LB-Medium in die Reaktionsgefäße pipettiert und die Zellen in einem Thermoblock bei 350 rpm für 2-4h bei 37°C inkubiert.

5.1.3.2 Transformation von *A. tumefaciens*

Die kompetenten Zellen (siehe 5.1.2.2) wurden 30 min auf Eis aufgetaut oder lagerten im Falle einer direkten Weiterverwendung 5 min auf Eis. Anschließend wurde vorsichtig 1 µg Plasmid-DNA einer reinen Minipräparation (mittels Kit) hinzupipettiert. Die Zellen inkubierten für weitere 5 min auf Eis, bevor sie für 5 min in flüssigen Stickstoff gegeben wurden. Direkt nach dem Auftauen der Zellen im Inkubator bei 37°C wurden 300 µl YEB-Medium hinzupipettiert. Die Regeneration der Zellen vollzog sich 2-4 h bei konstant 28° und 300 rpm auf einem Thermoblock. Zur Selektion der Transformanten wurden die Agrobakterien auf YEB-Platten mittels steriler Glaskugeln ausplattiert und 2 d bei 28°C inkubiert.

5.1.4 Minipräparation von Plasmid-DNA

5.1.4.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Alkalische Lyse)

Die Plasmid-Isolierung aus *E. coli* erfolgte bei „low copy“ Plasmiden anhand von 2 ml ÜN-Kultur, bei „high copy“ Plasmiden mit 1,5 ml Bakterienkultur. Nach Gewinnung der Bakterienpellets durch 2 maliges Zentrifugieren für 1 min bei 11000 rcf wurden die Pellets in 200 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend erfolgte die bakterielle Lyse durch Zugabe von 200 µl Lösung II, 7 maliges Invertieren der Reaktionsgefäße und 3 min Inkubation bei RT. Die Lyse wurde durch Zugabe von 200 µl Lösung III und erneutes 7 maliges Invertieren gestoppt. Nach 10 min Inkubation auf Eis fand eine 10 min Zentrifugation bei 20800 rcf statt. Der Überstand wurde ohne weißes Kalium-SDS Präzipitat in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 600 µl Isopropanol versetzt, gemischt und nach 2 min RT bei 20800 rcf 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets 2 mal mit 70 % EtOH gewaschen. Abschließend wurden die Pellets getrocknet, in 40 µl ddH₂O aufgenommen und ggf. mit 2 µl RNase für 30 min inkubiert .

5.1.4.2 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels Kit

Zur Aufreinigung hochreiner Plasmid-DNA wurde das Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas verwendet. Alle Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers, mit Ausnahme der Elution. Diese erfolgte abweichend mit 40 µl ddH₂O unter den angegebenen Bedingungen.

5.1.4.3 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens*

Die Minipräparation von Agrobakterien vollzog sich anhand von ÜN-Kulturen (siehe 5.1.1.2). Je 750 µl der Bakterienlösung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 15000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut 750 µl der Bakteriensuspension in die Reaktionsgefäße transferiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die Resuspendierung der Bakterienpellets mittels 200 µl eiskalter Lösung I und Vortexmixer. Nachfolgend wurden 200 µl Lösung. II hinzupipettiert, 7 mal invertiert und 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 30 µl Phenol/Lösung II {1:2} sowie nach Homogenisierung die Zugabe von 150 µl Lösung III. Nach schneller Durchmischung wurden die Reaktionsgefäße für >15 min bei -20°C gelagert. Es schloss sich eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 15000 rcf an. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem 2 fachen Volumen eiskaltem EtOH [100 %] versetzt. Zur Fällung der Plasmid DNA erfolgte eine 15 min Inkubationsperiode (-80°C) inklusive 1 min Zentrifugation bei 4°C und 15000 rcf. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei RT getrocknet. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte in 300 µl Lösung IV. Zur Phenolisierung wurde zunächst Phenol/Lösung IV [1:1] equilibriert, die wässrige Phase verworfen, erneut Lösung IV im gleichen Volumen zugegeben, gemischt, 2 min zentrifugiert und die Phenol-haltige Phase entnommen. 300 µl der equilibrierten phenolhaltigen Phase wurden zu den resuspendierten Pellets hinzupipettiert, gut durchmischt, 5 min zentrifugiert und der Überstand entnommen. Zum Überstand wurde das gleiche Volumen CIA (Chloroform/Isoamylalkohol [24:1]) pipettiert und nach gründlicher Durchmischung 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das 2 fache Volumen EtOH [100 %] beigefügt. Die nachfolgende Fällung fand ÜN bei -20°C und anschließender 15 min Zentrifugation statt. Abschließend wurde 2 mal mit 70 % EtOH gewaschen, das Pellet getrocknet und in 25 µl dH₂O aufgenommen.

Lösung I:

Glukose	50 mM
Tris pH 8,0	25 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM

Lösung II:

NaOH	0,2 N
SDS	1 % [w/v]

Lösung III:

Natriumacetat (pH 4,8)	3 M
---------------------------	-----

Lösung IV:

Tris pH 8,0	100 mM
NaCl	100 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

5.1.5 Colony screen PCR**5.1.5.1 „Colony screen“-PCR von *E. coli***

Um erfolgreiche Transformationsereignisse nachweisen zu können, wurden angewachsene Kolonien der Selektionsplatten mittels steriler 20 µl Spitze gepickt und in 25 µl ddH₂O resuspendiert. 10 µl der Suspension wurden als Matrize für die Kolonie-PCR zum Nachweis des Transgens eingesetzt. Alle Bedingungen entsprachen den unter Kapitel 5.4.3 beschriebenen.

5.1.5.2 „Colony screen“-PCR von *A. tumefaciens*

Zur direkten Verwendung der Agrobakterien für eine „Colony-screen“-PCR wurden wie unter Kapitel 5.1.1.2 beschrieben Vorkulturen angeimpft. 500 µl der Kulturen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 2 min bei 11000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Bakterienpellet in 500 µl ddH₂O resuspendiert. Erneut erfolgte eine 5 min Zentrifugation bei 11000 rcf, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl ddH₂O aufgenommen. Der Aufbruch der Bakterienmembran vollzog sich durch 10 min Inkubation bei 95°C im Thermoblock. Nach 15 min Zentrifugation bei 11000 rcf wurden 10 µl des Überstandes für eine Colony Screen PCR eingesetzt (Kapitel 5.4.3).

5.2 Arbeiten mit *S. lycopersicum*

5.2.1 Oberflächensterilisation der Samen

Zur Oberflächensterilisation von *S. lycopersicum* wurden Samen 90 s mit 70 % EtOH [v/v] behandelt, der Überstand abgenommen, anschließend 20 min mit Bleichlösung [1,5 % Natriumhypochlorid, 0,1 % Tween-20] inkubiert und 5 mal mit sterilem ddH₂O gewaschen. Putativ transgene Samen wurden in RE-Bechern mit 100 ml Kanamycin-haltigem Medium [50 µg/l] und Wt Samen für die Transformation in RE-Bechern mit 250 ml Medium ohne Zugabe von Antibiotika ausgelegt. Die Boxen wurden 10-12 d bei konstant 22°C und Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) gelagert.

5.2.2 Pflanzenanzucht

Nach der Keimung der putativ transgenen Pflanzen wurden die Keimlinge im Kotyledonenstadium in Töpfe (7 cm Durchmesser) mit Topferde pikiert und in den Klimakammern unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit) weiterkultiviert.

5.2.3 „Leaf disc“-Transformation

Die stabile Transformation von *S. lycopersicum* Mill. cv. Moneymaker via *A. tumefaciens* wurde in Anlehnung an A. J. Pfitzner, Comic *et al.*, 1986 und einem bestehendem Protokoll der AG von Prof. Dr. T. Roitsch durchgeführt. Für die Transformation wurden ausschließlich die Agrobakterienstämme LB4404 und C58C1 mit den Ti-Plasmiden pAL4404 /pTi6S3SE verwendet, welche mit modifizierten Plasmiden des binären Vektors pART27 transformiert wurden.

1. Tag

Am ersten Tag der Transformation wurden die transformierten Agrobakterien in Bakterienröhrchen mit 4 ml MinA-Medium und den entsprechenden Antibiotika angeimpft und auf dem Schüttler bei 28°C kultiviert.

2. Tag

Am zweiten Tag wurden die Vorkulturen der Agrobakterien mittags in 150 ml Schikanekolben mit 50 ml Agro-Induktionsmedium überführt und ÜN weiterkultiviert. Parallel dazu wurden die 10-12 d alten Wt Pflanzen, sofern sie sich noch im Kotyledonen-

stadium befanden, präpariert. Die Spitze der Kotyledonen wurde unter aseptischen Bedingungen mittels Schere entfernt und die Keimblätter in der Hälfte durchtrennt. Mit der abaxialen Seite nach oben wurden die Pflanzenstückchen auf den „feeder“ Platten (2N1B-Medium) ausgelegt und mit Parafilm verschlossen. Die Platten wurden einen Tag bei 22°C unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkelheit) gelagert.

3. Tag

Die Hauptkultur der Agrobakterien wurde unter sterilen Bedingungen in 50 ml Reaktionsgefäßen transferiert, 3 min bei 3700 rcf und RT zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet in 15 ml MSO Medium resuspendiert. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert und in der 15 ml Bakteriensuspension resuspendiert. Die OD₆₀₀ wurde bestimmt und mittels MSO Medium auf den Wert 0,138 eingestellt. Kotyledonenstückchen wurden mittels Pinzette in die Agrosuspension überführt und mindestens 30 min inokuliert. Nachfolgend wurden die Blattscheiben auf steriles Whatman-Papier transferiert, von beiden Seiten vorsichtig getrocknet und erneut auf N1B Platten ausgelegt. Diese wurden mittels Parafilm verschlossen und für eine optimale Transformationseffizienz 2 d im Dunkeln gelagert.

5. Tag

Nach der Inkubation wurden die Blattstückchen auf SSR-Platten zur Selektion ausgelegt und wöchentlich auf neue Selektionsplatten transferiert.

Nach etwa 3-4 Wochen entwickelten sich Kalli, die ebenfalls wöchentlich umgesetzt wurden. Überschritten diese eine gewisse Größe wurden sie in RE-Bechern mit SSR-Medium überführt. Aus den Blattstückchen entwickelten sich 3-4 Monate nach erfolgreichen Transformationsereignissen die ersten Pflanzen. Diese wurden oberhalb des Kallusgewebes abgeschnitten und auf Wurzelinduktionsmedium überführt. Nach weiteren 2 Wochen entwickelten diese Wurzeln. Dabei wurde die Ausbildung von Adventivwurzeln durch Abschneiden unterbunden. Pflanzen mit Wurzelgewebe wurden auf Erde pikiert und im Gewächshaus kultiviert.

5.2.4 Samengewinnung

Tomaten wurden entsprechen ihres Reifegrades geerntet und mittels eines Skalpell horizontal halbiert. Die Fruchtkammern wurden ausgehöhlt und die enthaltenen Sa-

men in ein Teesieb überführt. Mittels Löffel und mehrmaligem Waschen mit H₂O wurde das Fruchtfleisch grob entfernt. Die Samen wurden in 50 ml Reagiergefäße transferiert, mit H₂SO₄ [5 %] überschichtet und 4-6 h auf dem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Samen durch 5 maliges Waschen mit ddH₂O mittels einer Wasserstrahlpumpe vom Fruchtfleisch befreit. Die Samen wurden anschließend bis zur Trocknung bei 37°C gelagert, in 2 ml Reagiergefäße überführt und bei 4°C gelagert.

5.2.5 Pfropfung durch Kopulation

Um die systemische Verwundungsreaktion in *S. lycopersicum* eruieren zu können wurden Pfropfungen durchgeführt. Dies basiert auf der Fähigkeit dikotyler Pflanzen an der Verwundungsstellen Lateralmeristem (Kambium) als Schutzreaktion ausbilden zu können, welches zur Symphyse zweier Pflanzen führt. Hierbei wird die physische Integrität durch neue Verbindung des Leitgewebes zwischen zwei Pflanzen gleicher oder ähnlicher Sorte hergestellt. Da der untere Teil der Pfropfbastarde verwundet werden sollte, wurden 4-6 Wochen alte Pflanzen nach der Technik der Kopulation gepfropft.

Die Pflanzen die als Unterlage und Edelreis miteinander kombiniert werden sollten wurden der Größe nach ausgesucht und an der Schnittstelle mittels Ethanolgetränktem Wattestäbchen desinfiziert. Die Schnitte erfolgten in einem 45° Winkel mittels Rasierklinge, welche nur für 2-4 Schnitte verwendet wurde. Unterlage und aufgepfropfter Pflanzenspross wurden unmittelbar mit sterilisierten Siliconclips verbunden, die durch Metallstäbe fixiert wurden, und durch Besprühung mit Wasser befeuchtet. Zur weiteren Anzucht und Wundheilung wurden die Pflanzen in eine Plexiglas-kammer mit integriertem Bewässerungssystem (Humidity Controll II) gestellt, welches eine kontinuierliche Luftfeuchtigkeit von 90-100 % gewährleistete. Nach Auftreten der Wundverbrennung, Ausbildung des Intermediärgewebes und der Kallusbildung an der Pfropfungsstelle wurden die Pflanzen langsam akklimatisiert. Dies vollzog sich durch regelmäßige Wasser-Besprühung in Frischhaltefolie versiegelten Plastikboxen. Experimente wurden abhängig von der Symphyse der Pfropfpartner 4-5 Wochen nach der Pfropfung durchgeführt. Die Umgebungstemperatur während der Kultivierung betrug konstant 24°C.

5.3 Arbeiten mit *S. sclerotiorum*

5.3.1 Kultivierung

Die Propagation von *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary erfolgte über die Gewinnung der Sclerotien (Dauerkörper). Jeweils eine Sclerotie wurde unter sterilen Bedingungen in der Mitte einer PDA-Medium enthaltenden Petrischale ausgelegt und 14-21 Tage bei RT stehen gelassen. Nach Bildung und Maturation neuer Sclerotien am Rand der Petrischale wurden diese entnommen und in 10 % igem Glycerin [v/v] in 2 ml Schraubdeckelgefäßen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.3.2 Gewinnung infektiöser Hyphen

Zur Gewinnung infektiösen Myzels wurde je eine Sklerotie unter sterilen Bedingungen aus den zuvor aufgetauten Glycerinstocks (Kapitel 5.3.1) entnommen und in der Mitte einer Minimalmedium enthaltenden Petrischale plziert, mit Parafilm verschlossen und bei 22°C gelagert. 5-6 Tage nach Induktion der myzeliogenen Keimung wurden die infektiösen Hyphen an den Randbereichen des Myzels mittels Korkbohrer ausgestantzt.

5.3.3 Inokulation von *S. lycopersicum*

Zur Untersuchung der Pathogenresistenz gegenüber *S. sclerotiorum* wurden Blätter von *S. lycopersicum* mit infektiösem Myzel inokuliert. Je 2 Blätter der 6-8 Wochen alten Versuchspflanzen wurden behandelt. Die wie unter Kapitel 5.3.2 beschrieben gewonnenen Agarstückchen mit definiertem Durchmesser von 8 mm wurden invers auf 10 Fiederblättchen mittels Spatel aufgelegt. Je nach Entwicklungszustand der Pflanzen wurde das dritt und viert- bzw. das zweit- und drittälteste Blatt behandelt. Die Pflanzen befanden sich in Plastikboxen, welche mit Hauben versehen und mit Frischhaltefolie luftdicht versiegelt wurden. Die Bestimmung der Läsionsgrößen und die Gewinnung des Probenmaterials erfolgte 24 h post Inokulation und nach 48 h/ bzw. in späteren Experimenten 40 hpl bei RT. Kontrollpflanzen wurden mit Agarstückchen ohne Pathogen behandelt und in separaten Boxen bis zur Probennahme zu den angegebenen Zeitpunkten belassen.

5.4 DNA-technische Methoden

5.4.1 Quantifizierung von DNA

Die Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration anhand der Extinktion erfolgte mittels NanoDrop® UV/Vis-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Als Hintergrund wurde das jeweilige Lösemittel der Nukleinsäuren vermessen. Als konstanter Faktor wird zugrunde gelegt, dass bei einer OD von 1 die Konzentration einer DNA-Lösung 50 ng/µl, die einer RNA-Lösung 40 ng/µl entsprechen. Daraus ergeben sich folgende Formeln zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration:

$$c_{\text{DNA}} [\text{ng}/\mu\text{l}] = E_{260} \cdot 50 [\text{ng}/\mu\text{l}]$$

$$c_{\text{RNA}} [\text{ng}/\mu\text{l}] = E_{260} \cdot 40 [\text{ng}/\mu\text{l}]$$

5.4.2 DNA-Isolierung aus Blattmaterial

Für die Isolierung genomischer DNA aus Blättern von *S. lycopersicum* wurden ca. 100 mg gemörsertes, gefrorenes Pflanzenmaterial in 2 ml Schraubdeckelgefäßen gegeben und mit einer Keramikugel versehen. Zu den Proben wurden im gefrorenen Zustand 750 µl CTAB-Extraktionspuffer und 750 µl Chloroform pipettiert und umgehend gemischt. Nach einer 30-60 minütigen Inkubation bei 65°C im Wasserbad folgte die Zentrifugation der Proben bei 7500 rcf für 10 min. Die obere organische Phase wurde ohne die in der Interphase enthaltenen Proteine in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und gemischt. Nach kurzer Inkubation bei RT wurde die genomische DNA durch Zentrifugation bei 20800 rcf 10 min gefällt. Der Überstand wurde verworfen und die Proben 2 mal mit EtOH [70 %] gewaschen bevor das Pellet bei RT bis zur Trockne belassen wurde. Die Aufnahme der Pellets erfolgte in 40 µl ddH₂O. Da CTAB unspezifisch mit Nukleinsäuren Komplexe bildet wurden die Proben 30 min bei 37°C mit 2 µl RNase A behandelt bevor sie bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert wurden.

CTAB-Extraktionspuffer:

CTAB	2 %
Tris	100 mM
EDTA	20 mM
EtSH	0,2 %

5.4.3 PCR

Zur Amplifikation definierter DNA-Sequenzen wurde die von Mullis erfundene PCR-Methode angewandt [Mullis *et al.*, 1986]. Als Matrize diente genomische DNA, Plasmide, cDNA oder bereits vorhandene PCR-Produkte. Die den zu amplifizierenden Bereich begrenzenden Primer wurden mit der Software LightCycler® Probe Design entworfen und mittels Vector NTI® auf ihre Eignung hin überprüft. Als Polymerasen wurde die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt, die neben der 5`-3`Polymeraseaktivität und der 5`-3`Exonukleaseaktivität noch eine inhärente 3`-5`Exonukleaseaktivität zur Deletion falsch eingefügter Nukleotide besitzt. Die Amplifikation der Ausgangs-DNA fand in PCR-Tubes im Thermocycler nach dem in Tabelle 1 angegebenen Programm statt.

Reaktionsansatz:

Matrize	1-100 ng
Puffer (10x)	2 µl
MgCl ₂	20 mM
dNTP`s	0,2 mM
Primer for	0,1 µM
Primer rev	0,1 µM
Taq/Taq:Pfu [1:5]	1 U
ddH ₂ O	add 20 µl

Thermocyclerprogramm:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min	} 37 Zyklen
Denaturierung	94°C	45 s	
Annealing	50-65°C	45 s	
Elongation	72°C	30 s a 500 Bp	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Tabelle 1: Thermocyclerprogramm für die PCR**5.4.4 Aufreinigung von PCR Produkten**

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels NucleoSpin®Extrakt II Kit (Machery Nagel) nach Angaben des Herstellers.

5.4.5 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen palindromische 4-10 Bp lange Sequenzen innerhalb dsDNA. Durch gerade oder versetzte Spaltung der Phosphodiesterbindungen innerhalb dieser Erkennungssequenzen entstehen je nach Spezifität des Enzyms glatte oder klebrige, überhängende Enden.

Ansatz für den Restriktionsverdau:

DNA	1-10 µg
Puffer (10x)	2 µl
Enzym (10u/µl)	2 µl
<hr/>	
ddH ₂ O	ad 20 µl

Die Inkubation der Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäßen erfolgte für 2 h bei der optimalen Arbeitstemperatur des verwendeten Enzyms im Thermoblock. Zur Kontrolle des erfolgreichen Verdau wurde der Ansatz wie in Kapitel 5.4.7 beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt.

5.4.6 Dephosphorylierung

Wird ein Vektor mit nur einem Restriktionsenzym gespalten, so entstehen kompatible Enden, die leicht zu einer Religation führen. Um dies zu vermeiden, werden Phosphatasen verwendet, die die 5' Phosphatreste entfernen und so die Ligation des Vektors ohne Insert verhindern.

Reaktionsansatz:

DNA	1 µg
Puffer (10x)	5 µl
CIAP (10u/µl)	5 µl
<hr/>	
ddH ₂ O	add 50 µl

Nach dem Zusammenpipettieren wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert und nach weiterer Applikation von 2,5 µl CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) nochmals für 30 min inkubiert. Nachfolgend wurde durch Zugabe von 2,5 µl EDTA und 10 min bei 65°C das Enzym inaktiviert. Zur Fällung wurden 55 µl Isopropanol, 1 µl Glycogen und 5 µl Ammoniumacetat [5mM] hinzupipettiert und der Ansatz für mind. 2 h bei -20°C gelagert. Anschließend wurde 15 min zentrifugiert, 2 mal mit 70 % igem EtOH gewaschen und das Pellet nach Trocknung bei RT in 25 µl ddH₂O aufgenommen.

5.4.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Größenbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mittels einer Agarose-Gelelektrophorese. Das Prinzip hierbei beruht auf den negativ geladenen Phosphatresten der Nukleinsäuren, die in einem elektrischen Feld zur Anode wandern, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit innerhalb einer Trägermatrix antiproportional zur Anzahl der Basenpaare ist. Als feste Trägermatrix dienten Gele aus 0,8-1,2 % Agarose in TAE Puffer [w/v]. Zur Visualisierung der DNA durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bzw. 364 nm wurden die Gele mit Ethidiumbromid [2 µg/µl] versetzt. Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (6x) versehen, welcher Bromphenolblau und Xylenolcyanol zur optischen Detektion der Lauffront enthält. Des Weiteren wurde zur Größenbestimmung der distinkten Banden je nach Größe der nachzuweisenden Nukleinsäuren ein geeigneter Marker mitlaufen gelassen (Fermentas 1 kb-Ladder, 100 Bp-

Ladder). Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Gleichspannung von 80-120 V und einer durchschnittlichen Laufzeit von 45 min. Die Detektion der Banden vollzog sich durch UV-Anregung bei den Wellenlängen 254 nm und 312 nm mittels Intas iX Gel Imager abhängig vom jeweiligen Verwendungszweck.

5.4.8 Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Fragmente, die für eine weitere Klonierung vorgesehen waren wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm aus Agarosegelen mittels Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mittels NucleoSpin® Extract II-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers.

5.4.9 Ligation

Zur kovalenten Verknüpfung der 3`-OH Enden mit dem 5`-Phosphatende von dsDNA-Fragmenten wurden Ligasen verwendet (T4-Ligase, pGEM-Teasy). Dazu wurde das molare Vektor Insert Verhältnis von 1:3–1:10 gewählt.

Ligationsansatz:

Plasmid-DNA	25-50 ng
Insert	75-500 ng
Puffer (10x)	1 µl
Ligase	1 µl
<hr/>	
ddH ₂ O	ad 10 µl

Nach dem Zusammenpipettieren der Ligationsansätze wurden diese bei 16°C ÜN gelagert und direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* (siehe 5.1.3) verwendet.

5.5 RNA-technische Methoden

5.5.1 Quantifizierung von RNA

Die Bestimmung der RNA-Konzentration anhand der Extinktion erfolgte mittels Nano-Drop® UV/Vis-Spektralphotometer wie in Kapitel 5.4.1 erläutert.

5.5.2 RNA-Isolation aus Blattmaterial

50-100 mg gefrorenes, homogenisiertes Pflanzenmaterial wurden in 2 ml Schraubdeckelgefäße überführt und mit einer Keramikkugel versehen. Anschließend wurde 1 ml peqGOLD TriFast™ Reagenz hinzupipettiert und bis zum Auftauen des Blattmaterials gemischt. Nach 2-3 min Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 210 µl Chloroform und eine erneute Durchmischung der Proben für 20 s. Die Proben verblieben 3 min bei RT bevor sich eine 15 min Zentrifugation bei 20800 rcf und 4°C anschloss. Die obere, organische Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol, einer gründlichen Homogenisierung und 5 min Inkubation bei RT durch 15 min Zentrifugation bei 20800 rcf gefällt. Der Überstand wurde mittels Pipette abgenommen und das RNA-Pellet 2 mal mit 70 % EtOH gewaschen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 35 µl DEPC-Wasser gelöst.

5.5.3 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde eine denaturierende RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Alle verwendeten Geräte wurden hierzu vorab ÜN in 3 % igem H₂O₂ inkubiert. 100 ml eines 1 % igen Gels bestanden aus 1 g Agarose, 20 ml 5x RB Puffer und 80 ml DEPC-H₂O. Die Komponenten wurden 2 min in der Microwelle bei 800 Watt erhitzt, der Volumenverlust mittels DEPC-H₂O ausgeglichen und nach dem Abkühlen wurden 1 µl EtBr sowie 1,8 ml 35 % iges Formaldehyd hinzupipettiert und in einen Gelträger gegossen. Je Probe wurden ca. 5 µg Gesamt-RNA mit 10 µl 2x RNA-Ladepuffer versehen und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mittels DEPC-H₂O eingestellt. Die Proben wurden 10 min bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Nach der Auftragung erfolgte die Auftrennung in RB-Laufpuffer bei einer angelegten Spannung von 80 V für ca. 30-60 min.

RB-Puffer (5x) pH 7,0:

MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
DEPC	0,1 %
EDTA	5 mM

RNA-Ladepuffer (2x):

RB-Puffer (5x)	76 µl
Formaldehyd	126 µl
DNA-Ladepuffer (10x)	76 µl
EtBr	5 µl
Formamid	378 µl

5.5.4 DNase-Verdau

Je Probe wurden 1 µg Gesamt-RNA in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, 1 µl DNase Puffer [10x] und 1 µl DNase hinzupipettiert und das Volumen mit DEPC-H₂O auf 10 µl eingestellt. Die Proben wurden 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der DNase durch 1 µl EDTA [25 mM] und 10 minütiges Erhitzen auf 65°C. Die Fällung vollzog sich durch Zugabe von 90 µl DEPC-H₂O, 1 µl Glycogen, 100 µl Isopropanol und 10 µl NH₄Ac, Inkubation bei -20°C ÜN sowie der sich anschließenden 15 minütigen Zentrifugation bei 20800 rcf. Das Waschen der Pellets fand durch Abnahme der Überstände und zweimalige Zugabe von 400 µl EtOH [70 %] sowie 5 minütiges zentrifugieren bei 20800 rcf statt. Die Pellets wurden bis zur Trockne bei RT stehen gelassen und in 7 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

5.5.5 cDNA-Synthese

Zur Umschreibung der muren mRNA in cDNA wurde eine Reverse Transkription anhand der mRNA als Matrize durchgeführt. 6,7 µl der resuspendierten, DNase verdauten RNA (siehe 5.5.4) wurden in PCR-Gefäße überführt und mit 2 µl Reverse Transkriptase-Puffer (5x), 0,5 µl dNTPs [10 mM] und 0,4 µl Poly-dT-Primer [100 µM] versetzt. Zur Denaturierung der Sekundärstrukturen wurden die Proben 2 min bei 70°C erwärmt

und direkt auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 0,4 μl M-MLVxReverser Transkriptase (H-) [200 u/ μl] und 1 h Inkubation bei 42°C die cDNA-Synthese. Zur Denaturierung des DNA/RNA-Hybrids schloss sich eine weitere Inkubation bei 70°C für 15 min an. Die Proben wurden mit tRNA H₂O [1 ng/ μl] im Verhältnis 1:20 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.5.6 qPCR

Die quantitative real-time PCR basiert auf der herkömmlichen Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, erlaubt aber überdies eine Quantifizierung der gewonnenen Amplifikate. Durch Zugabe spezieller Fluoreszenzmarker, welche in dsDNA interkalieren, kann der Reaktionsverlauf nach jedem Zyklus der PCR in „Echtzeit“ nachvollzogen werden. Da die Fluoreszenzzunahme proportional zur Menge der gewonnenen Amplifikate ist, ermöglicht sich so eine Quantifizierung des Zielgens in der exponentiellen Phase der PCR. Zur Quantifizierung existieren unterschiedliche Rechenmodelle. Die Methode der Wahl war die relative Quantifizierung anhand eines zweiten endogenen, ubiquitär und homogen exprimierten Referenzgens der unbekanntes Proben. Der Vorteil der Methode liegt in der Reduzierung der Varianz der Expressionsraten beider Gene, da Fehler in der cDNA Herstellung, sich gleichermaßen auf die Effizienz der Amplifikation des Referenzgens und des Zielgens auswirken.

Die Quantifizierung vollzieht sich anhand der Bestimmung des Ct-Wertes, die Anzahl der Zyklen, die für die Erreichung eines definierten Fluoreszenzsignals nötig sind. Da der Ct-Wert abhängig von der Ausgangsmenge der cDNA ist werden für das Referenzgen und das Zielgen Verdünnungsreihen erstellt. Durch die Auftragung der ermittelten Ct-Werte der Standardreihen gegenüber der jeweiligen Konzentration ergibt sich eine lineare, antiproportionale Beziehung ($x = (\text{Ct}-b)/m$), die zur Bestimmung der Konzentration der unbekanntes Probe durch Interpolation herangezogen wird.

Nach Interpolation der Amplifikate des Referenzgens und des Zielgens der unbekanntes Probe erfolgte die Normierung der Transkripte auf 10.000 Moleküle des Referenzgens.

Zusätzlich fand eine Schmelzkurvenanalyse statt um unspezifische Amplifikate ausschließen zu können. Als Referenzgen wurde der Elongationsfaktor-1 α ausgewählt und Standardreihen des Referenzgens und des Zielgens in den Konzentrationen 10 fg/ μl , 1

fg/ μ l, 0,1 fg/ μ l und 0,01 fg/ μ l hergestellt. Die RNA-Isolierung und cDNA Synthese fanden wie unter Kapitel 5.5.2 und 5.5.5 beschrieben, statt. Für die qPCR wurden die cDNA Proben 1:20 mittels tRNA-H₂O verdünnt. Primermixe und Reaktionsansätze setzten sich wie nachfolgend beschrieben zusammen und wurden mit dem qPCR Programm (Tabelle 2) im Real Time Thermo Cycler™ (BIO-RAD) in 96-Loch-Platten amplifiziert und quantifiziert.

Primermix:

Primer for	12 μ l
[100 μ M]	
Primer rev	12 μ l
[100 μ M]	
H ₂ O (HPLC-Grade)	376 μ l

Reaktionsansatz:

cDNA (1:20)	2 μ l
Primermix	8 μ l
Enzymmix	10 μ l

Thermocyclerprogramm:

Initiale Denaturierung	94°C	15 min	} 44 Zyklen
Denaturierung	94°C	15 s	
Annealing	58-65°C	20 s	
Elongation	72°C	20 s	

Tabelle 2: Thermocyclerprogramm der qPCR

5.6 Protein-technische Methoden

5.6.1 Herstellung des Proteinrohextraktes

Ca. 2 g Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und homogenisiert. Anschließend wurde das Blattmaterial in ein 100 ml Becherglas inkl. 7 ml Extraktionspuffer (KiPi-Puffer, pH 7,5 [50 mM] EtSH [20 mM]) überführt, welches sich in einem Eisbad auf einer Rührplatte befand. Nachträglich wurden weitere 5 ml Extraktionspuffer hinzupipettiert und der Extrakt 15 min lang mittels Rührfisch homogenisiert. Klare Proteinextrakte wurden durch möglichst vollständige Überführung der Proben in 15 ml Falcontubes und 2 maliges Zentrifugieren bei 2700 rcf erlangt. Die Rohextrakte wurden bis zur Bestimmung der Enzymaktivität stets auf Eis gelagert.

5.6.2 Proteingehaltsbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung des Proteingehaltes wurde nach Bradford [Bradford, 1976] durchgeführt. Die Methode basiert auf dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G 250 der mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet, die das Absorptionsspektrum von 465 nm auf 595 nm in der gebundenen Form verschieben. Somit ist die Zunahme der Absorption proportional zur Proteinkonzentration der Probe. Um eine Quantifizierung anhand der Absorption vornehmen zu können, wurde eine BSA-Verdünnungsreihe (1,0 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml) im Probenpuffer angesetzt, aus deren Dreifachbestimmungen eine Kalibriergerade erstellt wurde. Zur Konzentrationsbestimmung wurden in eine 96-Loch-Platte 90 µl ddH₂O vorgelegt und 10 µl Probe sowie 150 µl Bradfordreagenz hinzupipettiert. Die Dreifachbestimmung der Proteinrohextrakte erfolgte in den Verdünnungen 1:2, 1:5 und 1:10. Die erlangten Mittelwerte der Absorption am Photometer (MRX Revelation Microplate Reader) bei einer Wellenlänge von 595 nm wurden zur Interpolation der Proteinkonzentration anhand der Kalibriergeraden herangezogen.

5.6.3 Bestimmung der MJE-Proteinaktivität

Zur Bestimmung der Proteinaktivität wurden diverse Vorversuche zur Etablierung einer geeigneten Messmethode durchgeführt, welche der Dipl.-Arbeit von Hendrik Brandt zu

entnehmen sind. Die hier beschriebene Methode erwies sich am zuverlässigsten zur Bestimmung der MJE-Hydrolyseaktivität.

Die wie unter Kapitel 5.6.1 beschriebenen Rohextrakte wurden nach der Bestimmung der Gesamtproteinmenge mit Extraktionspuffer auf eine Endkonzentration von 250-1000 µg Protein/ml eingestellt. 1980 µl Rohextrakt wurden in 2ml Reaktionsgefäße gegeben, mit 20 µl MeJA [5 mM] versetzt und bei 34°C auf dem Thermoschüttler bei 250 rpm inkubiert. Zur Bestimmung der Hydrolyseaktivität wurden Proben nach 10 min, entnommen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 100 µl Proteinextrakt entnommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt in denen 8 µl HCl [2 N] vorgelegt war. Nach weiterer Zugabe von 700 µl Ethylacetat wurden 25 µl [250 ng] dhJA als interner Standard verabreicht und die Proben 2 min gemischt. Daraufhin folgte eine 10 min Zentrifugation und die Abnahme der oberen Phase, welche in ein neues Reaktionsgefäß transferiert wurde. Die Proben wurden bei RT unter dem Abzug bis zur Trockne eingedampft und in 25 µl Acetonitril und 25µl Ammoniumacetat aufgenommen. Als Negativkontrollen dienten zum einen der pure Extraktionspuffer mit MeJA [5 mM] und zur Kontrolle des endogen vorhandenen JA Gehaltes der Proteinrohextrakt ohne die Applikation von MeJA. Die Quantifizierung des JA-Gehaltes erfolgte *via* UPLC/MS.

5.7 Analytik

5.7.1 Extraktion von Phytohormonen (Verwundungsexperimente)

Für die Extraktion der Phytohormone aus Blattmaterial von *S. lycopersicum* wurden ca. 250 mg gefrorenes, gemörsertes Blattmaterial in 2 ml Schraubdeckelgefäße überführt und mit einer Keramikugel versehen. Zu den gefrorenen Proben wurden 950 µl Ethylacetat sowie 50 µl IS-Mix [50 ng je Standard] hinzupipettiert und das Probenmaterial kurz homogenisiert. Anschließend wurden die Proben in der Kugelmühle bei 21 HZ für 3 min gründlich geschüttelt. Nachfolgend schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 18000 rcf für 20 min und 4°C an. Die Überstände wurden in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt und im Vakuumskonzentrator bei 50°C eingedampft. Simultan wurde 1 ml Ethylacetat in die Schraubdeckelgefäße pipettiert, erneut in der Kugelmühle unter den

angegebenen Bedingungen homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und weiterhin im Vakuumskonzentrator bis zur Trockne eingengt. Die Wiederaufnahme erfolgte durch Zugabe von 25 µl Acetonitril, 1 min Mischen, Zugabe von 25 µl Ammoniumacetat und 1 min Durchmischung. Nach einer 10 min Zentrifugation bei 18000 rcf wurde der klare Überstand in HPLC-Vials überführt. Die Quantifizierung der Phytohormone vollzog sich anhand der Messung mittels UPLC/MS.

5.7.2 Extraktion von JA, JA-Ile, OPDA, 12-OH-JA-Ile (Pathogenexperimente)

Die Extraktion von JA und JA-Ile erfolgte analog zu der unter 5.7.1 beschriebenen Aufarbeitung mit Ausnahme der internen Standards. Zur Quantifizierung wurden 5 µl JA-Nva [10 ng/µl] und 25 µl dhJA [10 ng/µl] hinzugegeben.

5.7.3 Quantifizierung der Analyten mittels UPLC-Q-TOF

Die Quantifizierung der Analyten erfolgte durch chromatographische Auftrennung mittels Ultra Performance Liquid Chromatography™ gekoppelt an die anschließende massenspektrometrische Detektion (UPLC/MS). Die Detektion mittels Quadropol-Fugzeit-Massenspektrometers (Q-TOF) vollzog sich durch die Methode des Multiple Reaction Monitoring (MRM). Die Ionisierung fand dabei durch Elektrospray Ionisation (ESI) statt. Die Konzentrationen der Phytohormone [ng/gFw] wurden durch das Verhältnis der Peakflächen des Analyten zum internen Standard unter Einbeziehung der Responsefaktoren und des Frischgewichtes (Fw) errechnet. Alle Parameter und Messmodi für die Verwundungsexperimente und für die Pathogenexperimente können der Tabelle 3 entnommen werden. Desweiteren enthält Tabelle 4 eine Übersicht der Nachweis und Quantifizierungsgrenzen der jeweiligen Analyten.

Methode:	Pathogenexperimente		Verwundungsexperimente
Probenaufbereitung			
Probenmenge:	250 mg Blattmaterial		250 mg Blattmaterial
Extraktionsmittel:	Ethylacetat inkl. 50 ng JA-Nva/ 250 ng DHJA		Ethylacetat inkl. 50 ng IS
Extraktionsart:	Kugelmühle 21 Hz, 3 min		Kugelmühle 21 Hz, 3 min
Lyophilisation:	Vakuumskonzentrator bei 50°C		Vakuumskonzentrator bei 50°C
Aufnahme in:	50 µl Acetonitril/Ammoniumacetat [1:1]		50 µl Acetonitril/Ammoniumacetat
Trennung mittels UPLC			
Analyt und IS:	JA, →dHJA OPDA → dHJA	JA-Ile, →JA-Nval 12-OH-JA-Ile →JA-Nval	JA → dHJA JA-Ile → JA-Nval OPDA → ¹⁸ O ₂ -OPDA 12-OH-JA-Ile →JA-Nval SA →[D4]SA
Säule:	BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 30 mm	BEH RP18 Shield, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm	BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm
Vorsäule:	BEH C18 2,1mm x 5mm	-	BEH C18 2,1mm x 5mm
Säulentemperatur:	27°C	40°C	40°C
Injektionsvolumen:	8 µl	10 µl	5 µl
Temperatur Autosampler:	20°C	4°C	10°C
Eluent A:	1 mM Ammoniumacetat	1 mM Ammoniumacetat	0,1% Ameisensäure
Eluent B:	Acetonitril	Acetonitril	Acetonitril
Gradient von:	5% zu 100% B in 5 min	5% zu 100% B in 10 min	3% zu 100% B in 7 min
Rinsing:	100% B für 2 min	100% B für 2 min	100% B für 1 min
Equilibrierung:	5% B für 3min	5% B für 3min	3% B für 3 min
Flussrate:	0,3 ml/min	0,25 ml/min	0,25 ml/min
Ionisation durch ESI			
Kapillarspannung:	3,0 kV		
Quellentemperatur:	120°C		
Desolvatisierungstemperatur:	400°C	450°C	400°C
Konusspannung:	JA, dHJA: 19 V JA-Ile, JA-Nval: 24 V OPDA, ¹⁸ O ₂ -OPDA: 22 V SA, [D4]SA: 17 V		
Konusgasfluss (N ₂):	50 l/h		
Desolvatisierungsgasfluss:	800 l/h	850 l/h	800 l/h
Detektion mittels TQ-MS			
MRM-Übergang:	JA: 209→59, dHJA: 211→59 JA-Ile: 322→130, JA-Nval: 308→116 OPDA: 291→165, ¹⁸ O ₂ -OPDA: 295→165 dnOPDA: 291→165, ¹⁸ O ₂ -OPDA: 295→165		
Kollisionsenergie:	JA, dHJA: 17 eV JA-Ile, JA-Nval: 18 eV OPDA, ¹⁸ O ₂ -OPDA: 26 eV dnOPDA, ¹⁸ O ₂ -OPDA: 26 eV		
Kollisionsgasfluss (Ar):	0,3 ml/ min		
Quantifizierung			
Responsefaktoren:	dHJA/ JA: 0,6 JA-Nva/JA-Ile: 1,2 DHJA/OPDA: 1,43 12-OH-JA-Ile →JA-Nva: 1,2		dHJA/ JA: 1,0 JA-Nva/JA-Ile: 1,3 ¹⁸ O ₂ -OPDA/OPDA: 1,4 12-OH-JA-Ile →JA-Nva: 1,3 SA →[D4]SA: 2,4

Tabelle 3: Messmodi und Parameter zur Quantifizierung der Phytohormone mittels UPLC/MS

[ng/g _{FW}]	SA	JA	OPDA	JA-Ile	MeJA (151)	MeJA (133)
Nachweisgrenze	1,7	0,5	0,66	0,11	0,5	1,3
Quantifizierungsgrenze	5,6	1,68	2,19	0,66	1,5	4,2

Tabelle 4: Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen der Phytohormone

5.8 Lumineszenzmessungen

Für die Lumineszenzmessungen der OPR3-Luc-Pflanzen, bzw. Blätter wurde zunächst ein Auflichtbild an der CCD (charged coupled device)-Kamera unter folgenden Einstellungen angefertigt: „low scale 250, high scale 2000, Full chip“. Die Pflanzen wurden mit 1- 10ml einer Luziferinlösung besprüht. Anschließend wurde eine mögliche, konstitutive Aktivierung des OPR3-Promotors überprüft. Die Messung erfolgte unter den Messparametern low scale 280, high scale:1000,Binning:2 für 30 min bei einer durchschnittlichen Expositionszeit von 10 min. Das erste Bild wurde aufgrund der Autofluoreszenz verworfen. Nach Überprüfen der Promotoraktivität wurde der jeweilige Stimulus appliziert und die Messung unter den oben beschriebenen Bedingungen gestartet. Auswertung und Aufnahmen erfolgten mittels der Kamera-Software MetaMorph.

Luziferinlösung:

Luziferin [50 mM]	20 µl
Tritonx100 [5 %]	2 µl
<hr/>	
H ₂ O	add 1ml

6 Ergebnisse

6.1 Generierung transgener Linien

Die Vektoren zur Überexpression und dem PTGS der *MJE* basieren auf der von C. Stuhlfelder veröffentlichten cDNA-Sequenz der *MJE* aus *S. lycopersicum* [Stuhlfelder, 2004]. Zur Überexpression stand bereits das Plasmid pPSI-MJE zur Verfügung (AG Müller, H. Warzecha). MJE-RNAi-Vektoren wurden mit Hilfe von pHannibal Klonierungsvektoren hergestellt. Hierzu wurden die zu „silencenden“ Teilbereiche in sense- und antisense-Orientierung in den Klonierungsvektor eingebracht. Zur richtungsorientierten Klonierung wurden die sense-Fragmente mit XhoI- und KpnI- und die antisense-Fragmente mit XbaI- und HindIII-Schnittstellen versehen. Nach einer Zwischenklonierung wurden Vektor und Insert mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und ligiert. Die RNAi-Kassetten wurden anschließend über NotI verdaut und in den dephosphorylierten, binären Vektor pART27 kloniert (pART-MJE-2-2; pART-MJE#14). Zusätzlich wurde eine unmodifizierte RNAi-Leerkassette (35S:PDK-Intron:OCS terminator) aus pHannibal ausgeschnitten und in pART eingebracht (pART-pHan-Leer). Zu Beginn der Doktorarbeit war die Sequenz einer Jasmonsäuremethyltransferase in *S. lycopersicum* nicht bekannt, daher wurde die von Seo *et al.*, 2001 charakterisierte JMT aus *A. thaliana* zur Überexpression verwendet (pCaJMT#7). Vektoren zur Induktion des endogenen PTGS der *JMT* konnten aufgrund mangelnder *S. lycopersicum* cDNA-Sequenz nicht generiert werden.

Transgene Linie	Vektor	Bemerkung	Transformationen
MJE-OE	pPSIMJE	cDNA <i>MJE</i>	5
MJE-RNAi	pART-MJE-2-2	<i>MJE</i> cDNA Teilsequenz(331-	2
	pART-MJE#14	581)/(453-757)	2
JMT-OE	pCaJMT#7	cDNA <i>JMT</i>	4
(Leervektor)kontrolle (ev)	pART-pHan-leer	RNAi-Leerkassette	2

Tabelle 5: Übersicht der transgenen Linien und der zur Transformation verwendeten Plasmide

Die *A. tumefaciens* vermittelte Transformation wurde wie in Kapitel 5.1.3.2 beschrieben mit den in Tabelle 5 gelisteten Vektoren durchgeführt. Insgesamt konnten über 300 transgene Linien aus 15 Transformationen generiert werden, deren Transgenität mit den unter Kapitel 4.1.10 aufgeführten Primern nachgewiesen wurde. Allerdings konnten aus den 2 unabhängigen Transformationsserien des „hairpin“-RNAi-Konstruktes mit dem Teilbereich 453 Bp-757 Bp keine transgenen Pflanzen generiert werden, da keine Kallusbildung zu verzeichnen war und die Blattstückchen nach zwei Monaten letal waren. Warum die Transformation nicht zur Bildung transgener Pflanzen führte bleibt unklar. Da RNAi- *Knock down* Linien immer eine gewisse Restaktivität besitzen, ist es unwahrscheinlich, dass die Letalität allein durch die Reprimierung der *MJE* induziert wurde. Wahrscheinlicher wäre hier die Ausschaltung einer Genfamilie von Esterasen, da der Sequenzabschnitt sich auch über einen Teilbereich der katalytischen Triade der *MJE* erstreckt, der in α/β -Hydrolasen konserviert ist.

6.2 Funktionelle Charakterisierung transgener Linien auf RNA-Ebene

Nach erfolgreichem Transgennachweis sollten die Veränderungen der relativen Transkriptanzahl der *MJE/JMT* in den Transformationsserien nachgewiesen werden um einen ersten Anhaltspunkt über die Funktionalität der Linien zu gewinnen. Trotz erhöhter *MJE*-Expression in Wurzeln und Blüten [Stuhlfelder *et al.*, 2004] wurde Blattmaterial für die Expressionsstudien verwendet, da es sich zum einen um die F1-Generation der Pflanzen handelte, zum anderen aber auch die weiterführenden Experimente anhand der Analyse des Blattmaterials durchgeführt wurden. Zum Nachweis der Transkriptlevel der transgenen Linien wurde je Probenahme ein intaktes Fiederblatt verwendet um das Verhältnis zwischen Mesophyllgewebe und vaskulärem Gewebe konstant zu halten, da JA-Biosynthesenzyme primär in vaskulärem Gewebe akkumulieren [Stenzel *et al.*, 2003]. Idealerweise wurden n=3 Fiederblätter an unterschiedlichen Tagen entnommen und direkt in 2 ml Schraubdeckelgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Homogenisierung wurden 50 mg Blattmaterial entnommen und zur RNA-Extraktion eingesetzt (siehe 5.5.2). DNase-Verdau und cDNA-Synthese fanden nachfolgend wie unter Kapitel 5.5.4/5.5.5 beschrieben, statt. Für die qPCR-

Genexpressionsstudien wurde die *MJE/JMT*-Genexpression auf 10.000 Moleküle *EF-1α* bezogen, der Vergleich erfolgte anhand des Expressionsprofils von Wildtyp-Pflanzen.

6.2.1 Charakterisierung der MJE-OE-Linien

Wie in Kapitel 5.2.3 erläutert, wurden MJE-OE-Linien durch *A. tumefaciens* vermittelte Transformation des Vektors pPSI-MJE erzeugt. Das Plasmid enthält den 789 Bp langen ORF der *MJE* aus *S. lycopersicum* unter der Kontrolle des konstitutiven 35s-Promotors. Zum Nachweis der endogenen Transkriptlevel des Wildtyps und der transgenen Linien wurden die qPCR-Primer MJE for und MJE rev ($T_m=65^\circ\text{C}$) verwendet, die zur Amplifikation eines 262 Bp langen, internen Fragmentes führen. Um eine Aussage über die Funktionalität der Überexpressions-Transformationsserie treffen zu können wurde die relative *MJE*-Expression mit der basalen Expression des Wt verglichen. Abbildung 11 veranschaulicht die Ergebnisse der Expressionsstudien der Transformationsserien 1.1-1.5 zur Überexpression der *MJE*. Die relative *MJE*-Expression wurde auf 10.000 Moleküle des Referenzgens *EF-1α* bezogen.

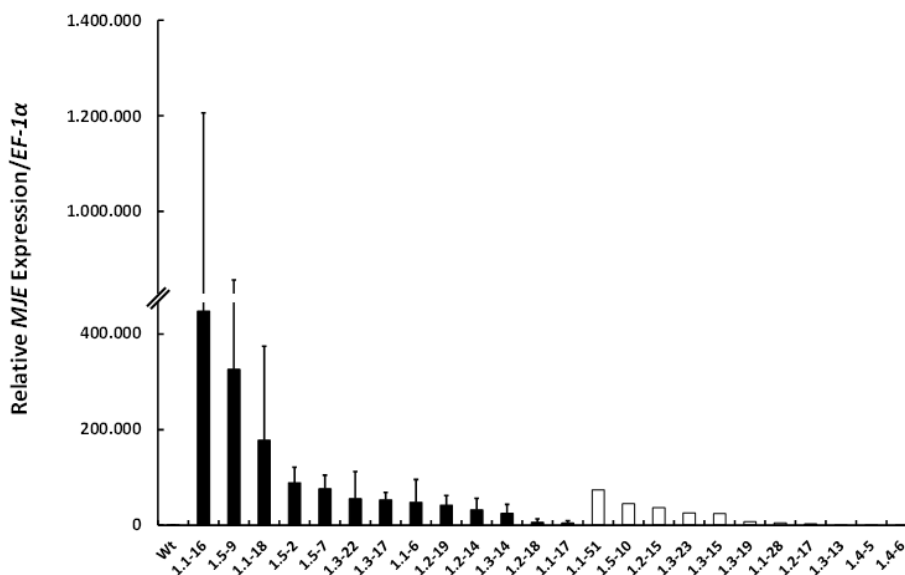


Abbildung 11: Relative MJE-Expression der MJE-OE-Linien

Schwarze Balken: n=3 und weiße Balken n=2 biologische Replikate; Wt=Wildtyp

Die basale Wt-Expression wurde durch Mittelung von 3 biologischen Replikaten in 3 durchgeführten Expressionsstudien errechnet und beträgt 884 Moleküle/*EF-1α*. Die höchsten *MJE*-Transkriptlevel sind in der Linie 1.1-16 mit 448822 Molekülen/*EF-1α* zu

verzeichnen. Im Vergleich zur basalen Wt-Expression belegt dies eine Steigerung von 50772 %. Die geringste Expressionsrate indiziert Linie 1.4-6 mit lediglich 395 *MJE*-Transkripten/*EF-1 α* , was nur 45 % des Wt-Transkriptlevels entspricht. Von den doppelt und dreifach getesteten Linien weisen 21 Linien eine deutlich höhere Expression als der Wt auf, 3 Linien liegen jedoch unterhalb der basalen Wt-Expression, woraufhin diese verworfen wurden. Für weiterführende Experimente wurden die Linien 1.1-16, 1.5-2 und 1.5-9 herangezogen, die eine um 50772 %, 10066 % bzw. eine um 36937 % gesteigerte Expression aufweisen.

6.2.2 Charakterisierung der *MJE*-RNAi-Linien

Die *MJE*-Transformationsserien wurden durch Transformation des Vektors pHan-*MJE*-2-2 generiert, welcher den *MJE*-cDNA-Teilsequenzbereich 331-581 Bp in sense und antisense Orientierung enthält. Transgene Pflanzen mit integrierter RNAi-Kassette bilden nach Transkription dieser Stamm-Schleifen-Strukturen mit dsRNA-Bereichen (sense/antisense-Basenpaarung) aus, die zum endogenen PTGS des Zielgens führen. Um belegen zu können, dass die Transformation in einer erfolgreichen Reduzierung der *MJE*-Transkripte resultiert, wurden die Transformationsserien ebenfalls mittels des Primerpaares *MJE* for/rev ($T_m=65^\circ\text{C}$) anhand von 3 Expressionsstudien analysiert. Abb. 12 zeigt die Zusammenstellung der qPCR-Analysen der *MJE*-RNAi-Linien.

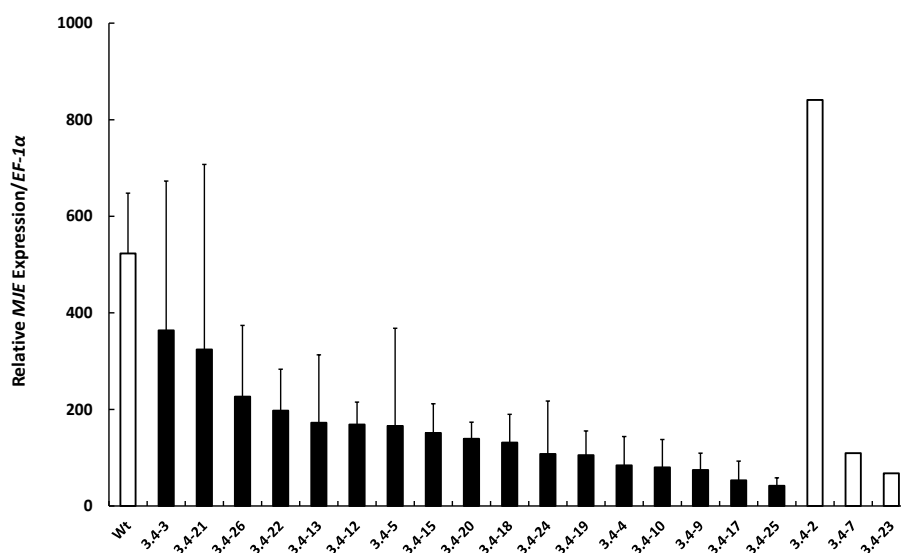


Abbildung 12: Relative *MJE*-Expression der *MJE*-RNAi Linien

Wt= Wildtyp; Balken mit STABW:3 biologische Replikate; weiße Balken ohne STABW: 2 biologische Replikate

19 von 21 Linien zeigen im Vergleich zum Wt reduzierte *MJE*-Transkriptlevel. Die niedrigste Transkriprate weist Linie 3.4-25 mit nur 8 % der *MJE* Wt-Expression auf. Linie 3.4-2 hingegen weist eine mit 841 Molekülen/*EF-1 α* höhere Expression als der Wildtyp mit basalen Spiegeln von durchschnittlich 530 Molekülen/*EF-1 α* auf. Da Linie 3.4-25 keine Samen für die F2-Generation lieferte, wurden für weiterführende Studien die Linien 3.4-4, 3.4-12, 3.4-17 und 3.4-23 ausgewählt, die nur 15 %, 31 %, 10 % und 67,64 % der Transkriptlevel des Wildtyps erreichen.

6.2.3 Charakterisierung der JMT-OE-Linien

Da zu Beginn der durchgeführten Studien keine eindeutig zuweisbare Sequenz einer JMT aus *S. lycopersicum* zur Verfügung stand, bzw. nicht zweifelsfrei durch Homologievergleiche anhand der *A. thaliana*-JMT identifiziert werden konnte, wurde zur Herstellung transgener Linien die JMT-cDNA aus *A. thaliana* verwendet. Dazu wurde das von Seo *et al.*, 2001 beschriebene Konstrukt pCaJMT für die Transformation verwendet. Der funktionelle Nachweis der JMT-Expression mittels qPCR wurde mit dem Primerpaar JMT for/rev ($T_m=65^\circ\text{C}$) durchgeführt (Kapitel 4.1.10). Aus Abbildung 13 ist die Zusammenstellung der 3 durchgeführten Genexpressionsstudien zu entnehmen. Da die eingebrachte *A. thaliana* JMT-cDNA endogen nicht vorhanden war, wurden nur die Transkriptlevel der transgenen Linien untereinander verglichen. Wt-cDNA wurde analysiert um Amplifikate putativ homologer Sequenzen in *S. lycopersicum* ausschließen zu können.

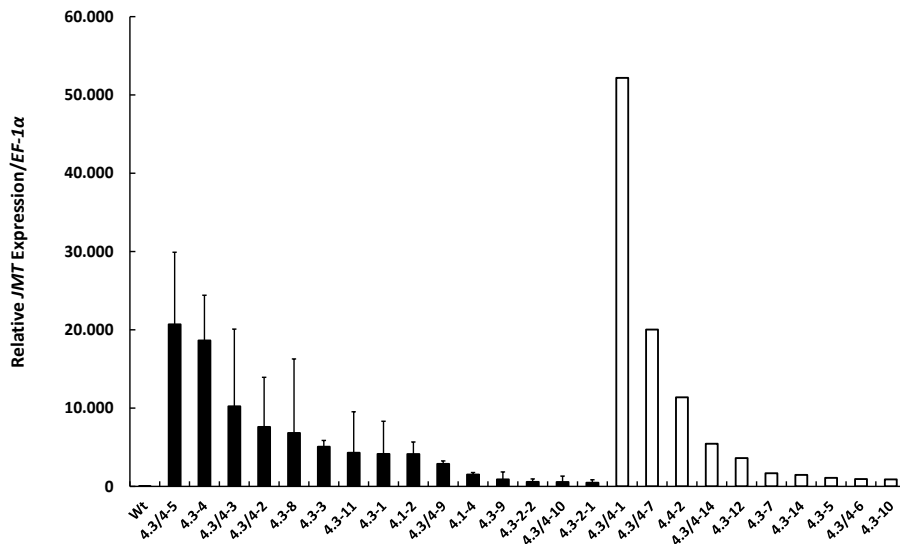


Abbildung 13: Relative JMT-Expression der JMT-OE-Linien

Wt: Wildtyp; Balken mit STABW n=3 biologische Replikate; weiße Balken ohne STABW n=2 biologische Replikate

Die relativen *JMT*-Transkriptmengen der 25 getesteten Linien liegen zwischen 464 Molekülen/*EF-1α* in der Linie 4.3-2-1 und 52173 Molekülen/*EF-1α* in der Linie 4.3/4-1. Mangelhafte Gewächshausbedingungen führten zum Verlust einiger Linien, so dass für weitere Experimente die Linien 4.3-8 mit 6812 Molekülen/*EF-1α* und die Linie 4.3-12 mit 3609 Molekülen/*EF-1α* verwendet wurden.

6.3 Bestimmung der MJE-Hydrolyseaktivität

Die im Vorfeld abgeschlossenen Studien konnten sowohl die Transgenität als auch die Modifizierung der Transkriptlevel der MJE-OE und MJE-RNAi-Linien verifizieren. Um zusätzlich die Modifizierung der MJE-Hydrolyseaktivität in diesen Linien zu belegen, wurden anhand von Proteinrohextrakten der transgenen Pflanzen Proteinassays durchgeführt (siehe 5.6.3). Durch Applikation des Substrates MeJA und analytische Quantifizierung des Produktes JA sollten Erkenntnisse über putative Veränderungen der MJE-Aktivität durch direkten Vergleich mit der Kontrolllinie gewonnen werden. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die gemessene Menge an Produkt (JA) proportional zur umgesetzten Substratmenge (MeJA) ist. Vorversuche, weitere Methoden zur Bestimmung der MJE-Spaltungsaktivität, sowie Reaktionskinetiken können der Diplo-

marbeit von H. Brandt entnommen werden (H. Brandt, 2011). Aus den Kinetiken der Vorversuche ergaben sich 10 min nach Applikation von 5 mM MeJA optimale Bedingungen, die die Proportionalität der Substrat- und Enzymmenge in Abhängigkeit der Zeit gewährleisten. Je nach transgener Linie wurden Proteinkonzentrationen von 250-2000 µg/ml Proteinextrakt eingesetzt. Alle nachfolgenden Experimente fanden unter den ermittelten Bedingungen statt.

6.3.1 MJE-OE-Linien

Für die Proteinassays wurden die MJE-OE-Linien 1.5-2, 1.5-9 und 1.1-16 ausgewählt. Linie 1.5-2 wurde in zwei Experimenten, Linie 1.5-9 in drei und Linie 1.1-16 in einem Experiment untersucht. Abbildung 14 zeigt exemplarisch das Ergebnis der MJE-Hydrolyseaktivität der Linien 1.5-9 und 1.5-2 im Vergleich zur Kontrolllinie. Als Kontrolle wurde der endogene JA-Gehalt der Proteinrohextrakte der jeweiligen Linien ohne Zugabe von MeJA ermittelt und abgezogen.

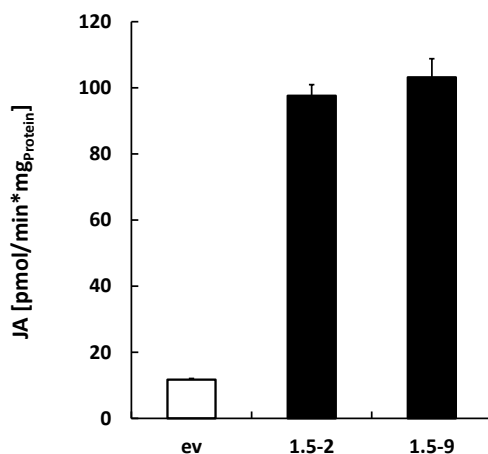


Abbildung 14: MJE Hydrolyseaktivität der MJE-OE-Linien 1.5-2 und 1.5-9.

Dargestellt ist der Mittelwert der katalytischen MJE-Aktivität in Proteinrohextrakten berechnet aus drei technischen Replikaten +STABW. ev = Kontrolllinie

Im Proteinrohextrakt der Kontrolllinie konnte eine gemittelte Hydrolyseaktivität von 11,7 [pmol/min*mg_{Protein}] ermittelt werden. Die MJE-OE-Linien belegen mit 97,6 [pmol/min*mg_{Protein}] (Linie 1.5-2) und 103,15 [pmol/min*mg_{Protein}] 10-fach höhere MJE-Enzymaktivitäten ihrer Proteinrohextrakte.

Tabelle 6 liefert eine Übersicht der drei durchgeführten Studien. Zusätzlich sind dem Anhang die Diagramme der zwei weiteren Experimente zu entnehmen. Die OE-Linie

1.1-16 wurde aufgrund der reduzierten MeJA-Spaltungsaktivität für weitere Studien ausgeschlossen.

Linie	JA [pmol/min*mg _{Protein}]			% Hydrolyseaktivität
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	
ev	11,7	5,8	6,2	100
1.5-2	97,6	-	100,4	1220
1.5-9	103,2	20,3	100,4	945
1.1-16	-	1,7	-	14

Tabelle 6: Übersicht der Proteinassays der MJE-OE-Linien

6.3.2 MJE-RNAi-Linien

Analog zu den MJE-OE-Linien wurden auch die MJE-RNAi-Linien hinsichtlich ihrer MJE-Spaltungsaktivität untersucht. Die Studien erfolgten mit den Linien 3.4-4, 3.4-12, 3.4-23 und 3.4-17. Mögliche Veränderungen wurden anhand des direkten Vergleiches der Rohextrakte mit der Kontrolllinie 5.2-14 analysiert. Stellvertretend für die durchgeführten Experimente zeigt Abbildung 15 die Analyse der Linien 3.4-4 und 3.4-17.

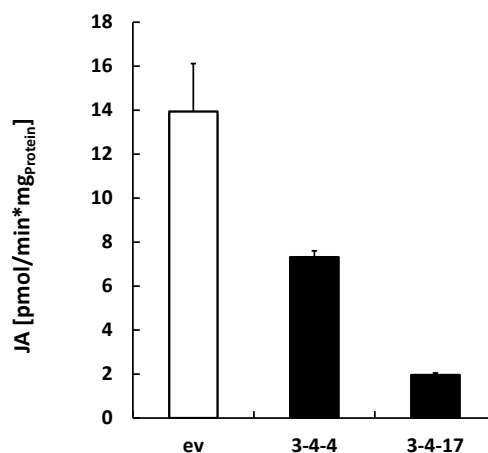


Abbildung 15: Hydrolyseaktivität der MJE-RNAi-Linien 3.4-4 und 3.4-17

Dargestellt ist der Mittelwert der Hydrolyseaktivität errechnet aus drei technischen Replikaten +STABW. ev = Kontrolllinie

Der Proteinrohextrakt der Kontrolllinie weist eine durchschnittliche Enzymaktivität von 13,94 [pmol/min*mg_{Protein}] bezogen auf die Umsetzung von MeJA zu JA auf. Die RNAi-Linie 3.4-4 zeigt im gleichen Zeitintervall nur die Hälfte an Substratumsatz. Auch Linie

3.4-17 belegt einen reduzierten Substratumsatz mit ca. 14 % der Hydrolyseaktivität der Kontrolllinie.

Im Anhang unter Punkt 11.1.2 sind weitere Diagramme der durchgeführten Studien dargestellt. Zusätzlich ist Tabelle 7 eine Übersicht der Experimente zu entnehmen. In den Proteinrohextrakten der Linie 3.4-12 konnten im Vergleich zur Kontrolllinie erhöhte Hydrolyse Aktivitäten detektiert werden, daher wurde die Linie für weitere Versuche ausgeschlossen.

Linie	JA [pmol/min*mg _{Protein}]					% Hydrolyseaktivität	n
	V1	V2	V3	V4	V5		
ev	7,8	1,51	13,94	8,44	1,00	100	3
3.4-4	6,8	0,98	7,32		0,51	64,03	3
3.4-12	-	-	-	10,13	-	119,94	3
3.4-23	3,9	0,83	-	-	-	52,88	3
3.4-17	-	-	1,95	7,28	0,46	48,65	3

Tabelle 7: Übersicht der Proteinassays der MJE-RNAi-Linien

6.4 Habitus der transgenen Linien

Nach eingehender funktioneller Charakterisierung der transgenen Linien wurden diese auch hinsichtlich ihres Habitus untersucht. Hierbei fielen Unterschiede im vegetativen Wachstum der Pflanzen auf (Abb.16). Die MJE-OE-Linien weisen einen zur Vergeilung neigenden Habitus auf. Die Internodien sind tendenziell länger und die Stängel dünner als die der Leervektorkontrolllinien-Linien. Die JMT-OE-Transformationsserien repräsentieren dazu einen gegenläufigen, gedrungenen Phänotyp mit kürzeren Internodien und breiteren Stängeln. MJE-RNAi-Pflanzen zeigen keine Abweichung vom Habitus des Wildtyps oder dem der Kontrolllinien.

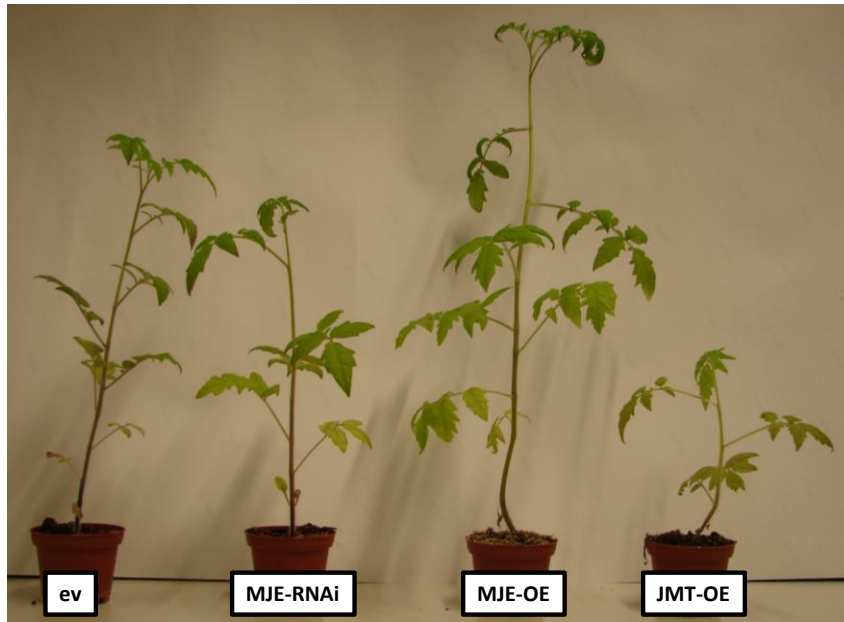


Abbildung 16: Habitus transgener Linien mit Veränderungen in der reversiblen Methylierung der JA
Dargestellt sind die Veränderungen des vegetativen Wachstums anhand repräsentativer Pflanzen (8 Wochen alt). ev = Leervektor(kontrolllinie)

6.5 Untersuchung der Keimungsrate

Die von Seo *et al.*, 2001 generierten *A. thaliana* JMT-OE-Linien wurden von Don Cipollini hinsichtlich ihrer Samenmasse und ihres Keimungsverhaltens untersucht [Cipollini *et al.*, 2007]. Verglichen wurden Leervektorkontrollpflanzen, transformiert mit pBIN19, mit JMT-OE-Linien, welche durch Transformation von *A. thaliana* Col-O mit dem Vektor pCaJMT entstanden sind. Es konnte sowohl eine reduzierte Samenproduktion als auch eine verringerte Keimungsrate der JMT-OE-Linien beobachtet werden. Analog dazu sollten auch die transgenen Tomatenlinien mit Veränderungen der reversiblen Methylierung von JA untersucht werden. Hierzu wurden die MJE-OE-Linien 1.5-2 und 1.5-9, die JMT-OE-Linie 4.3-8 und die MJE-RNAi-Linien 3.4-4, 3.4-17 und 3.4-23 nähergehend charakterisiert. Die Samen der Linien wurden wie in Kapitel 5.2.1 erklärt sterilisiert und auf Kanamycin-haltigem MS2-Medium in RE-Bechern unter aseptischen Bedingungen ausgelegt und 10-14 d unter Langtagbedingungen bei konstant 22°C kultiviert. Anschließend wurde die Anzahl der gekeimten und nicht gekeimten Samen bestimmt und die Keimungsrate in % ermittelt (Abb. 17). Ausgewertet wurde das Keimungsverhalten von n=63 bis n= 1722 Samen.

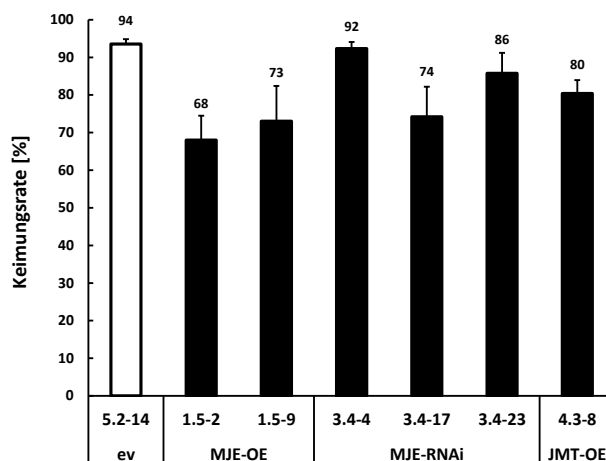


Abbildung 17: Keimungsrate der transgenen Linien

Dargestellt ist die Keimungsrate, berechnet aus dem Mittelwert von 63-1722 ausgezählten Samen (+SEM); ev = Kontrolllinie

Die Kontrolllinie weist mit 93,53 % gekeimten Samen die höchste Keimungsrate auf. Eine vergleichbare Keimungsrate zeigt die MJE-RNAi-Linie 3.4-4 mit 92,34 %. Alle anderen Linien weisen niedrigere Keimungsraten von 85,76 % gekeimten Samen im Falle der RNAi-Linie 3.4-23 bis hin zu 68,02 % im Hinblick auf die JMT-OE-Linie 1.5-2 auf.

6.6 MeJA-Applikationsversuche

Die exogene Applikation von MeJA als auch die Perzeption hoher MeJA Konzentrationen über die Gasphase führen zur Expression diverser Abwehrgene als auch zu Veränderungen der endogenen Jasmonat-Spiegel [Farmer *et al.*, 1992; Miersch & Wasternack 2000]. Bislang ist dabei unklar, ob MeJA direkt als Signal zur Induktion der Abwehrreaktion führt oder zunächst in JA durch die MJE hydrolysiert werden muss. Erste Studien mit *Nicotiana attenuata* MJE-RNAi-Linien liefern Indizien, dass MeJA zunächst in JA umgewandelt werden muss um entsprechende Genexpressionen zu induzieren [Wu *et al.*, 2008]. Analog dazu sollten auch Anhand der generierten *S. lycopersicum* MJE-RNAi Linien Studien durchgeführt werden um zu klären, ob MeJA *per se* als Signal der Geninduktion fungiert oder aber die Hydrolyse des Esters zu JA und die weitere Metabolisierung ausschlaggebend für die beobachtete Genexpression ist.

Appliziert wurde MeJA entweder über die Gas- oder die Flüssigphase. Die Versuche zur MeJA-Exposition MJE-defizienter Pflanzen über die Gasphase wurden aus einem be-

stehenden Protokoll von Sivasankar, 2000 adaptiert. Die Versuchspflanzen wurden in luftdichten Boxen MeJA exponiert, wobei pro Liter Gasphase 10 µl einer 0,1 M MeJA-Lösung appliziert wurden. Aufgrund der verbleibenden Restaktivität der MJE-RNAi Linien wurden die Zeitpunkte 2 h und 4 h aus der von Sivasankar erstellten Kinetik für die Probenahme gewählt um möglichst große Diskrepanzen der Genexpression und der Oxylipinspiegel detektieren zu können.

Parallel dazu wurden Fiederblätter in einer MeJA-Lösung [100 µM; pH=7] mit der abaxialen Seite nach oben flotiert. Auch hier erfolgte die Probenahme nach 2 h und 4 h. Song *et al.*, 2005 konnten nach Flotierung von *Capsicum annuum* Blättern sowohl die Induktion von *PIN1* als auch der *JMT* nachweisen [Song *et al.*, 2005].

Insgesamt wurden 4 Versuche zur Applikation von MeJA über die Gasphase und 4 Versuche zur MeJA-Applikation im Medium durchgeführt. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die von Katharina Maaser zusammengefassten Diagramme der MeJA-Applikationsversuche über die Gasphase (Abb. 19) und über die Flüssigphase (Abb. 18). Detaillierte Versuchsbeschreibungen können ebenfalls der Diplomarbeit von Katharina Maaser entnommen werden. Für beide Applikationstechniken wurden Genexpressionsstudien mittels qPCR durchgeführt, sowie das Oxylipinprofil mittels UPLC/MS analysiert.

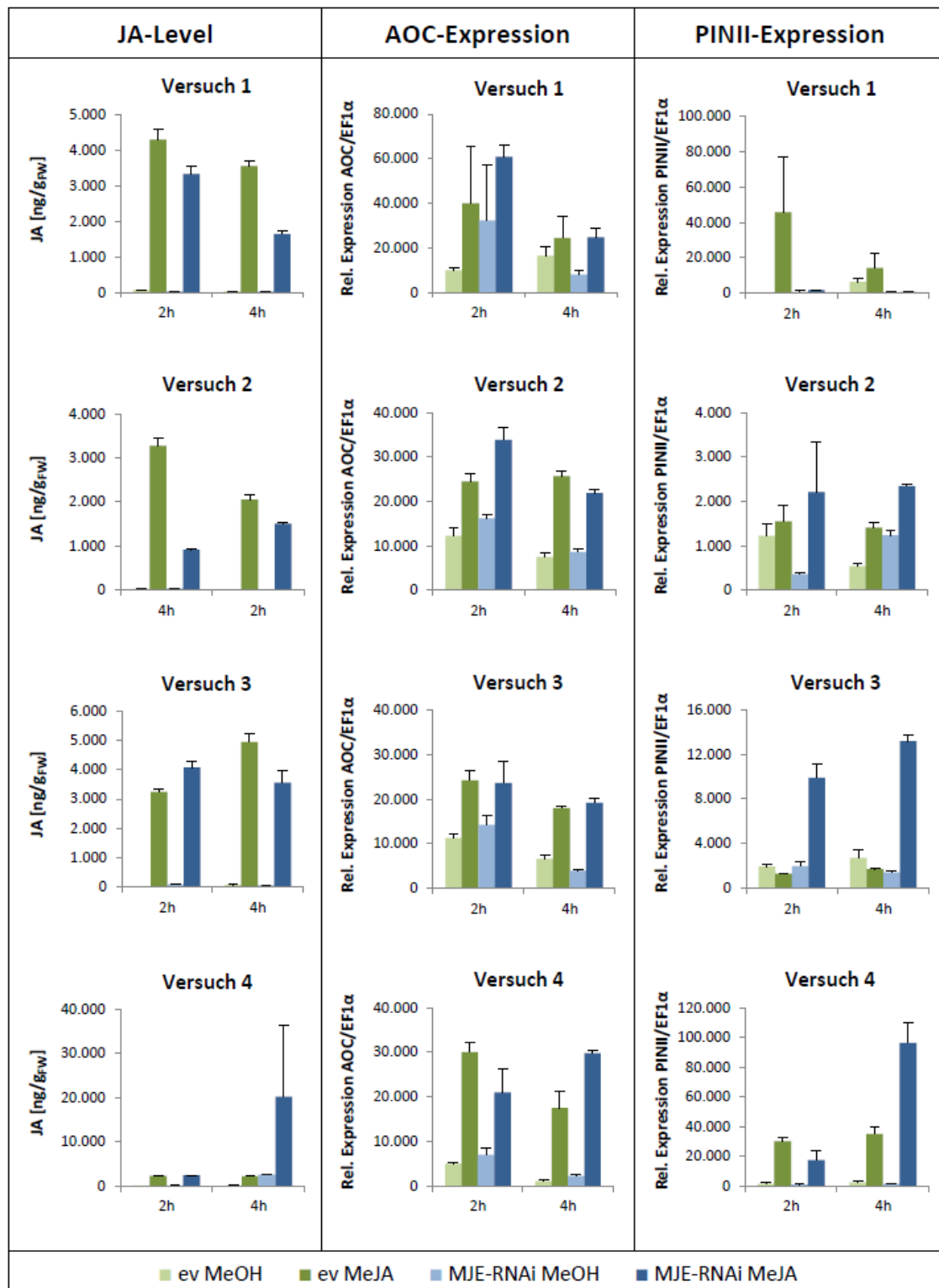


Abbildung 18: Oxylinanalyse und Genexpression nach MeJA-Applikation über die wässrige Phase
 Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 technischen Replikaten + STABW; ev = Kontrolllinie

Wie zu erwarten, ist in der Kontrolllinie nach MeJA-Applikation ein deutlicher Anstieg der JA-Level zu verzeichnen. Allerdings ist kein eindeutiger Trend zwischen der JA-Akkumulation der Kontrolllinie und der MJE-RNAi-Linie zu detektieren. Weiterhin

konnten keine Unterschiede der *AOC*-Genexpression zwischen den Kontrolllinien und den MJE-RNAi-Linien festgestellt werden. Ebenfalls keine Veränderungen zeigt die Analyse der *PINII*-Expression 2 h nach Applikation. Eine leichte Tendenz einer höheren *PINII*-Expression konnte nach 4 h beobachtet werden. 3 von 4 Experimenten weisen hier die Tendenz zu einer verstärkten Expression in den MJE-RNAi-Linien auf.

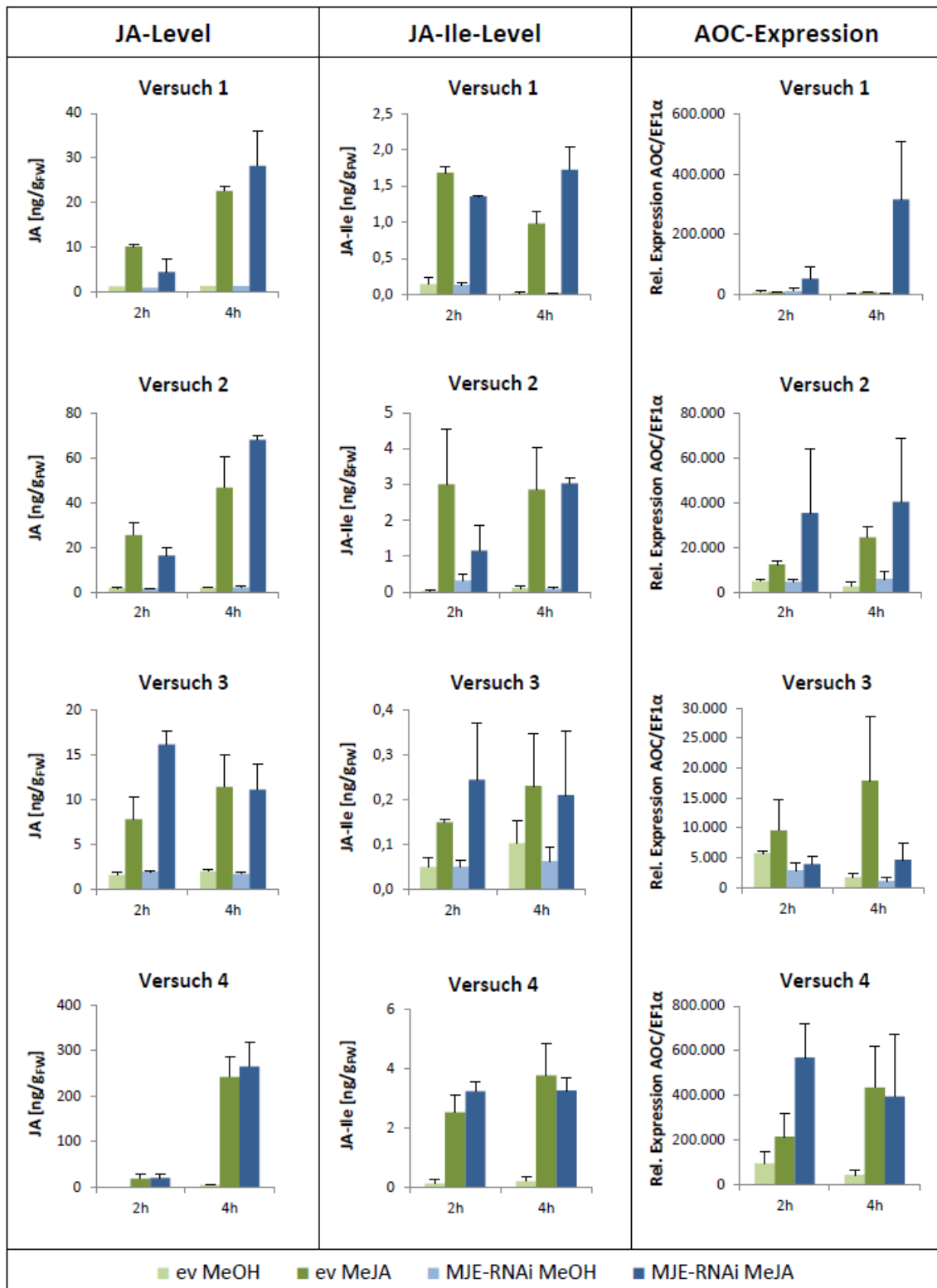


Abbildung 19: Genexpression und Oxylinanalyse nach MeJA-Applikation über die Gasphase
 Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten + STABW; ev = Kontrolllinie

Hinsichtlich der Oxyline JA und JA-Ile konnten bei der MeJA-Applikation über die Gasphase weder nach 2 h noch nach 4 h Unterschiede zwischen den Kontrolllinien und MJE-RNAi-Linien analysiert werden. Auch die AOC-Genexpression der beiden Linien

zeigt 4 h nach Applikation keinerlei Unterschiede. Leichte Tendenzen einer stärkeren Genexpression sind nach 2 h festzustellen. Hier zeigen 3 von 4 Experimente eine tendenziell höhere Transkription der *AOC*.

6.7 Etablierung eines Verwundungs-Testsystems

Um zu untersuchen, ob die JA/MeJA-Umwandlung eine Bedeutung bei der Reaktion auf Stresstimuli hat, die einen Anstieg der endogenen Oxylipinspiegel hervorrufen, wurde nach einem weiteren Testsystem gesucht. Da durch diverse Studien bekannt ist, dass sowohl JA als auch weitere Metabolite wie JA-Ile in Tomate nach Verwundung und/oder Herbivorbefall ansteigen, sollten Verwundungsexperimente durchgeführt werden [Li *et al.*, 2005; Suza *et al.*, 2010]. Zunächst sollten Vorexperimente zur Etablierung des Testsystems und zur Bestimmung der optimalen Zeitpunkte für die Analyse der Genexpression Wund-responsiver Gene, sowie der Akkumulation der Oxylipine JA und JA-Ile durchgeführt werden.

Suza *et al.*, 2010 konnten einen maximalen JA-Ile Anstieg nach 0,5 h und ein später erreichtes Maximum von JA detektieren. Aufgrund dessen wurde Probenmaterial 0,5 h, 1,5 h und 2,5 h nach Verwundung entnommen. Die Verwundung wurde an 6 Wochen alten Pflanzen mittels Pinzette vorgenommen. Von je zwei Blättern wurden alle Fiederblätter dreimal senkrecht zur Mittelrippe verwundet, um sowohl Mesophyllgewebe als auch vaskuläres Gewebe zu verletzen. Das Ergebnis der Oxylipinanalyse ist in Abbildung 20 exemplarisch dargestellt. Zur Kontrolle wurde unverwundetes Blattmaterial analysiert und analog zu den Proben wie unter Kapitel 5.7 beschrieben aufgearbeitet und mittels UPLC/MS gemessen.

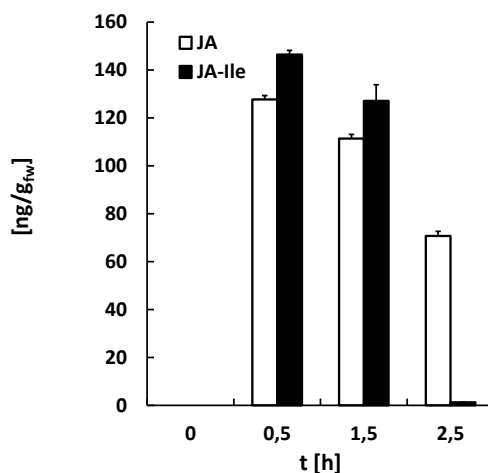


Abbildung 20: Oxylinanalyse nach Verwundung

JA und JA-Ile-Level nach Verwundung in Wt-Pflanzen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 5 biologischen Replikaten + STABW.

Basal ist in dem Cultivar Money Maker weder JA noch JA-Ile zu detektieren. 0,5 h nach Verwundung weist sowohl JA als auch JA-Ile ein Maximum von 127,7 ng/g_{FW} bzw. 146,4 ng/g_{FW} auf. Beide Oxylipine sinken nachfolgend kontinuierlich ab. Die JA-Spiegel zeigen einen moderaten Abfall auf 111,4 ng/g_{FW} nach 1,5 h und 70,7 ng/g_{FW} nach 2,5 h. Die JA-Ile-Spiegel nehmen zunächst ebenfalls langsam auf 127,1 ng/g_{FW} (1,5 h), dann aber rapide 1,3 ng/g_{FW} (2,5 h) ab.

Mit den Vorversuchen der Verwundung konnte analog zu Suza *et al.*, 2010 ein frühes Maximum der analysierten Oxylipine nach 0,5 h belegt werden. Allerdings konnte das 3:1 Verhältnis von JA zu JA-Ile nicht nachgewiesen werden. Neben der Analyse der Oxylipine wurden Genexpressionsstudien mittels qPCR durchgeführt (siehe Kapitel 5.5.6) um die optimalen Zeitpunkte der Expression JA-responsiver Gene festzustellen. Abbildung 21 zeigt die Genexpressionsstudien der JA-Biosynthesegene *AOC*, *PINII*, *OPR3* sowie die Expression der *MJE* nach Verwundung unter den beschriebenen Bedingungen.

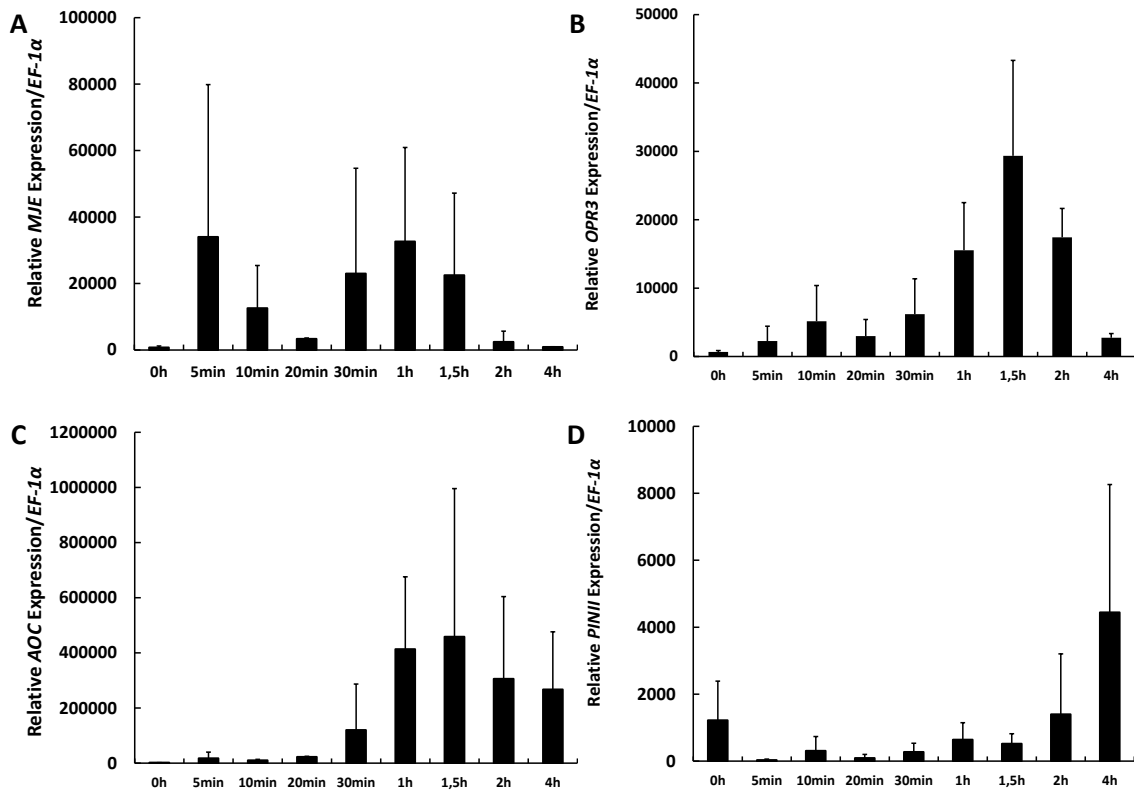


Abbildung 21: Genexpression JA-respovier Gene nach Verwundung

Dargestellt ist die Kinetik der Genexpression von A: *MJE*; B: *OPR3*; C: *AOC* und D: *PINII*. A & C n=2 Replikate +STABW; B &D n=3 Replikate + STABW.

Den Diagrammen ist zu entnehmen, dass ohne den Stimulus der Verwundung die basale Expression der *AOC*, *OPR3* und *MJE* unterhalb der durch Verwundung induzierten Genexpression liegt. Die *PINII*-Expression entspricht in dem vorliegenden Fall nicht dem zu erwartenden basalen Expressionslevel. Die früh-responsiven Gene *AOC* und *OPR3* zeigen 1,5 h nach Verwundung maximale Expressionslevel. Vor dem Zeitpunkt ist in beiden Fällen ein kontinuierlicher Anstieg, sowie nach Erreichen der Maxima ein kontinuierlicher Abfall zu verzeichnen. Die *MJE*-Expressionsanalyse weist 2 Maxima (wobei das erste Maxima nicht reproduzierbar war) auf, nach 5 min und nach 1 h, was ebenfalls die frühe Responsivität des Gens nach Verwundung belegt. *PINII* zeigt als spät responsives Gen einen kontinuierlichen Anstieg, mit einem relativen Maximum zum Zeitpunkt 4 h.

Die gewonnenen Daten belegen die Induktion der analysierten Gene nach Verwundung der Fiederblätter mittels Pinzette. Basierend auf den Erkenntnissen der Oxyliptanalyse und den Genexpressionsstudien wurde für weitere Experimente im Hinter-

grund der transgenen Linien der Zeitpunkt 1,5 h nach Verwundung ausgewählt. Sowohl *AOC* als auch *OPR3* weisen zu diesem Zeitpunkt maximale Transkriptlevel auf, gleichzeitig lassen die Oxylipine JA und JA-Ile noch keinen signifikanten Abfall erkennen.

6.8 Lokale Verwundungsantwort

Um herauszufinden, welche Rolle MeJA in der lokalen Verwundungsreaktion einnimmt und ob es eventuell aufgrund seiner chemischen Eigenschaften als transzelluläres Signal fungiert, sollten die transgenen Linien mit Veränderungen in der reversiblen Methylierung auf ihre Responsivität hin untersucht werden. Analysiert wurden Veränderungen der Genexpression, der Oxylipine und der SA-Akkumulation. Basierend auf dem zuvor etablierten Verwundungssystem (siehe Kapitel 6.7) wurden von je 2 Blättern 6-8 Wochen alter Pflanzen alle Fiederblätter mittels Pinzette verwundet, Probenmaterial 1,5 h nach Stressinduktion geerntet und für die entsprechenden Analysen aufgearbeitet.

6.8.1 Genexpression nach Verwundung

Mittels qPCR sollte die Genexpression in den verwundeten Blättern eruiert werden. Hierzu wurden die wundinduzierten Gene *AOC*, ein früh responsives Gen des JA-Biosyntheseweges, und *PINII*, ein klassisches, spät-induziertes Markergen der Verwundung, ausgewählt. Da die *AOC* im vaskulären Gewebe und *PIN* im Mesophyll lokalisiert ist, könnte anhand des Expressionsprofils beider Gene zusätzlich eine Aussage über eine mögliche gewebspezifische Verteilung des putativen Signals MeJA getroffen werden. Die Aufarbeitung des Probenmaterials und die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Kapitel 5.5.2-5.5.5 beschrieben. Die Genexpression der *AOC/PINII* wurde auf 10.000 Moleküle *EF-1 α* normiert. In den nachfolgenden Studien wurden alle Linien mit Veränderungen der reversiblen Methylierung (MJE-OE/MJE-RNAi, JMT-OE) hinsichtlich der Genexpression nach Verwundung analysiert. Die qPCR-Studien erfolgten unter den in Kapitel 5.5.6 erläuterten Bedingungen.

6.8.1.1 Genexpressionsanalyse der MJE-OE-Linien

Insgesamt wurden 5 Experimente mit den MJE-OE-Linien 1.5-2 und 1.5-9 durchgeführt. In dem in Abbildung 22 dargestellten, repräsentativen Experiment wurde die Genexpression von *AOC* und *PINII* in der Linie 1.5-2 untersucht.

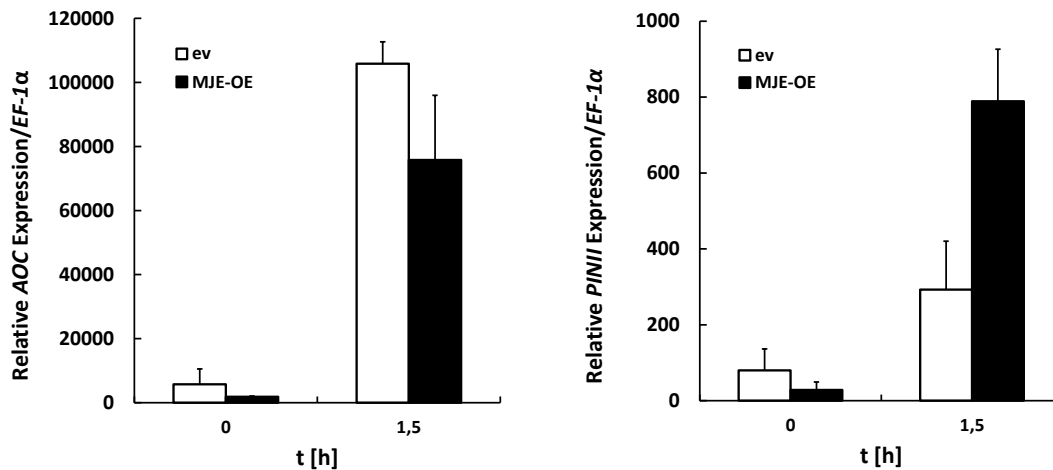


Abbildung 22: Lokale Genexpression von *AOC* und *PINII* der MJE-OE-Linie nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h); ev = Kontrolllinie

Sowohl *AOC* als auch *PINII* werden ohne den Stimulus der Verwundung konstitutiv schwach exprimiert, wobei eine Tendenz für eine verringerte *AOC*-Expression in der MJE-OE-Linie zu erkennen ist. 1,5 h nach Verwundung weist die MJE-OE-Linie eine verringerte *AOC*-Expression auf, da sie mit 75768 Molekülen *AOC/EF-1α* nur 72 % der Transkriptspiegel der Leervektorlinie erreicht. Im Gegensatz dazu ist die *PINII*-Expression mit einer 2,7-fach höheren Transkriptmenge gegenläufig. Generell ist die *PINII*-Expression nach 1,5 h mit 293 Molekülen *PINII/EF-1α* in der Kontrolllinie und 789 Transkripten in der MJE-OE-Linie im Vergleich zur *AOC*-Expression deutlich schwächer.

Von den 5 durchgeführten Experimenten wurden 4 zur Analyse der Genexpression herangezogen. In allen 4 Studien weist die MJE-OE-Linie im Vergleich zur Kontrolllinie 1,5 h nach Verwundung tendenziell verringerte *AOC*-Transkriptlevel und eine höhere *PINII*-Expression auf. Basal zeigt sich, jedoch deutlich schwächer, eine ähnliche Tendenz der Genexpression. Im Anhang sind die Diagramme der weiteren Studien einzusehen (Kapitel 11.2.1.1-11.2.1.2).

6.8.1.2 Genexpressionsanalyse der MJE-RNAi-Linien

Analog den MJE-OE-Linien wurden auch Verwundungsexperimente mit MJE-RNAi-Linien durchgeführt. Insgesamt wurden 4 Genexpressionsstudien mit der Linie 3.4-17 durchgeführt. Die Pflanzen waren am Tag der Verwundung 6-8 Wochen alt. In Abbildung 23 ist ein repräsentatives Beispiel der qPCR-Analyse dargestellt.

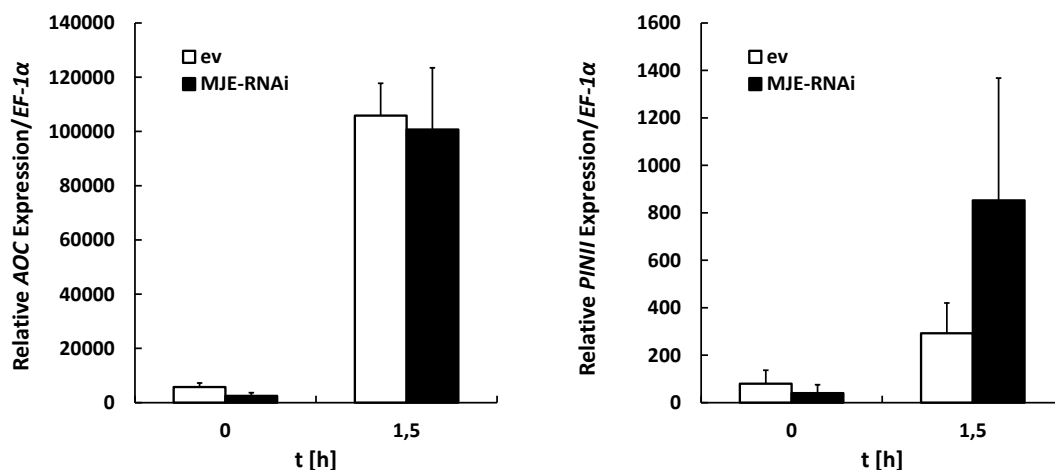


Abbildung 23: Lokale Genexpression von AOC und PINII der MJE-RNAi-Linie nach Verwundung
 Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 unabhängigen Replikaten + STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

Die basale Genexpression des früh responsiven Gens *AOC* ist mit einer Kopienzahl von 5732 Molekülen/*EF-1α* doppelt so hoch wie die der RNAi-Linie. Nach Verwundung steigt die relative Expression in der RNAi-Linie um das 40 fache auf 100.715 Moleküle/*EF-1α* an, unterscheidet sich aber nicht von der Kontrolllinie mit einer relativen Expression von 105.847 Transkripten/*EF-1α*. Auch im Hinblick auf die *PINII*-Expression weist die RNAi-Linie mit 40 Molekülen/*EF-1α* genau die Hälfte der basalen *PINII*-Transkriptlevel der Kontrolllinie auf. 1,5 h nach der Verwundung steigt die Expression der RNAi-Linie mit 853 Transkripten *PINII/EF-1α* auf das 3 fache der Transkriptmenge der Kontrolllinie (293 Molekülen/*EF-1α*) an.

Basal sind leichte Tendenzen einer verringerten *AOC*-Expression festzustellen, da 3 von 4 Experimenten eine verminderte Transkription und ein Experiment eine in etwa vergleichbare Expression zeigen. Nach Verwundung belegen zwei Studien eine der Kontrolllinie entsprechende *AOC*-Genexpression, zwei Experimente zeigen eine verstärkte

Genexpression der RNAi-Linien. Die *PINII*-Expression in den unverwundeten Pflanzen ist in den MJE-RNAi-Linien in zwei Experimenten deutlich stärker, in zwei weiteren sind keine Unterschiede zur Kontrolllinie auszumachen. Nach Verwundung weisen 3 Studien eine höhere *PINII*-Expression auf, eine weitere zeigt nur die Tendenz zu einer erhöhten Expression. Die beschriebenen Studien und Zusammenfassungen der Genexpressionsanalysen sind im Anhang unter Kapitel 11.2.1.1 und 11.2.1.2 einzusehen.

6.8.1.3 Genexpressionsanalyse der JMT-OE-Linien

Auch die JMT-OE-Linien wurden hinsichtlich der Genexpression nach Verwundung mittels qPCR untersucht. Die beiden durchgeführten Studien erfolgten anhand der JMT-OE-Linien 1.5-9. Abbildung 24 zeigt das Ergebnis einer der beiden Studien.

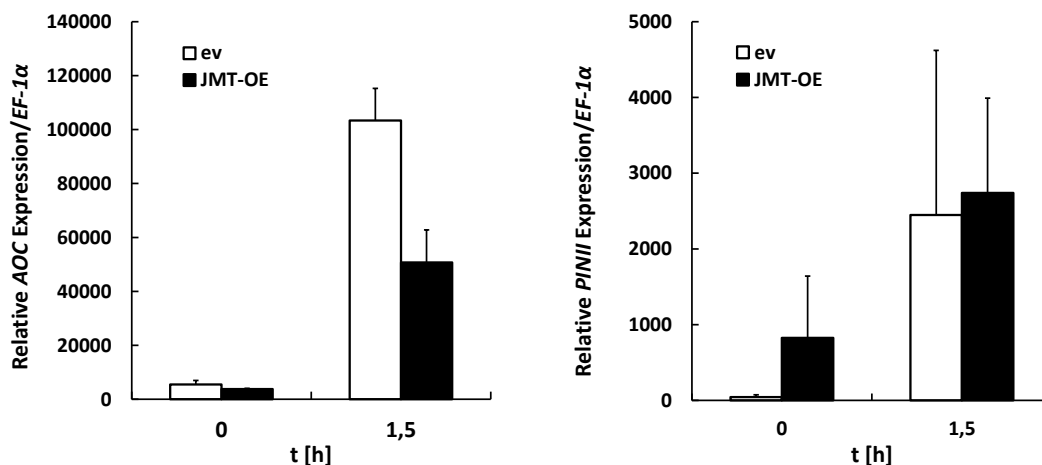


Abbildung 24: Lokale Genexpression von AOC und *PINII* der JMT-OE-Linie nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 unabhängigen Replikaten + STABW. Kontrolle vor Behandlung (0h); ev = Kontrolllinie

In den unverwundeten Pflanzen lassen sich hinsichtlich der *AOC*-Genexpression keine Unterschiede zwischen JMT-OE-Linie und Kontrolllinie ausmachen. Nach Stressinduktion weist die Kontrolllinie mit 103.382 Molekülen/*EF-1α* ein doppelt so hohes Transkriptlevel auf wie die JMT-OE-Linie, die nur eine relative *AOC*-Expression von 50.733 Molekülen/*EF-1α* erreicht. In der vorliegenden Studie zeigt die JMT-OE-Linie mit 826 Transkripten/*EF-1α* eine fast 20-fach höhere basale *PINII*-Expression im Vergleich zur Kontrolllinie (43 Molekülen/*EF-1α*), aber annähernd gleiche Transkriptlevel nach Verwundung.

In den beiden Studien konnten im Hinblick auf die basale *AOC*-Expression keine Unterschiede festgestellt werden. Nach Verwundung zeigen beide Versuche eine verringerte *AOC*-Expression der *JMT*-*OE*-Linien. Ein Experiment weist eine stärkere *PINII*-Expression in den unverwundeten Pflanzen der *JMT*-*OE*-Linien auf, ein weiteres zeigt keine Differenzen. Nach Verwundung ist das basal beobachtete Profil der Experimente mit deutlich höheren Expressionsraten zu beobachten.

6.8.2 Oxylinprofil nach Verwundung

Nach Analyse der Genexpression wundinduzierter Gene sollte zudem untersucht werden, ob sich die putativen Veränderungen des MeJA-Spiegels bzw. des JA-Spiegels der transgenen Linien auf das lokale Oxylinprofil der Jasmonate JA, JA-Ile, 12-OH-JA-Ile und OPDA auswirken. Die Aufarbeitung erfolgte unter den in Kapitel 5.7.1 beschriebenen Bedingungen, die Analyse mittels UPLC/MS/MS unter den dokumentierten Messmodi (siehe Kapitel 5.7.3).

6.8.2.1 Oxylinprofil der *MJE*-*OE*-Linien

Zur Untersuchung der lokalen Verwundungsreaktion in Pflanzen, in denen die *MJE* konstitutiv überexprimiert wird, wurden die Linien 1.5-2 und 1.5.9 verwendet. Insgesamt wurden 5 Verwundungsexperimente hinsichtlich des Oxylinprofils analysiert. In 4 Experimenten wurde die Linie 1.5.2 und einmal die Linie 1.5.9 untersucht. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 25 dargestellt.

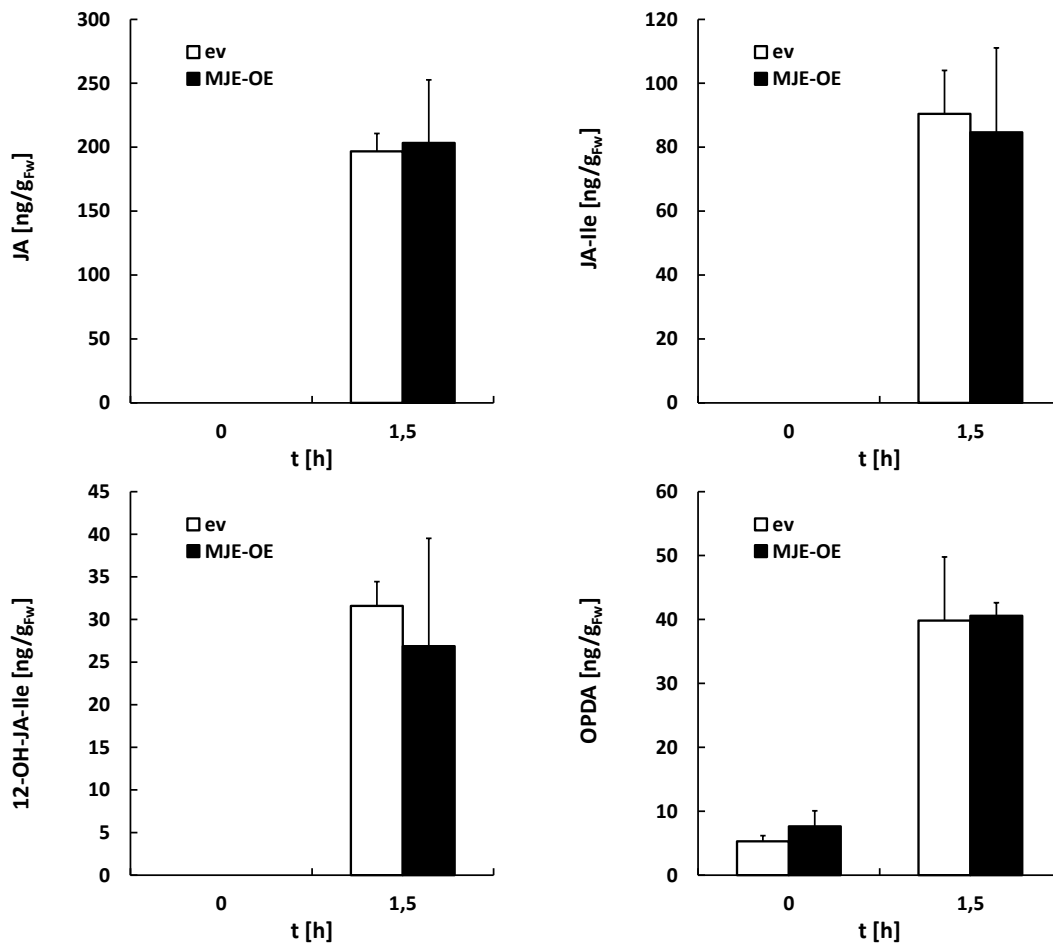


Abbildung 25: Oxylinprofil der MJE-OE-Linie nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 biologischen Replikaten + STABW Kontrolle (0 h); ev = Kontrolllinie

Basal liegen die Spiegel der Oxylipine JA, JA-Ile, 12-OH-JA-Ile sowohl in der Kontrolllinie als auch in der MJE-OE-Linie unterhalb der Nachweisgrenze. 1,5 h nach Verwundung entspricht der JA-Gehalt der Kontrolllinie (196,77 [ng/g_{FW}]) in etwa dem der MJE-OE-Linien, welche 203,33 [ng/g_{FW}] aufweist. In dem vorliegenden Experiment sind die JA-Konzentrationen in beiden Linien annähernd doppelt so hoch wie die des aktiven Metaboliten JA-Ile. Die MJE-OE Linie weist mit 84,68 [ng/g_{FW}] ähnliche Werte wie die Kontrolllinie mit 90,44 [ng/g_{FW}] auf. Auch die Akkumulation von 12-OH-JA-Ile in der MJE-OE-Linie (26,88 [ng/g_{FW}]) gleicht der in der Kontrolllinie (31,59 [ng/g_{FW}]). OPDA ist als einziges Jasmonat ohne Stressstimulus zu detektieren. Die Kontrolllinie hat einen basalen Grundspiegel von 5,31 [ng/g_{FW}], die MJE-OE Linie weist eine Konzentration von 7,31 [ng/g_{FW}] auf. Nach Verwundung steigt der OPDA-Gehalt der Kontrolllinie um das 8 fache auf 39,82 [ng/g_{FW}] an. Die MJE-OE Linie weist 1,5 h nach Stressapplikation eine vergleichbare OPDA-Konzentration von 40,58 [ng/g_{FW}] auf.

In den 5 durchgeführten Studien konnten in der MJE-OE Linie 1,5h nach Verwundung dreimal höhere, einmal niedrigere und einmal äquivalente JA-Spiegel im Vergleich zur Kontrolllinie detektiert werden. Die JA-Ile Akkumulation ist zweimal höher, zweimal gleich hoch und einmal niedriger. 12-OH-JA-Ile und OPDA wurden nur in 4 von 5 Experimenten gemessen. Die 12-OH-JA-Ile-Konzentration entspricht in 2 Studien der der Kontrolllinie, in einem Experiment zeigt die Überexpressionslinie höhere Spiegel und in einem Experiment weist die Kontrolllinie höhere Werte auf. Die Akkumulation der Lipidspezies OPDA zeigt in allen Experimenten keinen deutlichen Unterschied zwischen beiden Linien.

6.8.2.2 Oxylinprofil der MJE-RNAi-Linien

Anhand von 5 Experimenten wurde die MJE-RNAi Linie 3.4-17 hinsichtlich ihrer Oxylinakkumulation nach Verwundung untersucht. Alle Experimente wurden anhand 6-8 Wochen alter Pflanzen durchgeführt. Ein repräsentatives Beispiel der Jasmonat-Akkumulation der MJE-RNAi-Linie ist in Abbildung 26 dargestellt.

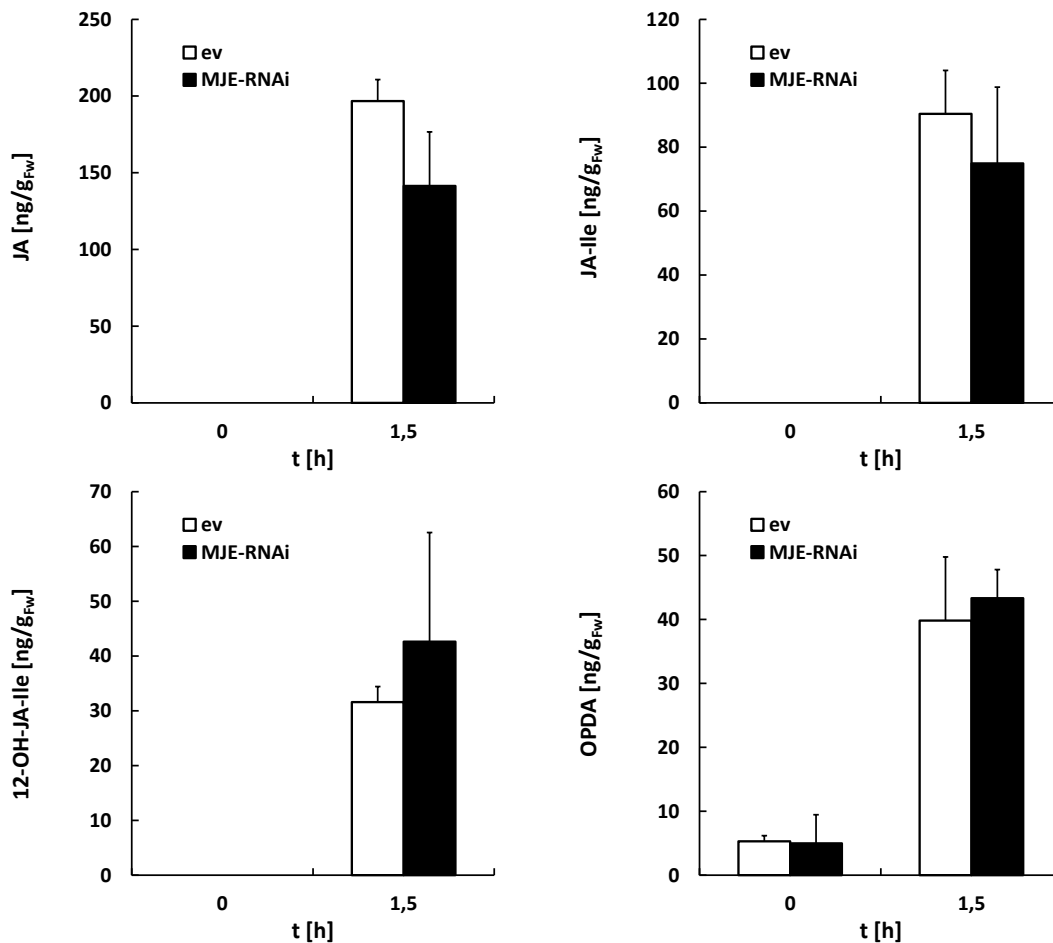


Abbildung 26: Oxylinprofil der MJE-RNAi-Linie nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 biologischen Replikaten + STABW. Kontrolle (0h); ev = Kontrolllinie

Übereinstimmend mit den Analysen der MJE-OE-Linien und der Kontrolllinien, ist auch in der MJE-RNAi-Linie basal weder JA, JA-Ile noch 12-OH-JA-Ile zu detektieren. In der vorliegenden Studie steigt der endogene JA-Gehalt in der Kontrolllinie nach 1,5 h auf 196,77 ng/g_{FW} an. Die MJE-RNAi-Linie akkumuliert zu diesem Zeitpunkt mit 141,38 ng/g_{FW} nur ca. 72 % der JA-Menge der Kontrolllinie. Ein nahezu ähnliches Profil zeigt sich ebenfalls bei der JA-Ile-Bildung, allerdings sind die JA-Ile Spiegel der MJE-RNAi-Linie (74,92 ng/g_{FW}) und der Kontrolllinie (90,44 ng/g_{FW}) gegenüber der JA um die Hälfte reduziert. Im Gegensatz dazu erreicht die Kontrolllinie mit 31,59 ng/g_{FW} nur 75 % des 12-OH-JA-Ile-Level der MJE-RNAi-Linie (42,62 ng/g_{FW}). Der OPDA-Gehalt ist sowohl basal mit Werten von 5,31 ng/g_{FW} und 4,98 ng/g_{FW} als auch nach Verwundung (39,82 ng/g_{FW}/43,33 ng/g_{FW}) in beiden Linien nahezu äquivalent.

In den 5 durchgeführten Experimenten ist die JA- und JA-Ile-Akkumulation der RNAi-Linien 1,5 h nach Verwundung dreimal niedriger, einmal gleich und einmal tendenziell stärker ausgeprägt. Im Falle des Metaboliten 12-OH-JA-Ile ist sie zweimal höher, zweimal äquivalent und einmal verringert im Vergleich zur Kontrolllinie. Die basalen OPDA-Level sind in 2 Experimenten in der RNAi-Linie deutlich höher als in der Kontrolllinie, die 3 weiteren Studien zeigen keine gravierenden Unterschiede. Nach Verwundung bilden die RNAi-Linie in 3 Experimenten mehr OPDA, in 2 weiteren weichen die Level nicht von denen der Kontrolllinie ab.

6.8.2.3 Oxylinprofil der JMT-OE-Linien

Zusätzlich zu den Studien der MJE-OE-/RNAi-Linien sollte auch die Akkumulation der Oxyline in den JMT-OE-Linien eruiert werden. Es wurden 2 Experimente anhand der Linie 4.3-8 durchgeführt, eines davon zeigt Abbildung 27.

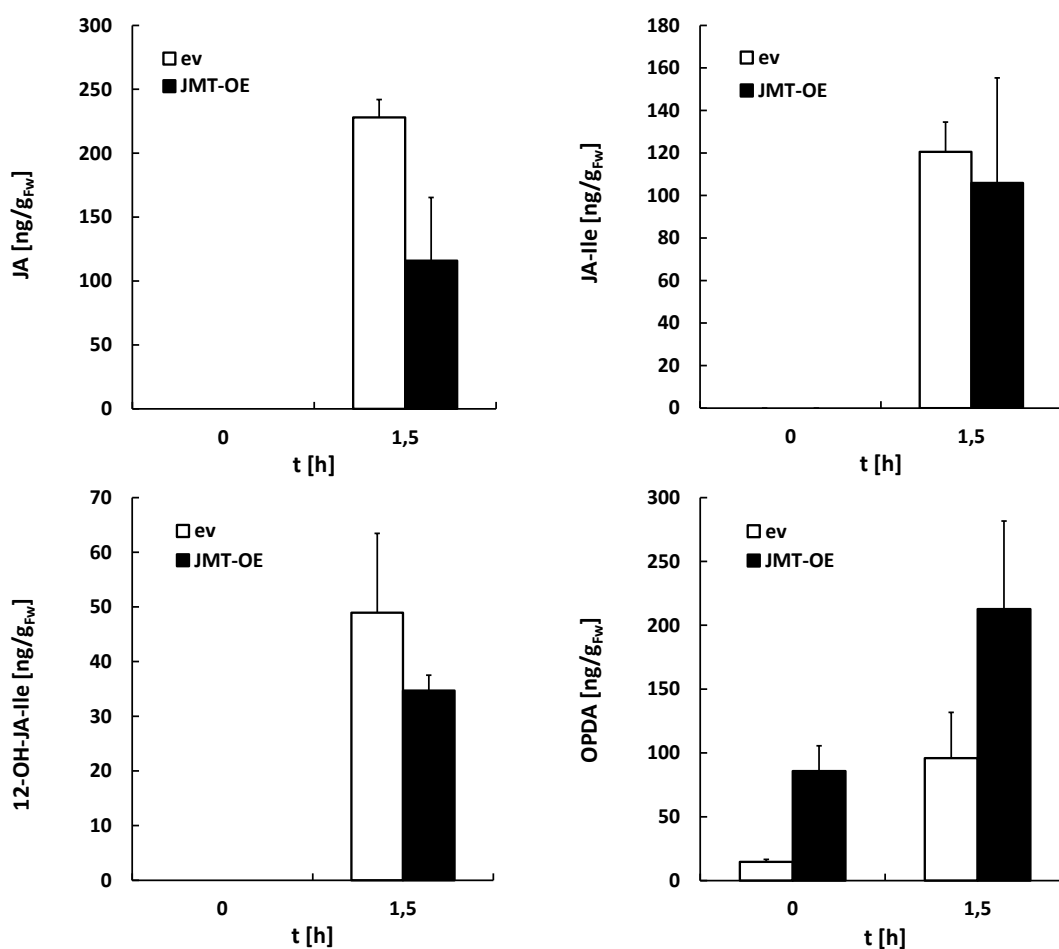


Abbildung 27: Oxylinprofil der JMT-OE-Linie nach Verwundung

Abgebildet ist das lokale Oxylinprofil der Jasmonate 1,5 h nach Verwundung, Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 biologischen Replikaten + STABW. Kontrolle (0h); ev = Kontrolllinie

Auch in den JMT-OE-Linien sind die basalen Oxylipinspiegel von JA, JA-Ile und 12-OH-JA-Ile wie in den zuvor untersuchten MJE-OE und MJE-RNAi-Linien unterhalb der Detektionsgrenze. Nach Verwundung bildet die Kontrolllinie mit 228,03 ng/g_{FW} etwa doppelt so viel JA wie die JMT-OE-Linien, die nur 115,97 ng/g_{FW} aufweist. Mit 120,54 ng/g_{FW} und 105,91 ng/g_{FW} weichen die JA-Ile-Spiegel der Kontrolllinie und der JMT-OE-Linien 1,5 h nach Induktion nicht voneinander ab. Etwas deutlichere Unterschiede sind im Falle des JA-Metaboliten 12-OH-JA-Ile zu detektieren. Die JMT-OE-Linie akkumuliert mit 34,69 ng/g_{FW} nur ca. 70 % der 12-OH-JA-Ile Menge der Kontrolllinie (48,95 ng/g_{FW}). Bei Betrachtung der OPDA-Level beider Linien ist sowohl basal, als auch nach Verwundung eine verstärkte OPDA-Bildung in der JMT-OE-Linie zu detektieren. Basal weist die JMT-OE-Linie (85,82 ng/g_{FW}) 6 fach höheres endogenes JA-Level im Vergleich zur Kontrolllinie (14,74 ng/g_{FW}) auf. Nach Stressinduktion steigt auch in der Kontrolllinie der OPDA-Gehalt auf 95,97 ng/g_{FW}, und erreicht ca. die Hälfte des OPDA-Levels der JMT-OE-Linien (212,68 ng/g_{FW}).

In einem weiteren Verwundungsexperiment erfolgte ebenfalls die Quantifizierung von JA und JA-Ile. Das zuvor beschriebene Oxylipinprofil konnte auch in dieser Studie bestätigt werden, da es ebenfalls keine deutlichen Unterschiede bzgl. der JA-Ile Bildung, aber deutlichere Veränderungen hinsichtlich der JA-Akkumulation gibt. Beide Experimente illustrieren verringerte JA-Level der JMT-OE-Linien 1,5 h nach Verwundung.

6.8.3 SA-Akkumulation nach Verwundung

Um eine Interaktion des Verwundungs-induzierten JA-Biosyntheseweges mit anderen Signalwegen zu überprüfen, wurde zusätzlich die SA-Akkumulation nach Verwundung analysiert. Analog den Oxylipinen erfolgte die Aufarbeitung und Messung mittels UPLC/MS. Es wurden ebenfalls alle transgenen Linien mit Veränderungen in der reversiblen Methylierung untersucht.

6.8.3.1 SA-Akkumulation in MJE-OE-Linien

Die lokale Salicylsäurebildung nach Verwundung wurde in den MJE-OE-Linien anhand von 5 Experimenten untersucht. Viermal wurde die Linie 1.5-2 und einmal die Linie 1.5-

9 verwendet. Abbildung 28 zeigt ein repräsentatives Beispiel der SA-Spiegel vor und 1,5h nach der Verwundung mittels Pinzette.

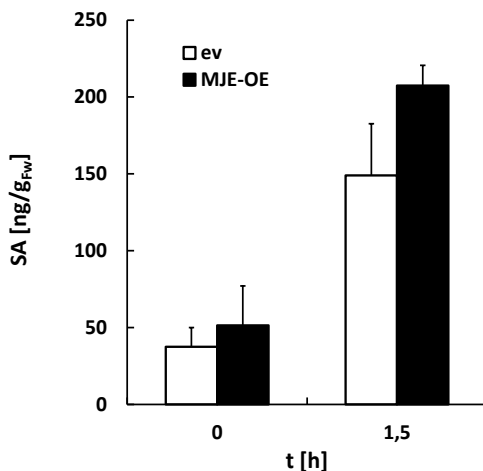


Abbildung 28: SA-Akkumulation der MJE-OE-Linie nach Verwundung

Dargestellt ist der Mittelwert aus 5 biologischen Replikaten + STABW. Kontrolle (0h); ev = Kontrolllinie

Unverwundet weichen die SA-Spiegel der Kontrolllinie (37,48 ng/g_{FW}) und der MJE-OE-Linie (51,53 [ng/g_{FW}]) nicht voneinander ab. Induziert durch die Verwundung akkumuliert die MJE-OE-Linie tendenziell mehr SA. In der Kontrolllinie sind 148,97 [ng/g_{FW}] und in der MJE-OE-Linie sind 207,46 [ng/g_{FW}] zu detektieren.

Insgesamt belegen (Anhang 11.2.1.7) 4 von 5 Studien eine höhere SA-Bildung in der MJE-OE-Linien nach Verwundung, ein Experiment zeigt eine gegenläufige Akkumulation. Auch basal sind in 3 von 4 Experimenten höhere SA-Konzentrationen in den MJE-OE-Linien festzustellen.

6.8.3.2 SA-Akkumulation in MJE-RNAi-Linien

Insgesamt 5 Experimente wurden zur Eruierung möglicher Veränderungen der SA-Akkumulation nach Verwundung in Linien mit reduzierter MJE-Aktivität durchgeführt. In allen Versuchen wurde die Linie 3.4-17 verwendet. Eine der Studien ist in Abbildung 29 stellvertretend dargestellt.

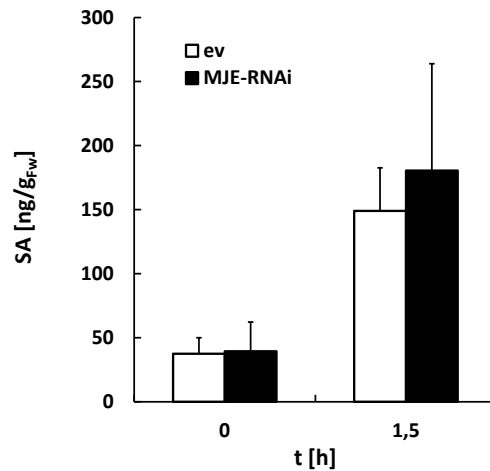


Abbildung 29: SA-Akkumulation nach Verwundung der MJE-RNAi-Linie

Abgebildet ist der Mittelwert aus n=5 biologischen Replikaten (+STABW). Kontrolle (0h); ev = Kontrolllinie

Ohne Stimulusapplikation unterscheidet sich die SA-Akkumulation der Kontrolllinie (37,48 ng/g_{Fw}) nicht von der der MJE-RNAi-Linie (39,41 ng/g_{Fw}). Auch nach Stressinduktion sind keine deutlichen Abweichungen der Kontrolllinie (148,97 ng/g_{Fw}) und der MJE-RNAi-Linie (180,44 ng/g_{Fw}) zu verzeichnen.

Die Ergebnisse der MJE-RNAi-Studien zur SA-Akkumulation nach Verwundung sind dem Anhang unter 11.2.2.7 angefügt. Insgesamt wurden in den 5 Versuchen zweimal niedrigere SA-Level beobachtet. Weitere 3 Studien lassen Tendenzen eines erhöhten SA-Gehaltes nach Verwundung in der MJE-RNAi-Linie erahnen.

6.8.3.3 SA-Akkumulation in JMT-OE-Linien

Auch in den JMT-OE-Linien sollte die SA-Bildung nach Verwundung untersucht werden. Allerdings wurde aufgrund anfangs nicht vorhandener interner Standards zur Quantifizierung der SA nur ein Experiment durchgeführt, dessen Ergebnis nachfolgend dargestellt ist (Abb. 30).

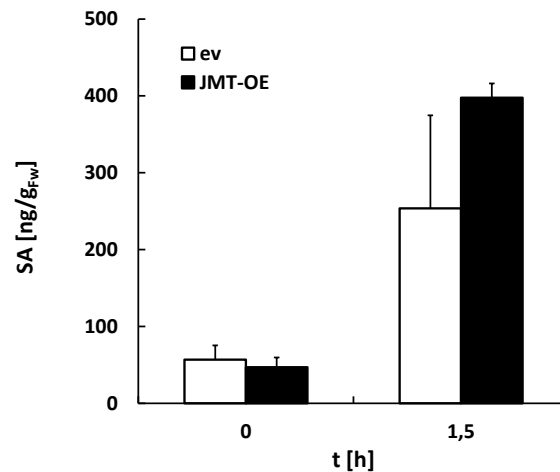


Abbildung 30: SA-Akkumulation der JMT-OE-Linie nach Verwundung

Abgebildet ist der Mittelwert aus n=5 biologischen Replikaten (+STABW). Kontrolle (0h); ev = Kontrolllinie

Ohne den Stimulus der Verwundung sind die basalen SA-Level mit 56,78 ng/g_{Fw} und 47,05 ng/g_{Fw} vergleichbar. Nach Verwundung akkumuliert die JMT-OE-Linie 157,2 % des SA-Gehaltes der Kontrolllinie. Die Werte weichen mit 253,66 ng/g_{Fw} und 397,68 ng/g_{Fw} deutlich voneinander ab.

6.9 Distale Verwundungsreaktion

Neben der lokalen Verwundungsreaktion weisen Pflanzen auch eine systemische Reaktion auf den lokalen Stimulus hin auf. Obwohl die lokale Verwundungsreaktion in Tomate aufgeklärt wurde, ist wenig über die distale Reaktion und das systemische Signal zur Induktion von Abwehrgenen wie z.B. *PIN1* bekannt. Es konnte aber belegt werden, dass eine lokale *de novo* JA-Biosynthese und die distale Perzeption eines Jasmonat-Signals essentiell sind [Li *et al.*, 2002]. Zudem spricht die Geschwindigkeit der distalen Genexpression (1-5 cm/h) für einen aktiven Transport des lokal generierten Signals [Koo & Howe, 2009; Ryan, 2000]. Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte in den nachfolgenden Studien eruiert werden, ob die MJE in die Perzeption des lokal generierten Signals involviert ist und MeJA somit als systemisches Signal fungieren könnte. Um dies zu analysieren wurden Pfropfungsexperimente durchgeführt. Als Unterlage zur Induktion eines JA-Signals dienen die Leervektorkontrollpflanzen und als Edelreis

die MJE-RNAi-Linien. Die Pfropfungen nach Kopulation und die weitere Kultivierung der Pflanzen erfolgten wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben. Nach Wundverschluss wurden Verwundungsexperimente durchgeführt. Der untere Teil der Pfropfbastarde wurde mittels Pinzette verwundet und distales, unverwundetes Probenmaterial der aufgefropften MJE-RNAi-Linien bzw. Kontrolllinien nach 1,5 h zur Genexpressionsanalyse entnommen. Um eine Induktion Verwundungs-assoziiierter Gene durch das Pfropfen ausschließen zu können, wurde zudem die basale Genexpression untersucht. Für die Genexpressionsstudien wurden *AOC* und *PINII* ausgewählt. Abbildung 31 ist ein repräsentatives Beispiel der qPCR-Studien zur Analyse der distalen Genexpression zu entnehmen.

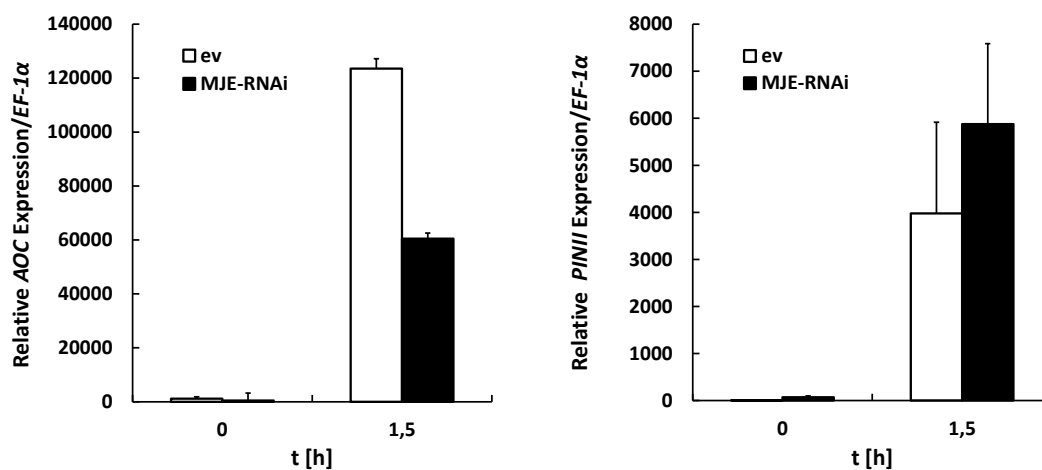


Abbildung 31: Genexpression in distalen Bereichen der Pfropfbastarde nach Verwundung
Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 Replikaten (+STABW); ev = Kontrolllinie

Sowohl die *PINII*- als auch die *AOC*-Expression entspricht den zu erwartenden basalen Expressionsraten unverwundeter Pflanzen. Darüber hinaus zeigen sich keine gravierenden Unterschiede der Genexpression der beiden Pfropfkombinationen. Unverwundet exprimiert die mit sich selbst rekombinierte Kontrolllinie 8 Moleküle *PINII/EF-1α* und 1.148 Moleküle *AOC/EF-1α*. Die Pfropfkombination aus MJE-RNAi-Linie und Kontrolllinie weist 71 Transkripte *PINII/EF-1α* und 431 *AOC* Transkripte/ *EF-1α* ohne Stimulus auf. Nach Verwundung steigt die Expression der *AOC* in der Kontrolle auf 123.523 Moleküle/*EF-1α*, die distale Genexpression der MJE-RNAi-Linie aber nur auf die Hälfte der Transkriptmenge (60.453 Moleküle/*EF-1α*). Die *PINII*-Transkription nach Verwundung ist mit einer relativen Expression von 3.979 Moleküle/*EF-1α* in der Kontrolle und

5.877 Moleküle/*EF-1α* in der MJE-RNAi/Kontrolllinien-Kombination gegenläufig, da die distale Expression im aufgepfropften MJE-RNAi-Oberteil 1,5 fach stärker ausgeprägt ist.

6 Studien dienten der Eruiierung der Involvierung der MJE in der distalen Perzeption eines lokal generierten Verwundungssignals. In 4 der 6 Studien wurde eine höhere *PINII*-Expression der MJE-RNAi-Pfropfbastarde festgestellt, zweimal fiel sie schwächer aus. Die *AOC* Genexpression war in 3 Experimenten niedriger, in zweien äquivalent und in einem Experiment verstärkt. Die Ergebnisse aller Studien sind im Anhang unter Kapitel 11.3 zusammengestellt.

6.10 Einfluss der reversiblen Methylierung auf die Pathogenresistenz gegenüber *S. sclerotiorum*

Die Überexpression der *JMT* in *Arabidopsis* führte zu einer 3 fachen Erhöhung der MeJA-Level bei konstantem JA-Gehalt, sowie einer konstitutiven Expression von Abwehrgenen. Pathogenexperimente dieser Linien mit dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* belegen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Wildtyp [Seo *et al.*, 2001]. Da weiterhin eine Involvierung des JA-Biosyntheseweges gegenüber nekrotrophen Pilzen in *S. lycopersicum* nachgewiesen wurde, wurden Experimente mit den transgenen Linien zur Überexpression der *JMT* und *MJE* als auch mit den MJE-RNAi-Linien durchgeführt. Hierzu wurde der nekrotrophe Pilz *S. sclerotiorum* verwendet.

Untersucht wurden zunächst phänotypische Unterschiede der Linien im Vergleich zur Kontrolllinie anhand der Ermittlung des Läsionsdurchmessers. Um das Pathogenwachstum innerhalb der Fiederblätter quantitativ zu erfassen, wurden qPCR-Studien anhand des fungalen Referenzgens *Aktin* herangezogen. Die Expression des fungalen Referenzgens wurde mit der Gesamt Tomaten-RNA des Blattes, gemessen an der Expression des Referenzgens *EF-1α*, ins Verhältniss gesetzt.

Die Resistenz gegenüber Pathogenen wird durch die Aktivierung verschiedener Signalwege, die agonistisch oder antagonistisch interagieren, abhängig vom jeweiligen Pathogen induziert. Bei Befall mit nekrotrophen Pathogenen ist eine Induktion des JA-Biosyntheseweges und des Ethylenweges sowie eine Hemmung des SA-Weges zu verzeichnen. Um mögliche Veränderungen der Transkription spezifischer Biosyntheseenzyme oder Markergene der Signalwege in den transgenen Linien zu analysieren, wurden Genexpressionsstudien durchgeführt. Untersucht wurden *AOC* als Marker für den JA-Biosyntheseweg, *NPR1* als Marker des SA-Signalweges, *ERF3* als Transkriptionsfaktor des Ethylenweges sowie *PINII* als JA- und Pathogen-induzierter Marker.

Die Aktivierung der Biosynthesewege und Expression ihrer Biosyntheseenzyme kann zur Akkumulation unterschiedlicher Metabolite führen. So wurde nach *B. cinerea* Inokulation von *S. lycopersicum* cv Moneymaker ein Anstieg der JA-Konzentration detektiert [El Oirdi *et al.*, 2011]. Daher sollten putative Veränderungen der Oxylipine JA, JA-Ile, 12-OH-JA-Ile und OPDA in den transgenen Linien nach *S. sclerotiorum* Exposition eingehend untersucht werden.

Die Anzucht des nekrotrophen Pilzes *S. sclerotiorum* und die Durchführung der Pathogenexperimente wurden wie in Kapitel 5.3 beschrieben, anhand von 6-8 Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Analog zu den behandelten Pflanzen wurde Minimalmedium ohne Myzel mittels Korkbohrer ausgestanzt und auf jeweils fünf Fiederblätter zweier Blätter der Kontrolllinien platziert. Alle Pflanzen wurden in luftdicht verschlossenen Boxen kultiviert, die Probenahme erfolgte 24 h und 40-48 h nach Inokulation mit Agarstückchen mit und ohne *S. sclerotiorum* Myzel. Genexpressionsanalysen und Oxylipinprofil erfolgen anhand desselben Probenmaterials.

6.10.1 MJE-OE-Linien

6.10.1.1 Läsionen

Im Hintergrund der MJE-OE-Linien wurden insgesamt 5 Pathogenexperimente mit den Linien 1.5-2 und 1.5-9 durchgeführt. Die Läsionen wurden nach 24 h und 40 h, bzw. 48 h mittels Schieblehre vermessen und der Läsionsdurchmesser ermittelt. Abbildung 32 zeigt exemplarisch die Läsionsdurchmesser sowie die phänotypischen Unterschiede eines Experimentes.

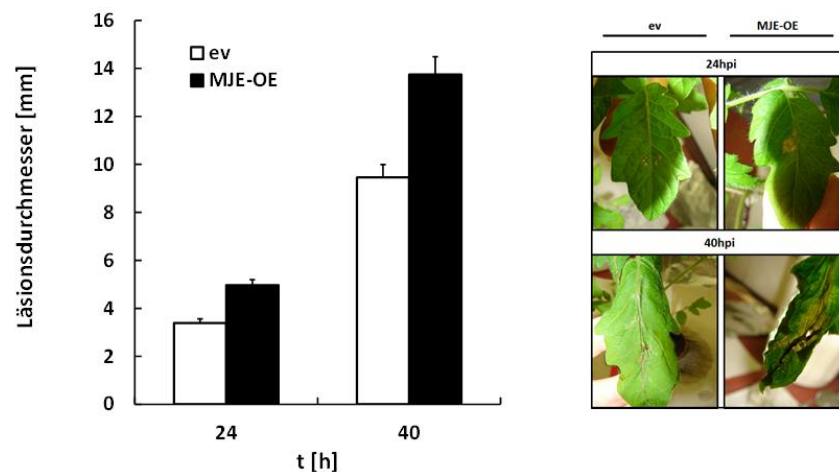


Abbildung 32: Läsionsdurchmesser und representative Darstellung des Phänotyps der MJE-OE-Linie
 Dargestellt ist der Mittelwert der Läsionsdurchmessers ermittelt aus 50-60 Läsionen + SEM; ev = Kontrolllinie

24 h nach der Inokulation sind keine Unterschiede zwischen der MJE-OE-Linie (5,48 mm) und der Kontrolllinie (5,68 mm) zu verzeichnen. An Tag 2 sind die Läsionen der MJE-OE-Linie mit einem Durchmesser von 12,53 mm deutlich größer als die der Kontrolllinie mit 7,56 mm.

Am ersten Tag weisen 2 Experimente ausgeprägtere Läsionen der MJE-OE-Linie auf, 2 weitere zeigen keinen Unterschied und in einem Experiment wurde der Läsionsdurchmesser an Tag 1 nicht ermittelt. 3 von 5 durchgeführten Studien belegen an Tag 2 einen größeren Läsionsdurchmesser der MJE-OE-Linien im Vergleich zur Kontrolllinie. 1 Experiment illustriert nahezu identische Läsionsdurchmesser und ein weiteres belegt das Gegenteil (siehe Anhang 11.4.10).

6.10.1.2 Analyse des Pathogenwachstums

Um die Vermehrung und das Wachstum des Pilzes innerhalb der Fiederblätter analysieren zu können wurde das gemessene Transkriptlevel an fungalem *Aktin* in Relation zur Tomaten-Gesamt-RNA des Blattes als Maß für die Ausbreitung herangezogen. und auf jeweils 10000 Moleküle *EF-1α* bezogen (Normierung). Ein Beispiel der 5 durchgeführten Studien zur Expressionsanalyse des fungalen *Aktins* in den MJE-OE-Linien ist in Abbildung 33 zu sehen.

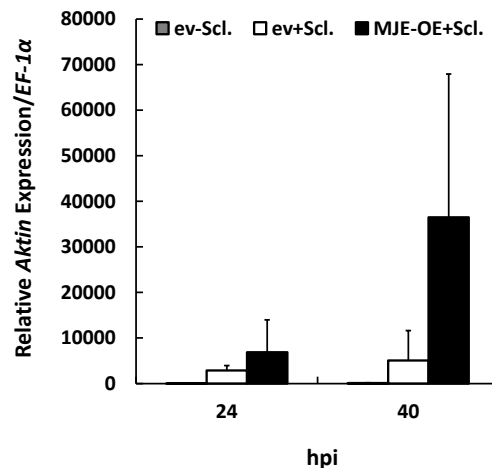


Abbildung 33: Expression des fungalen *Aktins* der MJE-OE Linie nach Pathogenbefall

Dargestellt ist der Mittelwert aus 5 biologischen Replikaten + STAW der behandelten Linien, sowie der Mittelwert aus 2 biologischen Replikaten der unbehandelten Kontrolllinien (ev-Scl.); ev = Kontrolllinie

Wie der Abb. 33 zu entnehmen ist, ist in den Kontrollbehandlungen kein fungales *Aktin* zu detektieren. 24 h nach Pathogenbehandlung beträgt die relative Expression des fungalen *Aktins* in der Kontrolllinie 2.886 Transkripte/*EF-1α*. Eine mehr als doppelt so hohe Transkription von 6.885 Molekülen/*EF-1α* weist zum gleichen Zeitpunkt die MJE-OE-Linie auf. 40 h nach Inokulation ist die Transkriptmenge in der Kontrolllinie auf 5.048 Moleküle/*EF-1α* angestiegen, erreicht aber nicht die Transkriptlevel der MJE-OE-Linie des vorherigen Zeitpunktes. Eine mehr als 7 fach stärkere Expression zeigen die biologischen Replikate der MJE-OE-Linie mit 36.490 Transkripten/*EF-1α*.

In 4 Experimenten konnte das Pilzwachstum der MJE-OE-Linien anhand der Expression des fungalen *Aktins* analysiert werden. In 2 Studien zeigte sich an Tag 1 eine sehr geringe Induktion des Pilzwachstums, die Transkriptlevel der beiden Linien waren vergleichbar. 2 weitere Versuche belegen eine stärkere Expression des fungalen *Aktins* in den Blättern der MJE-OE-Linien. 40- 48 h nach *Sclerotinia* Behandlung ist das Pilzwachstum in 4 von 5 Versuchen tendenziell höher, in einem ist sie annähernd identisch.

6.10.1.3 Genexpressionsanalyse von *AOC* und *PINII*

Analog zu den qPCR-Studien des fungalen *Aktins*, wurde auch die Expression von *AOC* und *PINII* eruiert. Versuch 4 (Abbildung 34) verdeutlicht die Expression beider Gene in den MJE-OE-Linien 24 und 40 h nach Pathogeninokulation.

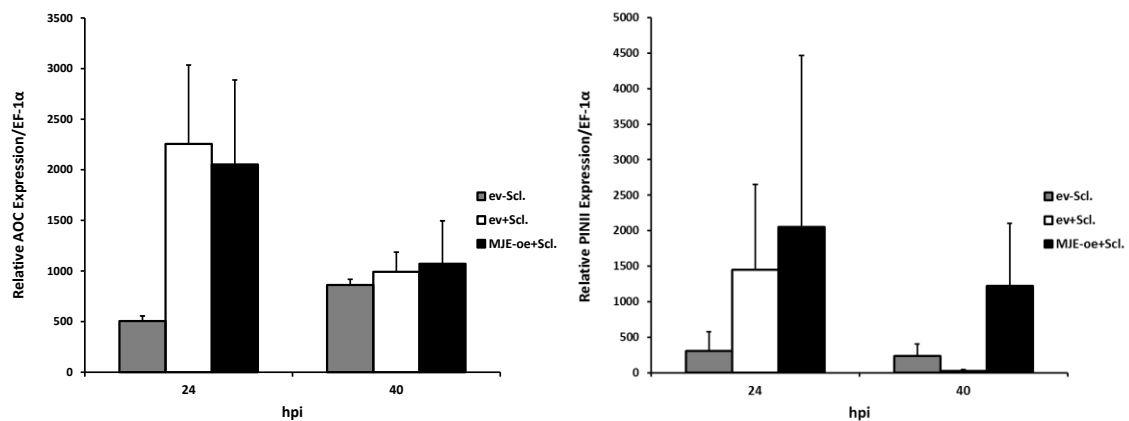


Abbildung 34: AOC und PINII-Expression der MJE-OE-Linie nach Pathogenbefall

Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 biologische Replikate der unbehandelten Kontrollen (ev-Scl) und 5 biologischen Replikate der behandelten Linien +STABW; ev = Kontrolllinie

Die unbehandelten Kontrollpflanzen weisen eine basale Genexpression von 506 Molekülen *AOC/EF-1α* auf. Nach 24 h ist die *AOC* in der Kontrolllinie (2.252 Transkripte/*EF-1α*) und in der MJE-OE-Linie (2.052 Transkripte/*EF-1α*) 4 fach stärker exprimiert, die Transkriptlevel weichen aber nicht voneinander ab. 40 h nach *S. sclerotiorum* Inokulation nahmen die Transkripte der behandelten Linien um mehr als die Hälfte ab, unterscheiden sich aber nicht signifikant von den unter gleichen Bedingungen kultivierten, unbehandelten Kontrollen (862 Moleküle *AOC/EF-1α*). Die MJE-OE-Linie weist zum gleichen Zeitpunkt eine Expression von 1.072 Transkripten/*EF-1α*, die Kontrolllinie eine Transkription von 993 Molekülen *AOC/EF-1α* auf.

Allgemein lassen sich keine Unterschiede in Hinsicht auf die *AOC*-Genexpression in den 5 durchgeführten Studien feststellen. Lediglich ein Versuch indiziert eine etwas schwächere *AOC*-Expression der MJE-OE-Linie 40 hpi (siehe Anhang 11.4.1).

Auch die *PINII*-Expression ist kaum induziert. Mit Expressionsraten von 1.448 Molekülen/*EF-1α* in der Kontrolllinie und 2023 Molekülen/*EF-1α* sind diese im Vergleich zu den unbehandelten Pflanzen mit einer Transkriptmenge von 308 Transkripten *PINII/EF-1α* nur 5 fach bzw. 7 fach stärker. Nach 40 h ist ein Abfall der *PINII*-Transkriptmenge zu verzeichnen, die Kontrolllinie weist mit 21 Molekülen/*EF-1α* sogar eine geringere Expression als die unbehandelte Kontrolle (235 Transkripte/*EF-1α*) auf. Die *PINII*-

Expression der MJE-OE-Pflanzen zeigen mit 1.223 Molekülen *PINII/EF-1α* 5 fach höhere Transkriptspiegel als die unbehandelten Kontrollen.

Sowohl 24 hpi als auch 40 hpi konnten Tendenzen einer erhöhten *PINII*-Expression festgestellt werden. 3 von 4 Studien zum Zeitpunkt 24 h zeigen eine leichte Erhöhung der Transkriptlevel, sowie 4 der 5 Versuche nach 40-48 h ebenfalls die Tendenz zu einer erhöhten Genexpression aufweisen.

6.10.1.4 Oxylipiprofil

Zusätzlich zu den Genexpressionstudien wurden die Jasmonate JA-Ile, 12-OH-JA-Ile und OPDA nach Pathogenbefall mittels UPLC/MS gemessen (siehe 5.7.3). Interessanterweise konnte JA weder in den Kontrolllinien noch in den Überexpressionslinien detektiert werden. Die in Abbildung 35 dargestellten Säulendiagramme des Versuchs 4 veranschaulichen das Oxylinprofil der Überexpressionslinien 24 h und 48 h nach *S. sclerotiorum* Applikation.

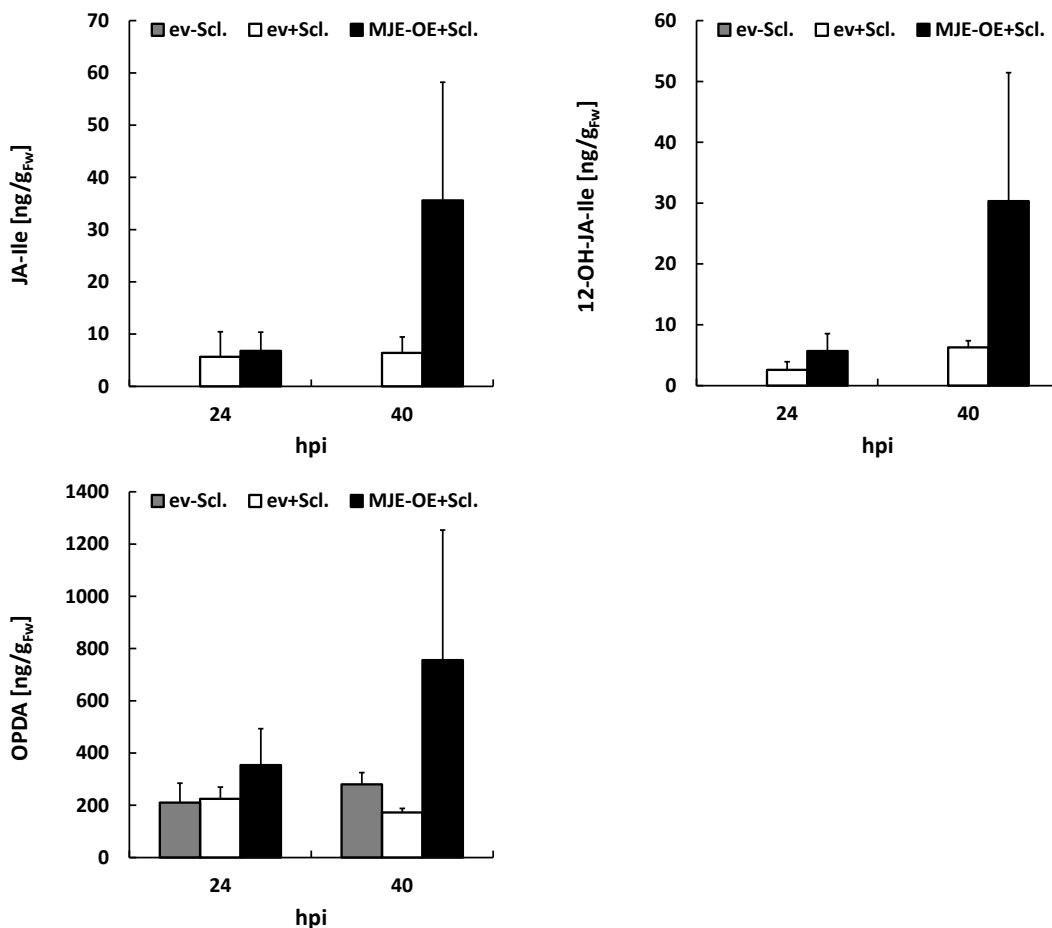


Abbildung 35:Oxylipinspiegel der MJE-OE-Linie nach *S. sclerotiorum* Inokulation

Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten für die unbehandelten Kontrollen (ev-Scl.) sowie die Mittelwerte aus 5 biologischen Replikaten für die behandelten Linien + STABW; ev = Kontrolllinie

JA-Ile als auch 12-OH-JA-Ile sind basal nicht nachzuweisen, werden aber nach Pathogenbefall gebildet. 24 h nach Inokulation weichen die JA-Ile-Konzentrationen der Kontrolllinie (5,65 ng/g_{FW}) und der MJE-OE-Linie nicht voneinander ab. Die Analyse des 40 h Zeitpunktes zeigt eine ebenfalls kaum veränderte JA-Ile-Akkumulation von 6,41 ng/g_{FW}. Im Vergleich dazu weist die MJE-OE-Linie 5 fach höhere JA-Ile-Konzentrationen von 35,59 ng/g_{FW} auf.

Die 12-OH-JA-Ile-Bildung zeigt ein ähnliches Profil wie die von JA-Ile. Ebenfalls nach 40 h ist eine fast 5 fach stärkere Synthese von 12-OH-JA-Ile in der MJE-OE-Linie im Vergleich zur Kontrolllinie zu verzeichnen. Am ersten Tag ist die Induktion der 12-OH-Bildung in der MJE-OE-Linie mit 5,69 ng/g_{FW} relativ schwach, in der Kontrolllinie liegt sie sogar unter der Nachweisgrenze.

Allgemein fallen die Unterschiede aufgrund der schwachen Bildung von JA-Ile und 12-OH-JA-Ile nach 24 h eher gering aus, indizieren aber eine Tendenz einer stärkeren Bildung beider Oxylipine in den Überexpressionslinien. In insgesamt 5 Studien konnte eine verstärkte JA-Ile-Akkumulation 40 h nach Inokulation festgestellt werden, 4 Experimente belegen deutliche Erhöhungen. Gleiches konnte für die Bildung von 12-OH-JA-Ile gezeigt werden. 3 von 4 Studien weisen höhere Konzentrationen auf, ein Experiment tendenziell erhöhte Level (siehe Anhang 11.4.16).

Mit einer OPDA-Konzentration von 224,77 ng/g_{FW} unterscheidet sich die Kontrolllinien 24 hpi nicht von den unbehandelten Kontrollen (210,01 ng/g_{FW}). Nur die MJE-OE-Linie weist mit 353,71 ng/g_{FW} eine geringfügig stärkere OPDA-Akkumulation auf. Nach 40 h sind die Unterschiede deutlicher zu erkennen. In der behandelten Kontrolllinie sind 172,30 ng/g_{FW} zu detektieren, in der MJE-OE-Linie mit 755,86 ng/g_{FW} allerdings 4 fach mehr.

Die OPDA-Akkumulation nach *S. sclerotiorum* Behandlung ähnelt derer von JA-Ile und 12-OH-JA-Ile. Auch hier sind die Unterschiede an Tag 2 deutlicher zu erkennen. Die MJE-OE-Linien weisen in 2 von 5 Experimenten eine stärkere, in 2 Experimenten eine tendenziell stärkere und einmal eine äquivalente Bildung von OPDA auf.

Zudem ist auffällig, dass die OPDA-Menge stets größer als die 12-OH-Menge ist, die wiederum größer als die detektierte JA-Ile Menge ist und die Verhältnisse der Oxylipine innerhalb der Versuche zueinander korrelieren.

6.10.2 MJE-RNAi-Linien

6.10.2.1 Läsionen

Analog zu den MJE-Überexpressionsstudien wurden auch *S. sclerotiorum* Experimente anhand der MJE-RNAi-Linien durchgeführt und die gleichen Parameter analysiert. 4 Experimente wurden anhand der Linien 3.4-4 und 3.4-23 durchgeführt. Zur Veranschaulichung der phänotypischen Veränderungen und der Läsionsgrößen wurde Versuch 3 ausgewählt (Abb. 36).

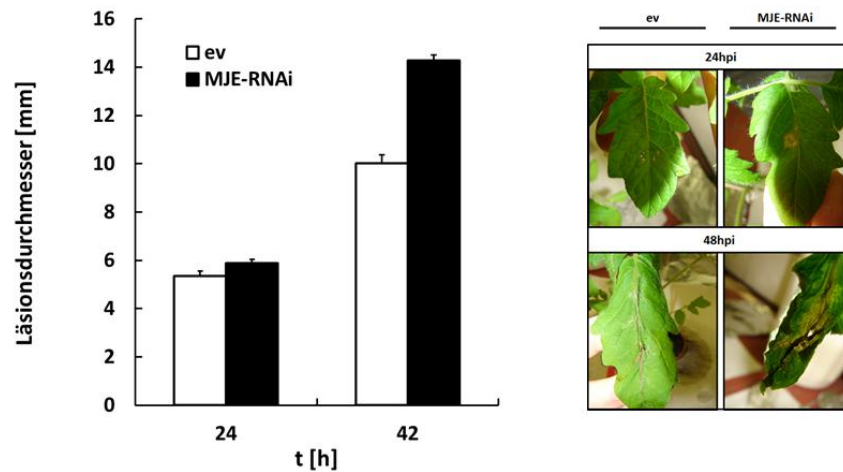


Abbildung 36: Läsionsdurchmesser und Phänotyp der MJE-RNAi-Linie nach Pathogenbefall
 Dargestellt ist der Mittelwert der Läsionsdurchmessers ermittelt aus 50-60 Läsionen + SEM; ev = Kontrolllinie

Wie aus Abbildung 36 hervorgeht, fallen die Unterschiede 24 hpi mit 5,36 mm für die Kontrolllinie und 5,88 mm für die MJE-RNAi-Linie eher gering aus. Allerdings indizieren alle 4 Versuche eine Vergrößerung der Läsionsdurchmesser in den RNAi-Linien zu diesem Zeitpunkt. Da in den ersten beiden Versuchen die Probenahme nach 48 h erfolgte, konnten aufgrund der in sich eingefallenen Blätter keine Läsionen vermessen werden. Daher erfolgte in 2 weiteren Experimenten die Probenahme 42 h und 43h nach Verwundung. Die gewonnenen Ergebnisse dieser Studien belegen eine eindeutige Zunahme der Läsionsdurchmesser zu späteren Zeitpunkten in den Linien mit *MJE*-Interferenz.

6.10.2.2 Analyse des Pathogenwachstums

Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Läsionsgrößen und fungalem Wachstum wurde die Expression des fungalen *Aktins* analysiert. Die Normierung erfolgte wie bereits beschrieben anhand der Expression des Tomaten-Referenzgens *EF-1α*. Stellvertretend für die durchgeführten Studien der MJE-RNAi-Linien wurde Versuch 3 ausgewählt (siehe Abb. 37).

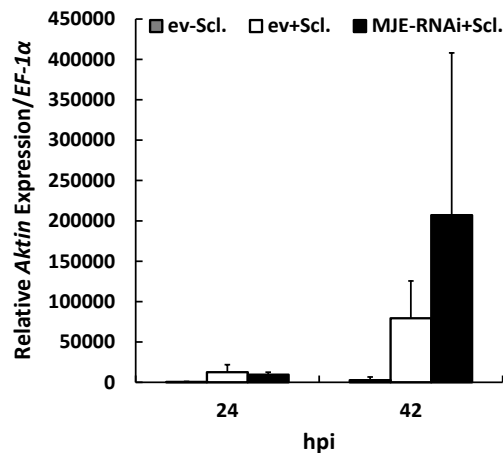


Abbildung 37: Expression des fungalen *Aktins* der MJE-RNAi-Linie nach Pathogenbehandlung

Dargestellt ist der Mittelwert aus 5 biologischen Replikaten + STAW der behandelten Linien, sowie der Mittelwert aus 3 biologischen Replikaten der unbehandelten Kontrolllinien (ev-Scl.); ev = Kontrolllinie

Trotz deutlich erkennbaren Läsionen ist die Expression des fungalen *Aktins* 24 h nach Pathogenapplikation im Vergleich zum späteren Zeitpunkt und den unbehandelten Kontrollen relativ schwach induziert. Die Kontrolllinie exprimiert durchschnittlich 12.602 Moleküle/*EF-1α*, die MJE-OE-Linie 9.527 Moleküle/*EF-1α*. Nach 42 h weist die RNAi-Linie im Vergleich zur Expression nach 24 h einen mehr als 20 fachen Anstieg (207.130 Moleküle/*EF-1α*) auf. Die behandelte Kontrolllinie zeigt zum gleichen Zeitpunkt eine nicht einmal halb so starke Genexpression (79.399 Transkripte/*EF-1α*).

In allen durchgeführten Experimenten ist die Expression des fungalen *Aktins* nach 24 h Inokulation relativ niedrig und unterscheidet sich nicht im Vergleich zu den MJE-RNAi-Linien und den entsprechenden Kontrollen. 42-48 h nach Pathogenbehandlung ist ein drastischer Anstieg der Transkription zu verzeichnen. Ein Experiment belegt einen deutlichen Anstieg der Transkripte des fungalen *Aktins* in den MJE-RNAi-Linien, 2 eine tendenziell höhere Expression sowie ein Experiment eine verringerte Expression.

6.10.2.3 Genexpression von *AOC* und *PINII*

Anhand des gleichen cDNA-Materials, welches für die Untersuchung des fungalen *Aktins* verwendet wurde, wurde auch die Analyse der *AOC*- und *PINII*-Expression durchgeführt. Ein repräsentatives Beispiel der Genexpressionsstudien ist der Abbildung 38 zu entnehmen.

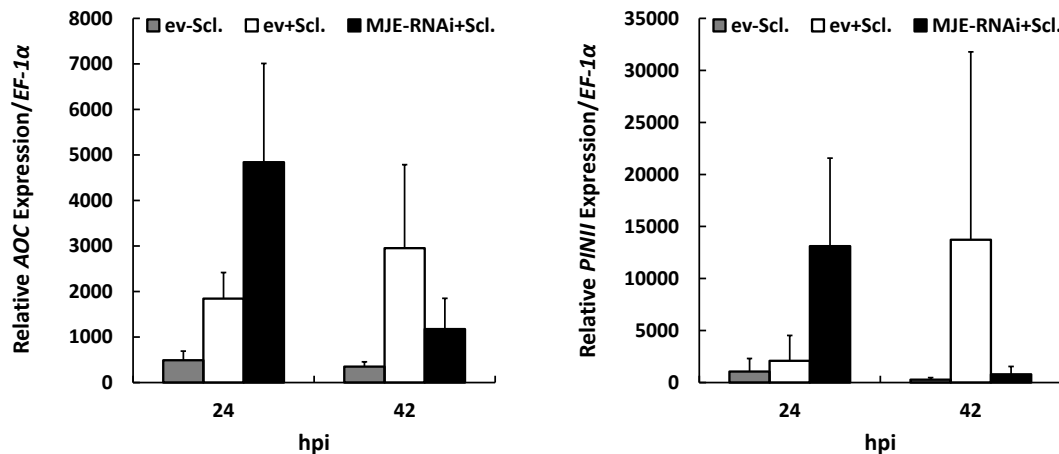


Abbildung 38: AOC und PINII-Expression der MJE-RNAi-Linie nach Pathogenbefall

Abgebildet ist der Mittelwert aus n=3 biologischen Replikaten für die unbehandelten Kontrollen (ev-Scl.), sowie n=5 biologische Replikate für die Pilz-behandelten Linien +STABW; ev = Kontrolllinie

Die unbehandelten Kontrolllinie zeigt mit 489 Molekülen *AOC/EF-1α* keine basale Induktion der *AOC*-Genexpression. Die behandelte Kontrolllinie weist nach 24 h mit 1.845 Transkripten/*EF-1α* eine 3,7 fach stärkere und die MJE-RNAi-Linie eine fast 10 fach induzierte Genexpression (4840 Moleküle/*EF-1α*) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen auf. 42 h nach Pathogenbehandlung sinkt die *AOC*-Expression der MJE-RNAi-Linie auf $\frac{1}{4}$ des vorherigen Transkriptlevels, sie belegt nur noch 1.170 Moleküle/*EF-1α*. Im Gegensatz dazu ist in der Leervektorlinie nach 42 h ein Anstieg auf 2.951 Moleküle/*EF-1α* zu verzeichnen.

In allen durchgeführten Experimenten ist die Expression der *AOC* nach Pathogenbefall kaum induziert. Generell ist sie am ersten Tag etwas stärker als 42-48 h nach Inokulation, allerdings lassen sich aufgrund starker Varianzen keinerlei Tendenzen einer veränderten Genexpression in den MJE-RNAi-Linien erkennen.

Im Hinblick auf die *PINII*-Genexpression fallen die Varianzen noch deutlicher aus. Auch hier ist keinerlei Tendenz einer veränderten Expression zu erkennen. Die hier dargestellte qPCR-Analyse der Genexpression zeigt am ersten Tag eine ca. 13 fach induzierte Genexpression der RNAi-Linie (13.108 Transkripte/*EF-1α*) gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Diese sinkt 42 h nach Behandlung auf basales Niveau (795 Moleküle/*EF-1α*) ab, wohingegen die Kontrolllinie zu diesem Zeitpunkt das Transkriptlevel der RNAi-Linie zum vorherigen Zeitpunkt erreicht (13.722 Moleküle/*EF-1α*). Die beobachteten Tendenzen waren in keinem der anderen Versuche reproduzierbar.

6.10.2.4 Oxylinprofil

Auch im Falle der MJE-RNAi-Linien wurde zusätzlich das Oxylinprofil nach Pathogenbehandlung in den 4 durchgeführten Experimenten nähergehend betrachtet. Die Akkumulation der Oxyline JA-Ile, 12-OH-JA-Ile und OPDA wurde mittels UPLC/MS analysiert. In dem exemplarisch dargestellten Versuch 1 (Abb. 39) erfolgte die Probenahme 24 h und 48 h nach *S. sclerotiorum* Inokulation.

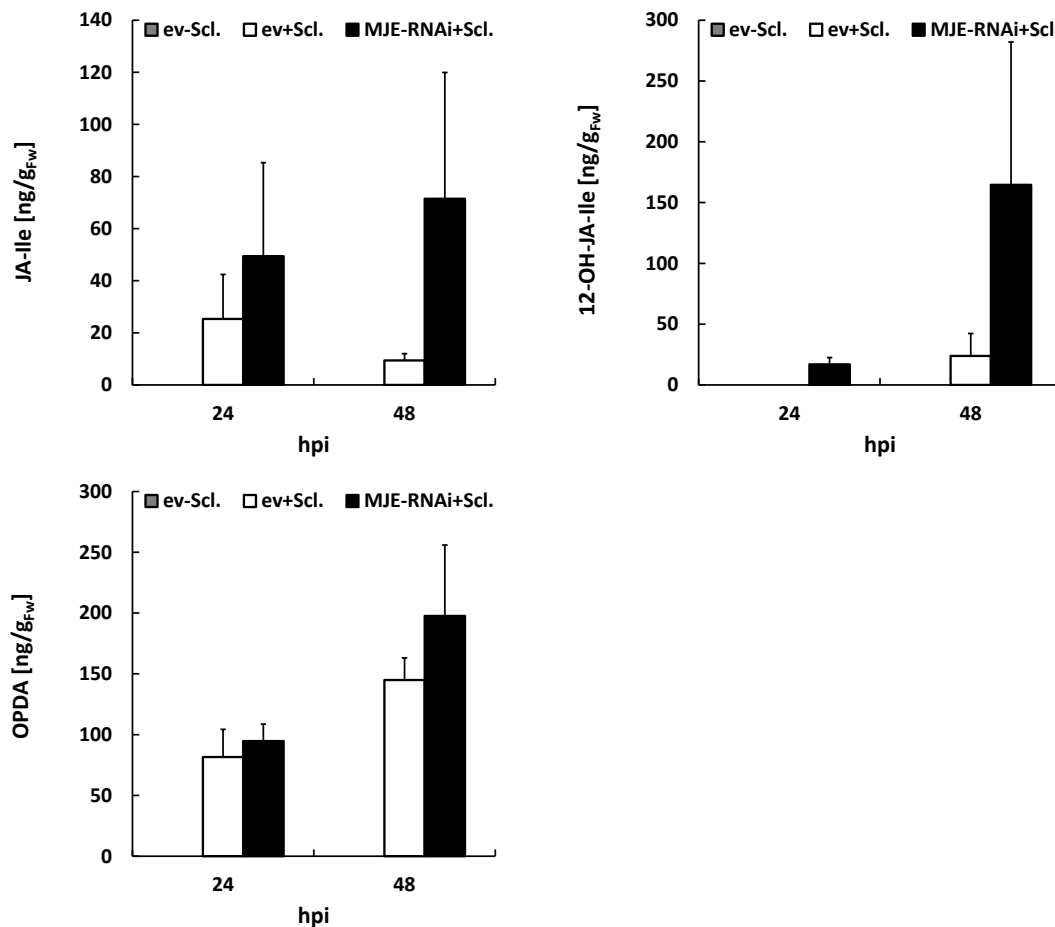


Abbildung 39: Oxylinspiegel der MJE-RNAi-Linie nach *S. sclerotiorum* Inokulation

Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten für die unbehandelten Kontrollen (ev-Scl.) sowie die Mittelwerte aus 5 biologischen Replikaten für die behandelten Linien + STABW. ev = Kontrolllinie

Basal liegen die Spiegel von JA-Ile und 12-OH-JA-Ile unterhalb der Quantifizierungsgrenze (ev-Scl.). Erstaunlicherweise konnte OPDA ebenfalls basal nicht nachgewiesen werden. 24 h bzw. 48 h nach Pathogenbehandlung ist die Akkumulation von JA-Ile der Kontrolllinie noch relativ schwach, 3 von 5 untersuchten Proben liegen zwischen der Detektions- und Quantifizierungsgrenze, weshalb hier nur die Mittelwerte der 2 ver-

bleibenden Replikate dargestellt wurden. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h sind in den MJE-RNAi-Linien höhere JA-Ile-Konzentrationen zu detektieren. 24 h nach Behandlung ist eine verdoppelte Akkumulation in der RNAi-Linie zu verzeichnen (49,42 ng/g_{FW}), 48 h nach Behandlung eine 7 fach höhere Bildung von 71,49 ng JA-Ile/g_{FW} im Vergleich zur Kontrolllinie, welche nur 9,41 ng JA-Ile/g_{FW} aufweist.

Der Rückgang des JA-Ile-Spiegels der Kontrolllinie zu späteren Zeitpunkten der Probenahme konnte in 2 von 4 Experimenten beobachtet werden. In den MJE-RNAi-Linien hingegen ist stets eine Zunahme der JA-Ile Konzentration zu verzeichnen. In allen 4 Experimenten weist die MJE-RNAi-Linie mehr JA-Ile auf, als die Kontrolllinie. 24 h nach *S. sclerotiorum* Applikation weist die RNAi-Linie ebenfalls diesen Trend auf. In 3 von 4 Experimenten sind höhere JA-Ile Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrolllinien zu verzeichnen (siehe Anhang 11.4.14).

Ein ähnliches Profil zeigt sich bezüglich der Akkumulation von 12-OH-JA-Ile. Die Bildung des Metaboliten ist 24 h nach Pathogenexposition in der Kontrolllinie so gering, dass alle 5 Replikate zwischen Nachweis- und Quantifizierungsgrenze liegen. In der MJE-RNAi Linie ist zu diesem Zeitpunkt ein 12-OH-JA-Ile Level von 17,00 ng/g_{FW} zu verzeichnen. Erst weitere 24 h später erreicht die Leervektorlinie einen vergleichbaren Level von 23,87 ng/g_{FW}. Die RNAi-Linie weist zu diesem Zeitpunkt einen deutlich höheren 12-OH-JA-Ile Gehalt von 164,60 ng/g_{FW} auf und überragt somit die Kontrolle um fast das 7 fache.

Auch 12-OH-JA-Ile ist in allen Experimenten basal nicht nachzuweisen. 24 h nach Exposition mit dem Pilz sind in der MJE-RNAi-Linie zweimal Tendenzen einer stärkeren Akkumulation festzustellen, in den beiden weiteren Experimenten sind die Spiegel äquivalent. 42-48 h nach Behandlung zeigen die Linien mit induzierter *MJE*-Interferenz in 3 Experimenten eine starke Erhöhung, in einem eine tendenzielle Erhöhung. Ähnlich wie in den MJE-OE-Linien bilden die MJE-RNAi-Linien mehr 12-OH-JA-Ile als JA-Ile, allerdings konnte dies nicht zu allen Zeitpunkten der Experimente durchgängig bestätigt werden.

Im Anfangsstadium des Pilzbefalls unterscheiden sich Kontrolllinie mit 81,65 ng OPDA/g_{FW} und MJE-RNAi-Linie mit 94,69 ng/g_{FW} kaum voneinander. Nach 48 h akkumuliert die MJE-RNAi-Linie doppelt so viel OPDA (197,66 ng/g_{FW}) wie zum früheren Zeit-

punkt. Hier lassen sich leichte Unterschiede erkennen, da die Kontrolllinie nur ca. 73 % der OPDA-Konzentration ($144,91 \text{ ng/g}_{\text{FW}}$) bildet.

Generell sind die OPDA-Level am ersten Tag in 3 Experimenten nahezu identisch, in Einem zeigt die MJE-RNAi-Linie niedrigere Spiegel. 42-48 h nach Exposition mit dem nekrotrophen Mikroorganismus belegen 2 Experimente eine tendenziell höhere, ein Experiment eine niedrigere und ein Experiment eine äquivalente Akkumulation (siehe Anhang 11.4.19. Somit lässt sich kein eindeutiger Trend bestimmen.

6.10.3 JMT-OE-Linien

Neben der Untersuchung der Linien mit veränderter MJE-Aktivität sollten auch die JMT-OE-Linien analysiert werden, da die Überexpression der *A. thaliana*-JMT in *Arabidopsis* bereits untersucht wurde und dies zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *B. cinerea* in diesen Linien führte. Es wurden 3 Versuche mit den JMT-OE-Linien 4.3-8 durchgeführt.

6.10.3.1 Läsionen

Da die Probenahme in den ersten beiden Experimenten nach 24 h und 48 h stattfand, konnten keine Läsionen für den späteren Zeitpunkt bestimmt werden. Daher repräsentiert Abb. 40 die Ergebnisse von Versuch 3, bei welchem die Probennahme nach 24 h und 40 h erfolgte.

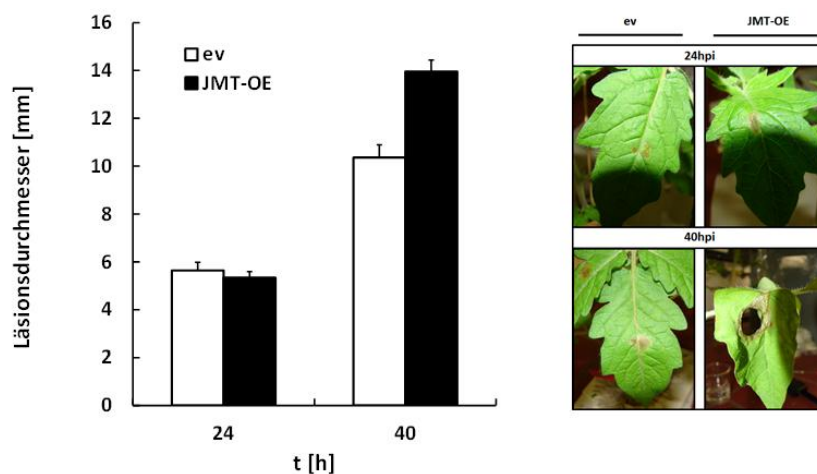


Abbildung 40: Läsionsdurchmesser der JMT-OE-Linie nach *Sclerotinia* Behandlung

Dargestellt ist der Mittelwert der Läsionsdurchmessers ermittelt aus 50-60 Läsionen + SEM; ev = Kontrolllinie

Auch im Falle der JMT-OE-Linien sind die phänotypischen Unterschiede im Vergleich zur Leervektorlinie 24 h nach Pilzbehandlung eher schwach ausgeprägt. Die Leervektorlinie verzeichnet einen Läsionsdurchmesser von 5,64 mm und die JMT-OE-Linie einen Durchmesser von 5,34 mm. Nach 40 h fallen die Unterschiede gravierender aus und die JMT-OE-Linie zeigt deutlich größere Läsionen mit einem Durchmesser von 14,28 mm gegenüber der Kontrolllinie, welche nur einen durchschnittlichen Läsionsdurchmesser von 10,01 mm aufweist.

Wie erwähnt wurden in den 2 weiteren Experimenten die Läsionen nur nach 24 h vermessen. Allerdings belegen diese Studien ebenfalls größere Läsionen der JMT-RNAi-Linie zu diesem Zeitpunkt (siehe Anhang 11.4.12).

6.10.3.2 Analyse des Pathogenwachstums

Weiterhin wurden auch mit den JMT-OE-Linien Genexpressionsstudien des fungalen *Aktins* durchgeführt, um eine Aussage über das relative Wachstum des Pilzes innerhalb der Fiederblätter treffen zu können. Wie eingängig beschrieben, wurde RNA aus dem homogenisierten Pflanzenmaterial isoliert und die in cDNA umgeschriebenen Proben mittels qPCR analysiert. Das in Abb. 41 dargestellte Experiment zeigt die *Aktin*-Expression von Versuch 2.

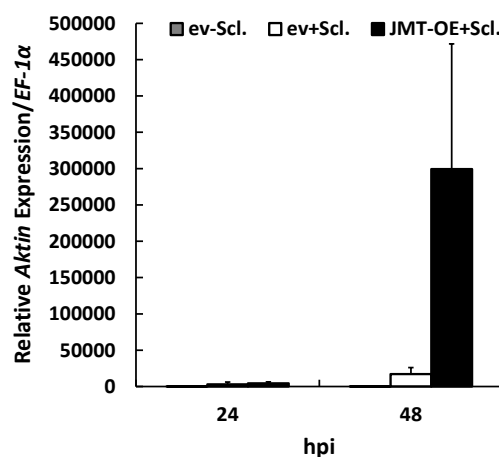


Abbildung 41: Expression den fungalen *Aktins* der JMT-OE-Linie nach Pathogenbefall

Dargestellt ist der Mittelwert aus 5 biologischen Replikaten + STAW der behandelten Linien, sowie der Mittelwert aus 2 biologischen Replikaten der unbehandelten Kontrolllinien (ev-Scl.)

Das Wachstum des Pilzes, gemessen an der Expression des fungalen *Aktins*, ist am ersten Tag nach der Exposition relativ gering im Vergleich zu den Studien der MJE-RNAi

und MJE-OE-Linien. Die Kontrolllinie und die JMT-OE-Linie unterscheiden sich mit Transkriptleveln von 3.010 Molekülen/*EF-1α* und 4.407 Molekülen/*EF-1α* kaum. 48 h nach Versuchsbeginn ist die Expression der Kontrolllinie um das 5,7 fache auf 17.150 Transkripte/*EF-1α* angestiegen. Einen stärkeren Anstieg weist zu diesem Zeitpunkt die JMT-RNAi-Linie mit 299.297 Transkripten/*EF-1α* auf, die eine um 17,45 fach stärkere Expression belegt.

Ein weiteres Experiment bestätigt die geringe Expression 24 h nach Pathogeninokulation, zeigt jedoch nach 40 h ein gegenläufiges Ergebnis (siehe Anhang 11.4.9).

6.10.3.3 Genexpression von *AOC* und *PINII*

Anhand der cDNA von Versuch 2 wurde auch die *AOC*- und *PINII*-Expression untersucht, die nachfolgend abgebildet ist.

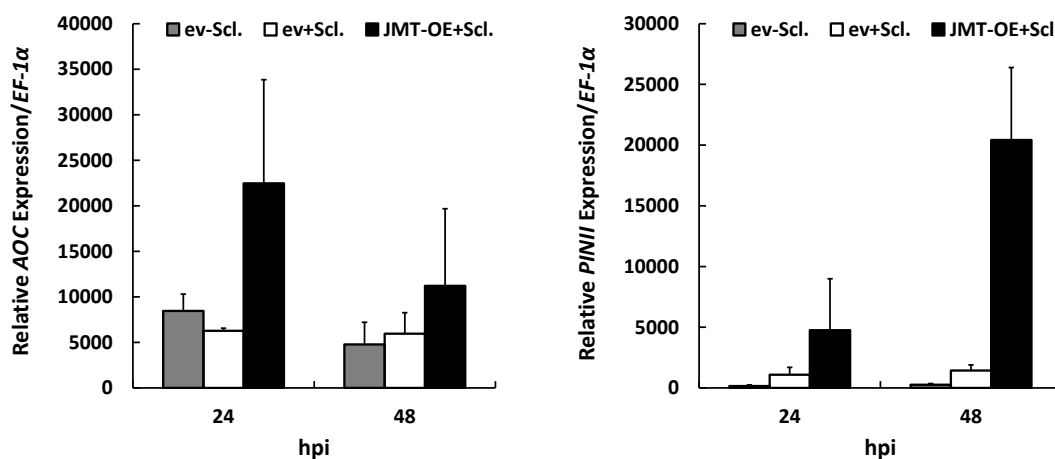


Abbildung 42: *AOC* und *PINII*-Expression der JMT-OE-Linie nach Pathogenbefall

Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 biologische Replikate der unbehandelten Kontrollen (ev-Scl.) und 5 biologischen Replikate der behandelten Linien +STABW. ev =Kontrolllinie

AOC wird konstitutiv gebildet, weist aber in dem hier dargestellten Beispiel in Bezug auf die unbehandelten Kontrollen zu beiden Zeitpunkten erhöhte Werte auf, was auf eine mögliche Stressinduktion zurückzuführen sein könnte. Die Expression der *AOC* in den behandelten Kontrollpflanzen ist nach 24 h (6.272 Moleküle/*EF-1α*) und 48 h (5.958 Moleküle/*EF-1α*) kaum induziert und befindet sich im Bereich der unbehandelten Kontrollen. Lediglich die JMT-OE-Linien zeigen zu beiden Zeitpunkten eine verstärkte Genexpression. Zu beiden Zeitpunkten ist sie in etwa doppelt so stark exprimiert wie in den unbehandelten Pflanzen. Nach 24 h zeigt sich eine relative Transkrip-

tion von 17.896 Molekülen/*EF-1 α* und nach 48 h eine schwächere Expression von 11.200 Molekülen/*EF-1 α* .

2 der 3 Experimente belegen eine leicht erhöhte Genexpression der JMT-OE-Linien zu beiden Zeitpunkten, ein Experiment zeigt keinerlei Unterschiede, allerdings erfolgte die Probenahme des letzteren Experimentes bereits nach 40 h, die der beiden anderen aber erst nach 48 h.

Interessanterweise ist die *PINII*-Expression im gleichen Experiment in den unbehandelten Pflanzen nicht induziert, was evtl. auf eine Stressinduktion bei der Entnahme der Pflanzen hindeutet, da *AOC* ein früh-responsives und *PINII* ein spät-responsives Gen ist. *PINII* ist zu beiden Zeitpunkten in der Pilz-inokulierten Leervektorlinie nur geringfügig induziert. Nach 24 h ist eine Expression von 1.853 Molekülen/*EF-1 α* zu verzeichnen, nach 48 h eine etwas schwächere von 1.440 Molekülen/*EF-1 α* . Eine deutlich stärkere Genexpression ist in der JMT-OE-Linie zu beobachten. 24 h nach *S. sclerotiorum* Exposition liegt die relative Transkription bei 4.750 Molekülen/*EF-1 α* und ist somit 2,5 fach höher als in der Kontrolllinie. Gravierender fällt der Unterschied nach 48 h aus. Hier zeigt sich eine 14 fach stärkere Induktion der *PINII*-Expression in der JMT-OE-Linie mit 20.416 Transkripten/*EF-1 α* .

Die beobachteten Unterschiede konnten in einem weiteren Experiment bestätigt werden, jedoch nur als Tendenz (siehe Anhang 11.4.3/11.4.6).

6.10.3.4 Oxylipinprofil

Auch für die JMT-OE-Linien wurde das Oxylipinprofil analysiert. Das hier repräsentativ dargestellte Beispiel zeigt die Oxylipinanalyse von Versuch 3. Die Analyse erfolgte mittels UPLC/MS unter den eingehend beschriebenen Messparametern (siehe Abb. 43).

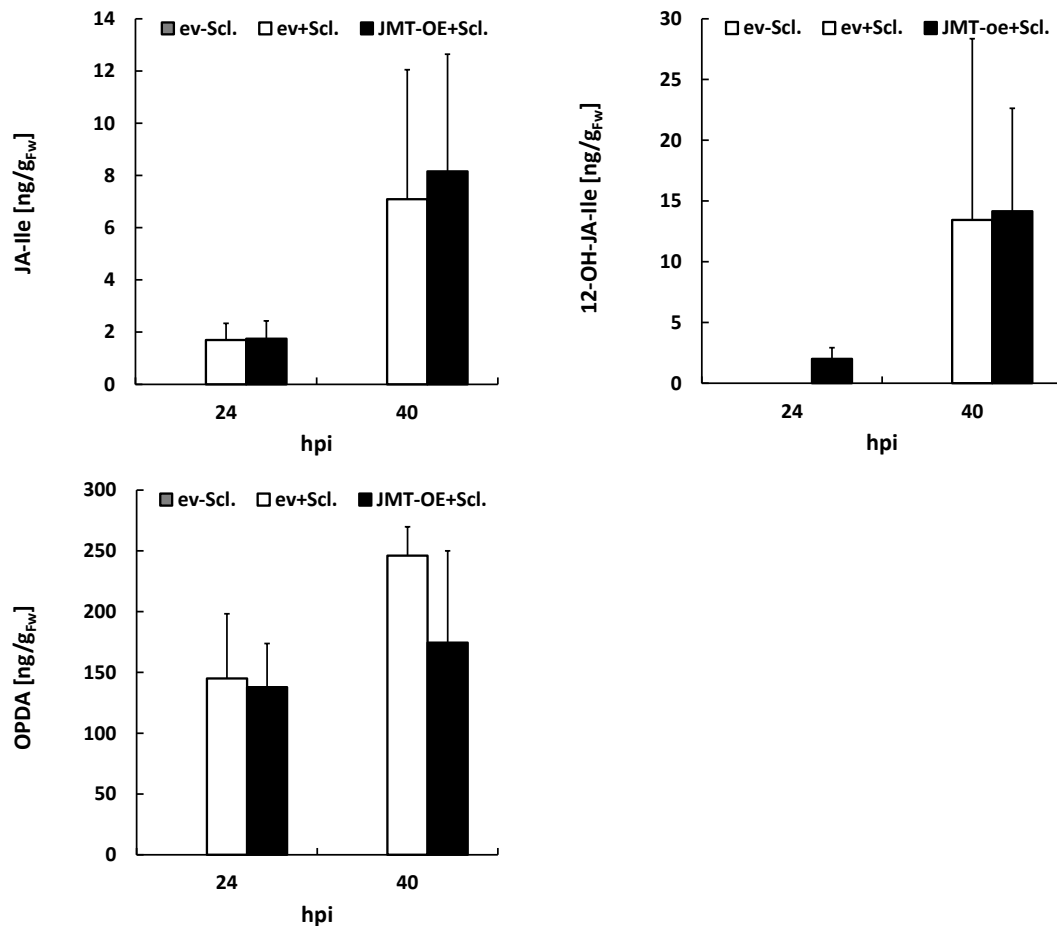


Abbildung 43: Oxylipinspiegel der JMT-OE-Linie nach *S. sclerotiorum* Inokulation

Abgebildet sind die Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten für die unbehandelten Kontrollen (ev-Scl.) sowie die Mittelwerte aus 5 biologischen Replikaten für die behandelten Linien + STABW. ev = Kontrolllinie

Basal sind weder JA-Ile, 12-OH-JA-Ile noch OPDA zu detektieren (ev-Scl). Auch 24 h nach Pathogenbehandlung sind die JA-Ile-Spiegel der behandelten Pflanzen sehr gering. Die JMT-OE-Linie sowie die Kontrolllinie weisen mit 1,69 ng/g_{FW} und 1,75 ng/g_{FW} äquivalente Level auf. Nach 48 h akkumulieren beide Linien mit 7,09 und 8,15 ng/g_{FW} mehr JA-Ile, jedoch ist aufgrund der großen Standardabweichung eine Tendenz schwer zu belegen.

Zwei weitere Experimente (siehe Anhang 11.4.15) deuten darauf hin, dass die Überexpression der *JMT* in einer verstärkten JA-Ile Akkumulation resultiert.

Da zu Beginn der hier durchgeführten Studien keine Messparameter für 12-OH-JA-Ile vorhanden waren, zeigt das hier vorliegende Beispiel die einzige Messung des Metaboliten in den JMT-OE-Linien. Wie zu erkennen, weisen beide Linien eine nahezu vergleichbare 12-OH-JA-Ile-Bildung nach 40 h. In der Leervektorlinie werden 13,43 ng/g_{FW}

und in der JMT-OE-Linie 14,16 ng/g_{FW} gebildet. Zum früheren Zeitpunkt ist kein Vergleich möglich, da die 12-OH-JA-Ile-Spiegel der Kontrolllinie zwischen Detektions- und Nachweisgrenze liegt. Die JMT-OE-Linie weist zu diesem Zeitpunkt eine Konzentration von 2,01 ng/g_{FW} auf.

Im Gegensatz dazu wird deutlich mehr des Vorläufermetaboliten OPDA gebildet. 24 h nach Stressapplikation zeigt die Leervektorlinie und die JMT-OE-Linie vergleichbare Konzentrationen von 145,08 ng/g_{FW} und 137,87 ng/g_{FW}. Weitere 16 h später steigen die OPDA-Spiegel weiter an, die Kontrolllinie weist hier mit 246,09 ng/g_{FW} einen 1,4 fach höheren Level als die JMT-OE-Linie auf (174,54 ng/g_{FW}).

6.10.4 Bedeutung des JA-Biosyntheseweges

B. cinerea Experimente belegen die Involvierung des JA-Biosyntheseweges in der Resistenz gegenüber dem nekrotrophen Pathogen in Tomate [Abuqamar *et al.*, 2008; El Oirdi *et al.*, 2011]. Um herauszufinden, ob auch der JA-Biosyntheseweg notwendig für die Pathogenantwort von *S. lycopersicum* hinsichtlich *S. sclerotinia* ist, wurden JA-Biosyntheseweg-Mutanten untersucht. Die Experimente wurden mit den Linien *spr2*, *acx1* und *jai1* durchgeführt.

Die Experimente wurden wie in Kapitel 5.3.3 beschrieben vollzogen und Läsionsgrößen sowie die Expression des fungalen *Aktins* analysiert. Aus Mangel an verfügbaren Samen wurden die Läsionsgrößen anhand derselben Pflanzen nach 24 h und 40 h ermittelt und Probenmaterial für die Expressionsanalyse des fungalen *Aktins* nur nach 40 h entnommen. Für den Wt (Castlemart) standen 5 Pflanzen zur Verfügung mit insgesamt 43 auswertbaren Läsionen, für *jai1* 5 Pflanzen mit 45 Läsionen, für *spr2* 7 Pflanzen mit 66 Läsionen und für *acx1* 4 Pflanzen mit 19 Läsionen.

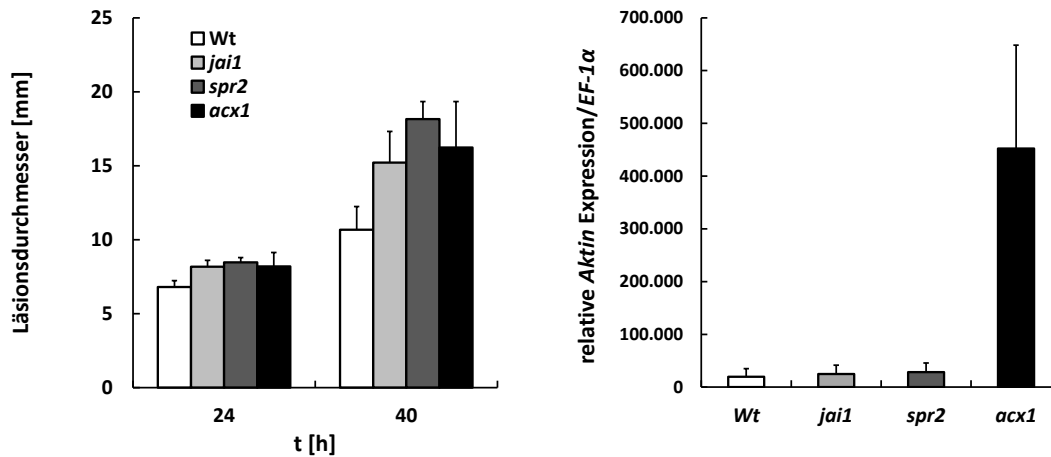


Abbildung 44: Läsionsgrößen und fungales Wachstum in den Linien *jai1*, *spr2* und *acx1*

Dargestellt sind die Mittelwerte der Läsionsdurchmesser + SEM und die Mittelwerte der Genexpression + STABW

Wie auch bei den transgenen Linien mit Veränderungen der reversiblen Methylierung sind die Unterschiede 24 h nach Exposition mit dem Pathogen moderat ausgeprägt. Der Wt weicht mit einem durchschnittlichen Läsionsdurchmesser von 6,8 mm nur gering von dem Läsionsdurchmesser der Mutanten *jai1* (8,18 mm) *spr2* (8,47 mm) und *acx1* (8,2 mm) ab. Nach 40 h Inokulation sind die Unterschiede deutlicher zu erkennen. Alle Linien weisen eine um mindestens 150 % höhere Läsionsgröße als der Wt (10,67 mm) auf. Die *jai1* Linien repräsentieren mit 15,2 mm den kleinste Läsionsdurchmesser, die *spr2*-Linien mit 18,16 mm den größten Läsionsdurchmesser. Die *acx1*-Mutanten illustrieren mit 16,24 mm einen intermediären Durchmesser.

Interessanterweise korreliert das fungale Wachstum 40 h nach Pathogenbehandlung nicht mit den ermittelten Läsionsgrößen. Obwohl alle JA-Mutanten höhere Expressionen des fungalen *Aktins* belegen, sind die Abweichungen zwischen Wildtyp und *jai1* bzw. *spr2* nicht signifikant. Der Wt weist eine relative Transkription von 19.612 Molekülen *Aktin/EF-1α*, die *jai1*-Linien eine Expression von 24.953 Transkripten/*EF-1α* und die *spr2*-Mutanten eine von 28.731 Molekülen *Aktin/EF-1α* auf. Lediglich *acx1* zeigt eine 23 fach höhere Expression. Das Transkriptlevel beträgt hier 452.339 Moleküle *Aktin/EF-1α*.

6.11 Etablierung eines *in vivo* Reportersystems

Ein weiteres Ziel der Doktorarbeit war es, ein *in vivo* Reportersystem zur Beobachtung der Verwundungsreaktion in Pflanzen mit verändertem JA/MeJA-Gehalt zu etablieren. Das Reportersystem sollte Aufschluss über die räumliche und zeitliche Verbreitung des lokal generierten Verwundungssignals geben und eruieren, ob MeJA als lokales oder systemisches Signal fungiert. Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* existierte bereits ein Reporterkonstrukt, bestehend aus dem Luciferasegen unter der Kontrolle des *A.thaliana* OPR3-Promotors. Für die Verwundungsreaktion, mit der eine lokale *de novo* JA-Biosynthese einhergeht, schien das Reporterkonstrukt als geeignet, da OPR3 die einzige aktive Reduktase der Verwundungsreaktion ist und zudem als früh responsives Gen gilt.

Da die transgenen Linien mit Veränderungen der reversiblen Methylierung bereits bestanden und charakterisiert waren, aber noch nicht genug Samenmaterial für eine zweite stabile Transformation vorhanden war, sollten die Linien transient mit dem OPR3-Luc-Konstrukt infiltriert werden. Allerdings zeigten Vorversuche mit Wildtyppflanzen eine konstitutive Aktivierung des OPR3-Promotors an den Infiltrationsstellen, woraufhin dieser Ansatz verworfen wurde.

Daraufhin wurden Wildtyp (Moneymaker) Kotyledonen für eine stabile Transformation des OPR3-Luc-Vektors herangezogen. Nach Selektion putativ transgener Linien und Identifizierung des Transgens, galt es zunächst die Induzierbarkeit des *A. thaliana* OPR3-Promotors in *S. lycopersicum* nachzuweisen. Zahlreiche Experimente belegen keine konstitutive Expression, wohl aber eine Wund-induzierbare Expression der Luciferase in den transgenen Linien Abb. 45.

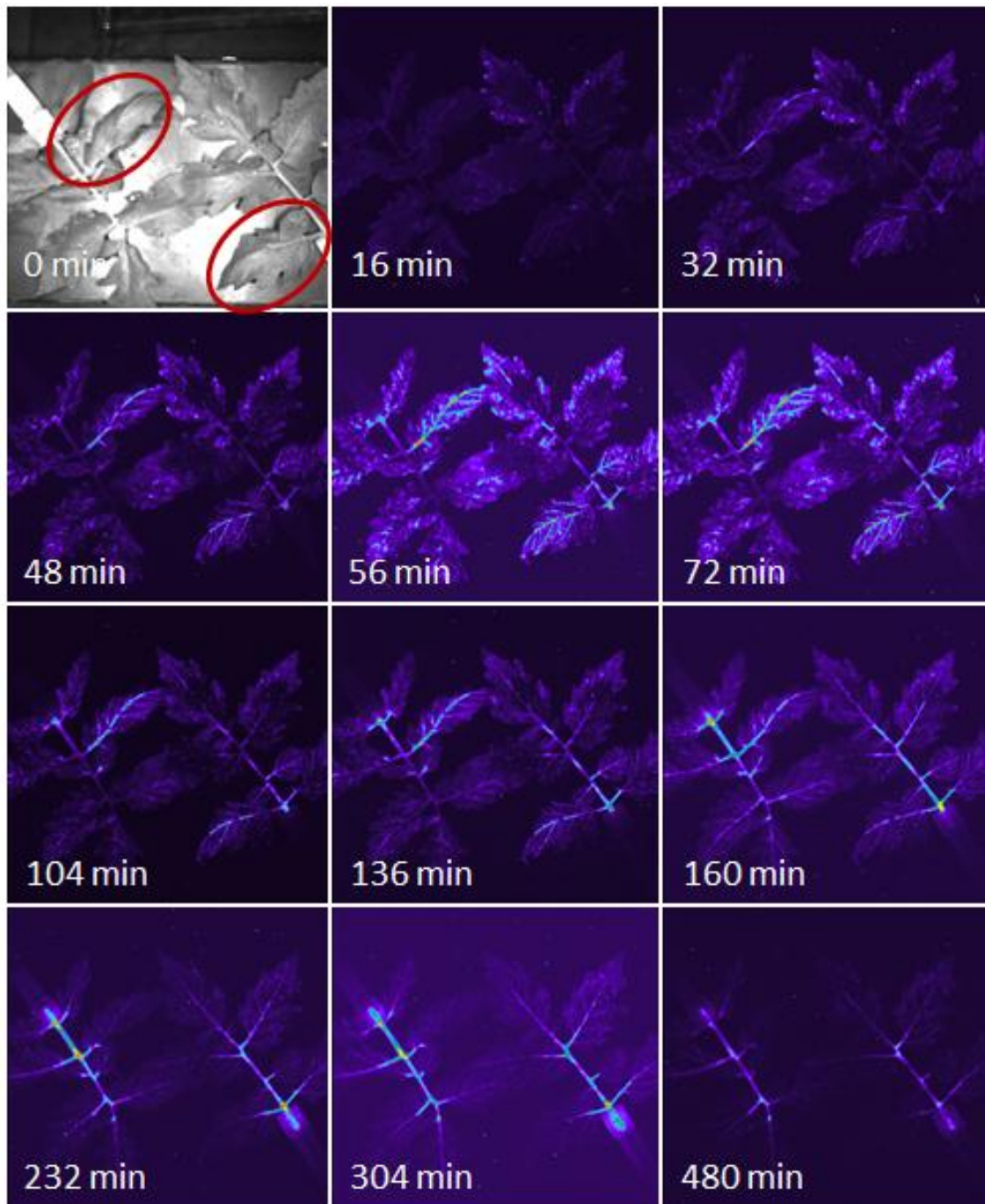


Abbildung 45: Induzierbarkeit des OPR3-Promotors nach lokaler Verwundung

Die Verwundungsstellen sind rot gekennzeichnet (0 min). Erkennbar ist die simultane Ausbreitung des lokal generierten Signals (Verwundung mittels Pinzette) in beiden Blättern zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Lumineszenz-Messung erfolgte an der CCD-Kamera mit einer Expositionszeit von 8 min.

Nachdem die Funktionalität der OPR3-Luc-Linien nachgewiesen wurde, sollten im Hintergrund dieser Linien die Enzyme der reversiblen Methylierung transient durch VIGS (Virus induced gene silencing) ausgeschaltet, bzw. reprimiert werden, um Pflanzen mit verändertem JA/MeJA Gehalt zu erzeugen. Durch Homologievergleich der *A. thaliana*

JMT-cDNA [Seo *et al.*, 2001] mit dem Genom von *S. lycopersicum* ergaben sich zwei putative Homologe.

Die Vektoren für das VIGS-System wurden vom *Arabidopsis*-Stock Center bezogen, welche von Liu *et al.*, 2002 kloniert und beschrieben wurden. Die Klonierung sollte basierend auf dem Gateway-System vollzogen werden, führte aber zu keinem Ergebnis. Da eine partielle Vektorkarte existierte [Liu *et al.*, 2002] wurden die Vektoren zum „silencen“ der *MJE* und der putativen *JMT*-Homologen letztendlich durch herkömmlichen Restriktionsverdau und Ligation hergestellt. Die exakte Klonierungsstrategie, sowie Primer und entsprechend ausgewählte Sequenzbereiche zum „silencen“ können in der Diplomarbeit von Katharina Maaser eingesehen werden. Die Vektoren konnten fertiggestellt und in Agrobakterien zur Transformation eingebracht werden, aber keine Experimente mehr durchgeführt werden.

6.11.1 *In vivo* Ausbreitung des systemischen Signals in *S. lycopersicum* nach Verwundung

Die generierten OPR3-Luc Pflanzen wurden für Vorversuche der Verwundung herangezogen, um Responsivität und Dynamik der Genexpression nach unterschiedlichen Stimuli nachvollziehen zu können. Die gewonnenen Erkenntnisse halfen Zeitpunkte, Verwundungsart und Probenmaterial zu optimieren. Neben der Verwundung intakter Pflanzen, wurden auch abgeschnittene Blätter verwundet und hinsichtlich der OPR3-Promotoraktivität untersucht. Abbildung 46 illustriert die Ausbreitung des lokal generierten Signals in einer liegenden Tomatenpflanze. Die Verwundungsstelle ist anhand des roten Pfeils indiziert, Messparameter sind dem Methodenteil aus Kapitel 5.8 zu entnehmen.

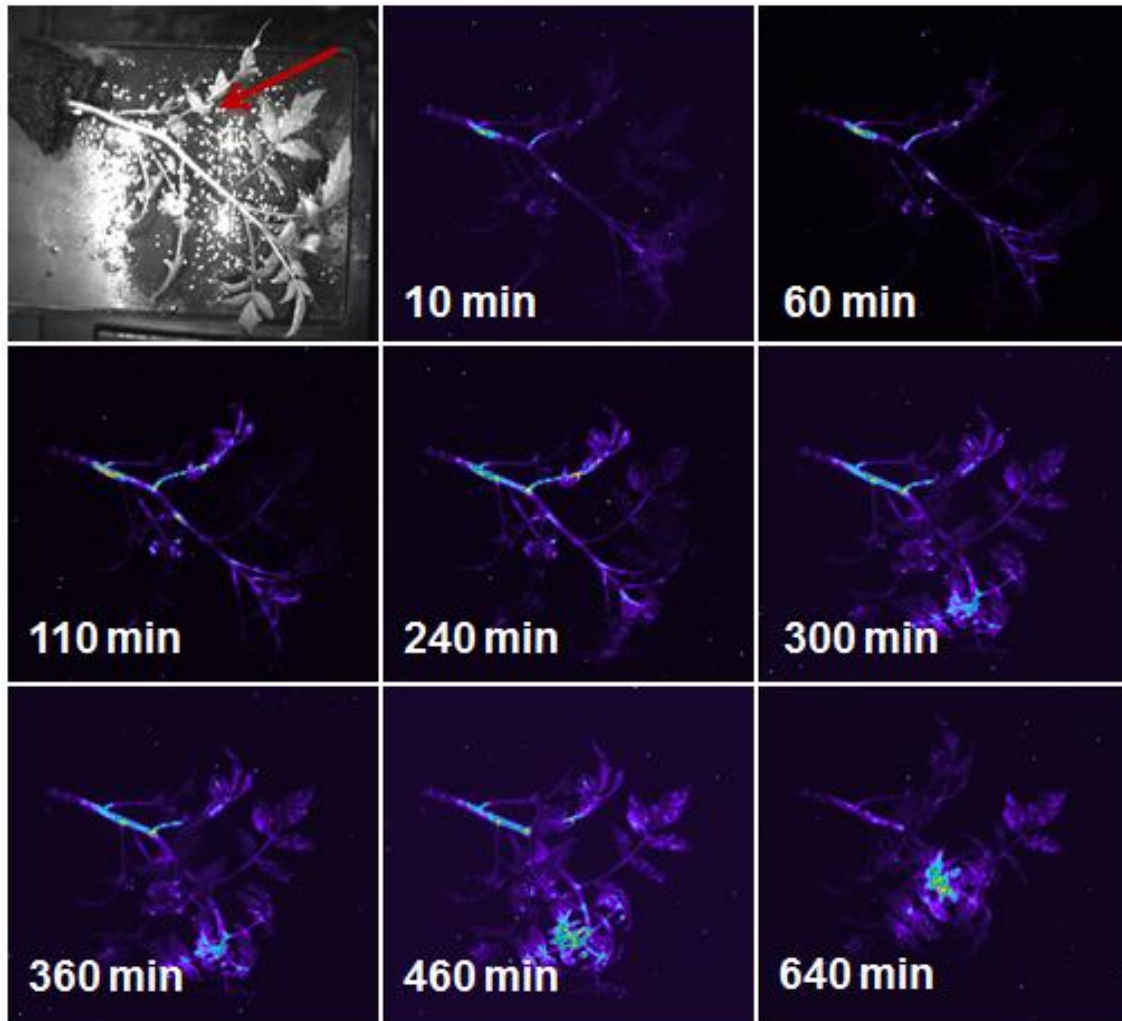


Abbildung 46: Ausbreitung des lokalen Signals nach Verwundung in *S. lycopersicum*
 Die Lumineszenz-Messung erfolgte an der CCD-Kamera mit einer Expositionszeit von 8 10 min.

Insgesamt wurden 4 Verwundungsexperimente mit ganzen Pflanzen durchgeführt, in 3 Experimenten wurden die unteren, älteren Blätter, in einem Experiment die jungen, oberen Blätter verwundet. Aufgrund des Gravitropismus decken sich die Auflichtbilder nur zu Beginn der Messungen mit denen der Lumineszenzbilder. In allen Experimenten konnte lokal an der jeweiligen Verwundungsstelle eine schnelle, direkte Reaktion der Pflanzen innerhalb der ersten 10 min beobachtet werden. Das lokal generierte Signal, gemessen an der OPR3-Promotoraktivität breitete sich dann über das vaskuläre Gewebe zum Stamm hin aus. Von dort verlief das Signal in Richtung Wurzel und in Richtung der apikalen Spitze hin. Lumineszenzsignale lieferten hauptsächlich das vaskuläre Gewebe des Stammes und nach mehreren Stunden die jungen an der Spitze gelegenen Blätter der Pflanze. Wurden die jungen Blätter der Pflanze verwundet, so war eine starke lokale Reaktion festzustellen, die auch eine starke Promotoraktivität innerhalb

der Interkostalfelder der jungen, verwundeten Fiederblätter belegte. Allerdings wurde die Verwundung der jungen Fiederblätter nur an einem Versuch analysiert.

Interessanterweise zeigen abgeschnittene Blätter von *S. lycopersicum* keine Verwundungsreaktion. So konnten auch Experimente an einzelnen Blättern durchgeführt werden (siehe Abb. 45). Um eine Embolie zu vermeiden, wurden die Blätter unter Wasser mittels Skalpell abgetrennt und in 15 ml Reaktionsgefäße mit H₂O gesteckt. Nach Anfertigung der Auflichtbilder wurden die Blätter mit 3 ml Luziferinlösung besprüht, auf konstitutive Promotoraktivität hin überprüft und mittels Pinzette an einem der Fiederblätter verwundet und unter den in Kapitel 5.8 beschriebenen Messparametern analysiert.

Untersucht wurde die lokale Ausbreitung des *in vivo* Signals anhand von 4 Experimenten. Experimente mit 2 und 4 simultan verwundeten Blättern belegen die Reproduzierbarkeit der Verwundungstechnik, da die beobachteten Lumineszenzsignale simultan und vergleichbar waren, sowie die Ausbreitung und Dynamik korrelierten. Auch bei den abgeschnittenen Blättern war eine sofortige, lokale Reaktion auf den Stimulus zu verzeichnen (erstes Lumineszenzbild). Weiterhin konnte auch hier die Ausbreitung des Signals zunächst zum nicht mehr vorhandenen Stamm hin beobachtet werden. Nachfolgend verbreitete sich das Signal über die Rachis zur Spitze des Blattes hin. Bei diesem Verwundungssystem konnte aber auch eine vermehrte Reaktion innerhalb der Interkostalfelder der Fiederblättchen detektiert werden, die bei der Betrachtung ganzer Pflanzen nicht so gravierend ausfiel.

Aufgrund begrenzter Speicherkapazität des PC konnten nur Messungen bis zu 16 h, abhängig von der Expositionszeit angefertigt werden. Zu beobachten war aber die Kontinuität der Verwundungsreaktion über den gesamten Zeitraum der Messung, daher ist anzunehmen, dass die Verwundungsreaktion länger als 16 h besteht.

7 Diskussion

Jasmonate sind Phytohormone, die eine zentrale Rolle im Pflanzenwachstum, der Entwicklung und der Reaktion auf diverse biotische und abiotische Stimuli spielen. JA als zentrales Intermediat kann auf unterschiedliche Arten metabolisiert werden. Durch zahlreiche Studien konnte die biologische Funktion vieler Metabolite aufgeklärt werden. So zeigte sich, dass JA-Ile als das biologisch aktivste JA-Derivat den Großteil aller JA-responsiven Genexpressionen durch die COI vermittelte Degradation der JAZ Repressoren ausübt. Die Rolle der reversiblen Methylierung hingegen ist weitestgehend unklar, obwohl die Enzyme in zahlreichen Pflanzenspezies identifiziert werden konnten. Aufgrund der endständigen Methylgruppe an seinem C1 Atom besitzt MeJA andere chemische Eigenschaften als JA. Da MeJA keine Säuregruppe wie JA besitzt, ist MeJA als neutrales Molekül in der Lage durch Membranen zu diffundieren und kann sehr schnell von Zellen aufgenommen werden. Aufgrund eines Dampfdruckes von 8,7 Pa ist MeJA nicht nur in flüssigem Aggregatzustand anzutreffen, sondern wurde auch in geringen Konzentrationen im Gasraum oberhalb verwundeter Pflanzen detektiert und als Interspezies-Signal identifiziert [Farmer, 2001], was die Funktion zur JA in dieser Hinsicht klar abgrenzt. Jedoch konnten die endogenen Funktionen noch nicht aufgeklärt werden. Da JA und MeJA abhängig vom Gewebe und Entwicklungszustand in unterschiedlichen Verhältnissen auftreten und diese auch zwischen den Spezies variieren, legt dies die Vermutung nahe, dass JA und MeJA unterschiedliche biologische Aktivitäten besitzen. Weil die Funktion von JA /MeJA aufgrund der konstitutiven Expression der Enzyme der reversiblen Methylierung nicht durch exogene Applikation aufgeklärt werden kann [Taki *et al.*, 2005], sollten transgene Pflanzen generiert werden. Hierzu wurde der Modellorganismus Tomate (*S. lycopersicum*) gewählt, da die *MJE* in dieser Spezies identifiziert werden konnte, in *A. thaliana* aber eine Superfamilie von 21 homologen Esterasen existiert [Vlot *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008]. Zu Beginn der Doktorarbeit war keine cDNA Sequenz einer *S. lycopersicum JMT* bekannt. Daher wurde die von Seo *et al.*, klonierte *Arabidopsis JMT*, die auch in Tabak erfolgreich transformiert wurde, für die Generierung *JMT*-überexprimierender Tomatenlinien ausgewählt [Seo *et al.*, 2001, Stitz *et al.*, 2011]. Anhand transgener Linien, welche die Enzyme der reversiblen Methylierung überexprimieren, bzw. in denen der *Knock down* dieser induziert

wird, wurden Studien durchgeführt, die darauf abzielten die biologischen Aktivitäten von JA/ MeJA aufzuklären und zudem klären sollten, ob MeJA als systemisches Signal in der Antwort auf diverse abiotische und biotische Stimuli wie Verwundung und Pathogenbefall fungiert.

7.1 Ist die MJE die einzige, spezifische MeJA Esterase?

Trotz Identifizierung und Charakterisierung der MJE-Esterase aus *S. lycopersicum* ist allerdings nicht klar, ob es sich hierbei um die einzige MeJA-spaltende Esterase oder um ein Mitglied einer größeren Genfamilie handelt [Dissertation Stuhlfelder, 2004]. Da die basalen JA- und MeJA-Spiegel der transgenen Linien nicht messbar waren, aber festgestellt werden sollte, ob die Veränderungen der Transkriptmengen mit einer Veränderung der Enzymaktivität in diesen Linien einhergehen, wurden Aktivitätsassays anhand von Proteinrohextrakten durchgeführt (siehe 5.6.3). Analysiert wurden die MJE-OE-Linien 1.5-2, 1.5-9 und 1.1-16 sowie die MJE-RNAi-Linien 3.4-4, 3.4-12, 3.4-17 und 3.4-23 (siehe Tabelle 6 und 7). Hierbei zeigten die Linien 1.5-9 und 1.5-2 eine deutlich höhere MJE-Hydrolyseaktivität. Linie 1.1-16 hingegen wies eine verringerte Enzymaktivität auf, was eventuell auf Cosuppressionseffekte in der F2-Generation durch abberante Transkripte der *MJE* zurückzuführen ist. Hinsichtlich der MJE-RNAi-Linien konnten 3 von 4 Linien mit verringerter MJE-Enzymaktivität identifiziert werden. Allerdings war keine direkte Korrelation zwischen der Reduktion der Transkriptmenge und der verringerten Hydrolyseaktivität zu verzeichnen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass für die qPCR-Analysen Pflanzen der F1-Generation verwendet wurden, zur Bestimmung der Hydrolyseaktivität aber Pflanzen der F2-Generation herangezogen wurden. Um sowohl ausschließen zu können, dass Unterschiede zwischen den F1- und F2-Generationen existieren als auch sicherzustellen, dass die hinsichtlich der Hydrolyseaktivität untersuchten Pflanzen, keinem Stress exponiert waren, müsste von demselben Pflanzenmaterial die Enzymaktivitätsbestimmung und die Analyse der Transkripte erfolgen. Da es sich aber um *MJE-Knock down*-Linien handelte, war im Hinblick beider Analysen eine Restaktivität bzw. Resttranskriptmenge zu erwarten. Da der Effekt des PTGS auch vom Immunitäts- und Entwicklungszustand der Pflanze abhängt

waren hier zudem auch Schwankungen innerhalb derselben Linie zu erwarten, da die Probenahme an unterschiedlichen Tagen erfolgte, was sich unter anderem in den großen Standardabweichungen der biologischen Replikate widerspiegelt (siehe qPCR-Studien 6.2.2). Aus den Veränderungen der Transkriptmengen würde sich demzufolge auch die Veränderung der Hydrolyseaktivität der Pflanze ergeben. Da aber die aus allen Versuchen gemittelte Hydrolyseaktivität der Linien zwischen 48 % und 62 % im Vergleich zur Kontrolllinie liegt, lässt dies im Hinblick auf die verbleibenden Transkripte vermuten, dass die MJE die primäre Esterase für die Spaltung von MeJA ist. Allerdings schließen die Studien nicht die Anwesenheit einer weiteren redundanten MeJA-hydrolysierenden-Esterase aus.

7.2 Einfluss der Modifizierung der reversiblen Methylierung auf den Phänotyp

7.2.1 Einfluss auf das vegetative Wachstum

Obwohl die Überexpression der *Arabidopsis JMT* in Tabak und *Arabidopsis* keinen Einfluss auf das vegetative Wachstum hatte [Seo *et al.*, 2001 Stitz *et al.*, 2011], führte die Überexpression desselben Enzyms zu einer Veränderung des vegetativen Wachstums in *S. lycopersicum*. JMT-OE-Linien wiesen gegenüber den Kontrolllinien ein gedrungenes Wachstum auf, MJE-RNAi-Pflanzen zeigten keine Veränderung des Habitus. Interessanterweise weisen die MJE-OE einen zur Vergeilung neigenden Habitus auf (siehe Kapitel 6.4). Der gegenläufige Habitus der MJE-OE und JMT-OE Linien kann zum einen in einer Störung der MeJA/JA-Homöostase begründet sein. Pflanzen, die mehr MeJA bilden, könnten durch das veränderte Gleichgewicht von JA /MeJA verminderte Gehalte weiterer Metabolite aufweisen, was sich negativ auf das Wachstum auswirkt. Da anscheinend in Tomate der Einfluss von Jasmonaten auf die Entwicklung im subnanomolaren Bereich ausgeübt wird, wäre dies trotz mangelnder Detektion der Oxylipine erklärbar. Eine Überexpression der *MJE*, die zu vermeintlich niedrigeren Konzentrationen an MeJA führen sollte, würde das Gleichgewicht zugunsten der Jasmonsäure verschieben und einen dementsprechend gegenläufigen Effekt erzielen. Die MeJA-Besprühung von *S. lycopersicum* resultierte in einer temporären Verzögerung des

Wachstums von Wt-Pflanzen [Boughton *et al.*, 2006]. Fraglich bleibt aber, ob MeJA von den Blättern der Pflanzen nur aufgenommen wird und so das Gleichgewicht zugunsten höherer MeJA-Gehalte verschiebt, oder aber aufgenommen und direkt durch MJE zu JA hydrolysiert wird. Dies würde das Gleichgewicht auf die Seite von JA verschieben. Die Überexpression der *JMT* in *S. lycopersicum* könnte zu einer veränderten Genexpression Wachstums-assoziiierter Gene führen. Eine derartige reduzierte Genexpression wurde von Jung *et al.*, 2007 in *Arabidopsis* *JMT*-OE-Pflanzen nachgewiesen, allerdings auch eine verstärkte Genexpression JA-responsiver Gene, was für die transgenen Tomaten-Linien nicht bestätigt wurde.

7.2.2 Einfluss auf die Keimungsrate

Die von Seo *et al.*, 2001 generierten *Arabidopsis* *JMT*-OE-Linien wurden von Don Cipollini hinsichtlich ihrer Keimungsfähigkeit analysiert [Seo *et al.*, 2001; Cipollini, 2007]. Die Reduzierung der Keimungsrate wurde auch in *S. lycopersicum* bestätigt, da die Überexpression der *A. thaliana* *JMT* zu einer verminderten Keimungsrate von 80 % im Vergleich zum Leervektor mit 95 % iger Keimungsrate führte. Allerdings zeigten auch die MJE-RNAi- und MJE-OE-Linien denselben Phänotyp. Da aber in transgenen Samen keine Oxylipine oder die Genexpression detektiert wurden, bleibt die Ursache unklar. In Samen und Blüten sind im Gegensatz zu Blattmaterial hohe Konzentrationen an OPDA und JA zu detektieren, somit wäre hier ein stärkere Auswirkung des jeweiligen Transgens denkbar [Hause *et al.*, 2000]. Die verringerte Keimungsrate kann aber sowohl an Störungen der Samenentstehung als auch an der Keimung und Embryonalentwicklung liegen. Die Veränderung des Gleichgewichtes der reversiblen Methylierung könnte zur Beeinflussung der endogenen JA- und MeJA-Spiegel geführt haben, was sich auf das Verhältnis anderer Metabolite auswirkt. Die Modifikation des Oxylipinprofils würde so die Feinabstimmung der Keimung und Embryonalentwicklung beeinflussen. Durch die geringe Substratspezifität der MJE ist aber auch eine Veränderung der Konzentrationen anderer Methylester vorstellbar. Für Tomate konnte gezeigt werden, dass OPDA, nicht aber JA-Ile, für die Embryonalentwicklung essentiell ist, da *acx1*-Linien, die OPDA nicht zu JA umsetzen, eine normale Embryonalentwicklung aufweisen [Wasternack *et al.*, 2012]. Die unspezifische Methylierung bzw. die verminderte Demethylierung von OPDA in den MJE-OE- oder RNAi-Linien könnten das Gleichgewicht zwischen OPDA-Me

und OPDA beeinflussen und so evtl. die frühe Embryonalentwicklung stören, was in einer reduzierten Keimungsrate resultiert. Der Effekt in den JMT-OE-Linien müsste allerdings anders begründet sein, da die JMT eine sehr hohe Substratspezifität aufweist und OPDA nicht als Substrat erkennt. Eine verminderte JA-Ile-Bildung in JMT-OE-Linien aufgrund eines veränderten Oxylinprofils, wie es Stitz *et al.* 2011 unter induzierten Bedingungen in Tabak JMT-OE-Linien beobachteten, kann hier Grund für die verringerte Keimungsrate sein.

7.3 Biologische Aktivität von MeJA

Die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften von JA und MeJA, sowie die Funktion von MeJA als Inter- und Intra-Spezies-Signal lassen vermuten, dass MeJA eventuell andere biologische Eigenschaften als JA aufweist. Da die Enzyme der reversiblen Methylierung konstitutiv exprimiert werden, sind die biologischen Aktivitäten nicht über reine Applikation beider Substrate in Wt-Pflanzen bestimmbar. Die exogene Applikation von JA und MeJA führt endogen zu einer raschen Interkonversion und zur Einstellung des bestehenden Gleichgewichts, was durch die unterschiedliche, gewebsspezifische Expression der Enzyme determiniert wird. Die rasche endogene Umwandlung konnten Taki *et al.*, 2005 beobachten, da die exogene Applikation von JA und MeJA eine nahezu identische Genexpression einleitete [Taki *et al.*, 2005].

Um aber dennoch herauszufinden ob MeJA als direktes Signal dient oder aber indirekt, durch Hydrolyse zu JA, agiert, musste das endogene Gleichgewicht der reversiblen Methylierung gestört werden, um die Interkonversion zu vermeiden. Daher wurden in den letzten Jahren transgene Pflanzen mit Störungen der reversiblen Methylierung generiert. Wu *et al.*, 2008 versuchten anhand der transienten Induktion des PTGS der *MJE* in Tabakpflanzen herauszufinden, ob MeJA als direkter Induktor der Genexpression agiert. Allerdings konnten sie diese Hypothese nicht im Hintergrund von Wt-Pflanzen eruieren, sondern transformierten *asLOX3*-Transgene, die nach Stressinduktion, wie Verwundung, niedrigere JA-Spiegel aufweisen. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass MeJA nicht direkt, sondern nur durch Hydrolyse zu JA zur Geninduktion führt. Da aber das transiente „silencen“ mittels VIGS nicht immer systemisch über die ganze Pflanze verteilt ist und überdies die Immunantwort der Pflanze induzieren kann, infol-

ge derer es zu einer Akkumulation von SA, dem zu JA antagonistisch wirkenden Phytohormon kommt, sind die Ergebnisse mit Bedacht zu interpretieren. Allerdings deuten auch Studien von Tamogami darauf hin, dass MeJA nach Adsorption zunächst hydrolysiert und anschließend amidiert wird, um in der Form des aktiven Metaboliten JA-Ile und des ebenfalls biologisch aktiven JA-Leu eine Reaktion der Pflanze auszulösen [Tamogami *et al.*, 2008]. Die innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit charakterisierten MJE-RNAi-Linien weisen eine zu den Kontrolllinien verringerte Hydrolyseaktivität auf (siehe Tabelle 7). Somit sollte in den Transgenen nach MeJA-Behandlung eine abweichende Genexpression zu beobachten sein. Abhängig davon ob MeJA direkt oder indirekt als Signal dient, wäre eine stärkere oder *vice versa* schwächere Geninduktion zu erwarten.

Um die Hypothese zu prüfen wurde MeJA über die Gasphase und über die wässrige Phase appliziert und Oxylipinspiegel sowie Genexpression analysiert.

Wie erwartet war in beiden Versuchsansätzen eine eindeutige Akkumulation von JA und eine Induktion der AOC-Genexpression in der Kontrolllinie nach MeJA-Applikation zu beobachten (siehe Kapitel 6.6). Die *PINII*-Expression wurde nur bei den Flotierungsexperimenten, die JA-Ile-Konzentration nur bei den Gasphasenstudien bestimmt. Beides war ebenfalls in erhöhten Mengen nach MeJA-Behandlung zu detektieren. Im Hinblick auf die JA-Konzentrationen wurde nur bei den MeJA-Applikationen über die wässrige Phase nach 4 h eine tendenziell niedrigere JA-Konzentration in den MJE-RNAi-Linien detektiert, was für die Supprimierung der Hydrolyse in den Transgenen spricht. Tendenzen einer stärkeren AOC-Expression der MJE-RNAi-Linien konnten nur bei der Aufnahme über die Gasphase nach 2 h beobachtet werden. Die hohe AOC-Genexpression beider Linien belegt die Induktion der JA-Biosyntheseenzyme durch JA, wie sie Miersch und Wasternack für *AOC*, *AOS*, *OPR3* und *LOX* zusammenfassend beschreiben [Miersch & Wasternack, 2000]. Ungewöhnlich ist, dass keine großen Unterschiede zwischen Kontrolllinie und MJE-RNAi-Linie beobachtet werden konnten. Allerdings wurde gezeigt, dass die Methylester MeJA und OPDA-Me relativ langsam hydrolysiert werden [Miersch *et al.*, 2004], was den *Knock down*-Effekt der MJE-RNAi-Linien bei der hohen Substratverfügbarkeit relativieren könnte. Weiterhin konnten Tamogami *et al.*, 2008 anhand der Applikation von d_2 MeJA über die Gasphase an *Arachyrantes*

bidentata zeigen, dass zunächst das exogen applizierte MeJA metabolisiert wird und erst nach 24 h ein signifikanter Anstieg der endogen gebildeten Jasmonate wie JA und JA-Ile induziert wird, welcher evtl. erst zu Unterschieden der MJE-RNAi-Linien durch veränderte endogen gebildete Oxylipine führen könnte. Ob aber die MeJA-Applikation in *S. lycopersicum* ebenfalls zunächst nur zu einer Metabolisierung des aufgenommenen MeJA und nicht direkt zu einer endogenen *de novo* Synthese der Jasmonate führt, konnte in den vorliegenden Experimenten nicht belegt werden, da kein JA-Vorläufer analysiert wurde.

Bei der Analyse der *PIN1*-Expression zeichnete sich 4 h nach Flotierung eine Tendenz zu einer höheren Expression ab. Ebenso war nach 2 h Exposition über die Gasphase eine höhere *AOC*-Genexpression der MJE-RNAi-Linien zu erkennen. Wäre aber die Hydrolyse von MeJA essentiell für die Geninduktion, wie es Wu *et al.*, 2008 zeigten, sollte eine verminderte Genexpression in den Linien mit verringerter Hydrolyseaktivität zu erwarten sein. Eine Erklärung für die beobachteten Tendenzen wäre die Funktion von MeJA als direktes Signal, was aber im Hinblick auf die geringen Unterschiede und die ausbleibende Korrelation der Jasmonat-Akkumulation und Genexpression eher abwegig ist. Allerdings könnte MeJA nach Aufnahme über die Stomata in die substomatäre Höhle und den Apoplasten in die Mesophyllzellen und das vaskuläre Gewebe gelangen, wo die JA-Biosynthesenzyme lokalisiert sind. Dort würde in der RNAi-Linie eine supprimierte Hydrolyse zu höheren MeJA-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolllinie führen. Die höhere Mobilität und Membranpermeabilität des Esters könnte zu einer schnelleren und homogeneren Verteilung über das ganze Blatt führen, was einen positiven Einfluss auf die Genexpression distaler Zellen hätte. Neben der Aufnahme über die Stomata kann MeJA allerdings auch über den Stiel der abgeschnittenen Blätter bei den Flotierungsexperimenten aufgenommen werden und somit direkt ins vaskuläre Gewebe gelangen und denselben Effekt hervorrufen.

Da generell keine eindeutigen Tendenzen der Transgenen zu erkennen sind, ist es nicht möglich eine Aussage über die biologischen Aktivitäten des Esters zu treffen. Ein möglicher Grund für die ausbleibenden Tendenzen kann in der Inhibierung der *MJE*-Expression nach MeJA-Applikation begründet sein. Die Applikation von MeJA führt in *S. lycopersicum* Zellkulturen nach 2 h und 3 h zu einem Rückgang der Transkripte [Stuhlfelder *et al.*, 2004]. Somit kann eine Inhibierung der *MJE*-Transkription auch in den

Kontrolllinien zu einer Reduktion der Transkriptmenge führen, die sich in der RNAi-Linie aufgrund des bestehenden *Knock downs* nicht mehr dramatisch auf die ohnehin reprimierten Transkriptlevel auswirken würde. Dies würde die ausbleibenden Unterschiede erklären. Ein Einfluss einer möglichen Verwundungsreaktion durch das Abschneiden der Fiederblätter mittels Rasierklinge ist zumindest auszuschließen, da Vorversuche anhand von OPR3-Luc-Linien belegen, dass das Abschneiden der Blätter nicht zur Induktion der OPR3-Promotoraktivität führt (siehe Diplomarbeit Katharina Maaser), sowie die in Natriumphosphatpuffer flotierten Fiederblätter ohne MeJA weder eine Akkumulation von Jasmonaten noch die Induktion der Genexpression zeigten. Eine veränderte MeJA-Aufnahme und Hydrolyse durch JA-induzierten Stomataschluss kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da keine Unterschiede der JA- und JA-Ile-Konzentrationen zwischen Kontrolllinien und MJE-RNAi-Linien festgestellt wurden. Wahrscheinlicher ist daher, dass die hohe Substratverfügbarkeit die Effekte zwischen den Linien relativiert. Dies kann u.a. bei den Applikationsversuchen über die Gasphase der Grund für die ausbleibenden Unterschiede zwischen Kontrolllinien und MJE-RNAi-Linien sein. MeJA wird von den meisten Pflanzen nur in sehr geringen Konzentrationen emittiert. Sollte MeJA auch in *S. lycopersicum* interspezies und intraspezies relevant sein, müssten geringste Mengen für eine Perzeption des Signals ausreichen. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen in denen hohe Konzentrationen vorlagen, könnte der Substratüberschuss in den MJE-RNAi-Linien mit Restaktivität zu einer den Kontrolllinien gleichenden Reaktion geführt haben.

7.4 Die Relevanz von MeJA als parakrines oder systemisches Signal der Wundantwort

Die bereits beschriebenen chemischen Eigenschaften von JA und MeJA, sowie die erhöhte Mobilität des Esters legen die Vermutung nahe, dass MeJA als parakrines oder systemisches Signal agiert und die mobile Transportform der JA darstellt. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden Verwundungsexperimente durchgeführt, da zum einen bekannt ist, dass die Verwundung zum Anstieg diverser Jasmonate führt und die

Enzyme der reversiblen Methylierung durch diesen Stimulus induziert werden [Seo *et al.*, 2001; Kapitel 6.7.1].

Zunächst sollte die Untersuchung der lokalen Verwundungsreaktion in den transgenen Pflanzen klären, ob MeJA als parakrines, transzelluläres Signal dient. Nach Verwundung erfolgt in den verwundeten Bereichen die unter Punkt 2.3.3 beschriebene, durch Systemin amplifizierte Bildung der JA. JA könnte daraufhin zu MeJA umgewandelt werden, welches zum einen durch die hohe Membranpermeabilität direkt in benachbarte, unverwundete Zellen diffundieren kann oder nach Verlassen der „Senderzelle“ über die Gasphase zu umliegenden Zellen gelangt (Abb. 47). Dort angekommen könnte MeJA durch die MJE zu JA hydrolysiert werden und durch weitere Amidierung mit Ile in Form von JA-Ile die Genexpression in der Empfängerzelle induzieren. Sollte diese Theorie zutreffen, müssten die Pflanzen mit Veränderungen der reversiblen Methylierung eine im Vergleich zum Wt veränderte Genexpression und/oder unterschiedliche Oxylinprofile aufweisen.

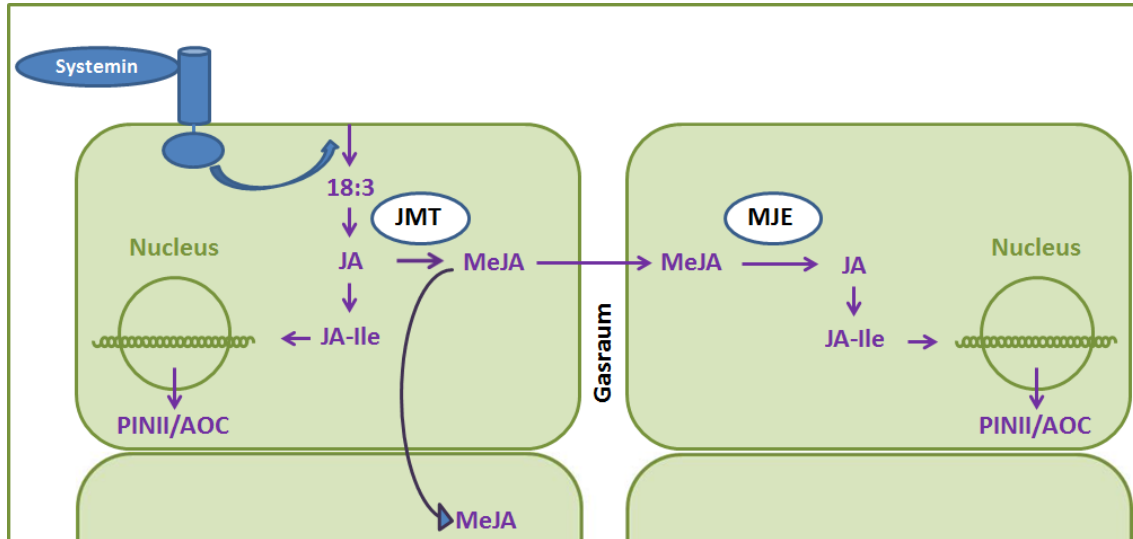


Abbildung 47: MeJA als transzelluläres Signal (modifiziert nach Stuhlfelder 2004)

Weiterhin führt die Verwundung nicht nur zu einer Induktion der lokalen Genexpression von Abwehrgenen sondern auch zur distalen Expression von Abwehrgenen wie *PINII* in unverwundeten Bereichen der Pflanze [Green & Ryan, 1972]. Pfropfungsexperimente mit *acx1* Linien die belegen, dass ein Jasmonat abseits von OPDA involviert ist,

die basalen MeJA-Spiegel keinen Unterschied zum Wt zeigten, postulierten sie, dass die Bildung von MeJA durch Substratverfügbarkeit (JA) reguliert wird.

Analog zu den Studien von Stitz wurde das lokale Oxylinprofil anhand der transgenen Linien mit Veränderung der reversiblen Methylierung zur Untersuchung der lokalen Verwundungsreaktion in *S. lycopersicum* analysiert.

Eine derartige MeJA-Pool-Bildung konnte in den transgenen Tomatenlinien mit Veränderungen der reversiblen Methylierung nicht festgestellt werden. Alle Versuche den flüchtigen Methylester in Tomate nachzuweisen schlugen fehl. MeJA konnte basal weder in Wt- und Kontrolllinien, MJE-OE-Linien, noch in MJE-RNAi- und JMT-OE-Linien, die durch die endogene Modifizierung des Gleichgewichtes der reversiblen Methylierung mehr MeJA aufweisen sollten, detektiert werden. Auch nach Verwundung, bei der nachgewiesen wurde, dass die MeJA- und JA-Spiegel simultan ansteigen [Creelman *et al.*, 1992], lag der in den Kontrolllinien und JMT-OE-Linien gemessene MeJA-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenzen von 0,5 ng/g_{FW}. Der Grund für die mangelnde Detektion kann an Spezies-spezifischen Unterschieden oder aber an der Extraktions- und/oder Messmethode gelegen haben. Für die Bekräftigung der ersten Theorie spricht die Beobachtung von Farmer, 2001, dass unterschiedliche Spezies unterschiedliche Mengen an MeJA aufweisen, sowie Miersch *et al.*, 2000 MeJA in *S. lycopersicum* in Wasserinfiltrierten Kontrollpflanzen nur in einer Konzentration von ca. 0,5 pg/g_{FW} nachweisen konnten [Farmer, 2001; Miersch *et al.*, 2000].

Allerdings schlugen auch vorherige Versuche unserer Arbeitsgruppe, MeJA in Tabak zu detektieren (Diplomarbeit S. Müller) oder den beobachteten MeJA-Anstieg in den von Seo *et al.* 2001 bezogenen *Arabidopsis* JMT-OE-Linien zu reproduzieren, fehl. Da MeJA aber sowohl in *Arabidopsis* als auch in Tabak (Wt und JMT-OE) detektiert werden konnte, scheint das Ausbleiben der Detektion auf die von uns verwendete Extraktions- und/oder Messmethode zurückzuführen zu sein [Seo *et al.*, 2001; Stitz *et al.*, 2011]. Außerdem könnte der Grund für die mangelnde Detektion von MeJA der nicht erfolgten Applikation oraler Herbivore-Sekrete anzulasten sein. Studien in Tabak belegen, dass der Stimulus der Verwundung nicht ausreicht um eine MeJA-Akkumulation und -Emission zu induzieren [Schillmiller & Howe, 2005; von Dahl & Baldwin, 2004].

Aber auch ohne die MeJA-Detektion in den transgenen Linien kann die von Stitz beobachtete Depletion des Jasmonat-Pools aufgrund möglicherweise erhöhter MeJA-Spiegel in JMT-OE- und MJE-RNAi- Linien anhand des Vergleichs mit den Kontrolllinien nicht bestätigt werden. Weder in den JMT-OE-Linien noch in den MJE-RNAi-Linien konnte eine Abnahme anderer Metabolite beobachtet werden, was wiederum indirekt darauf hindeutet, dass in den transgenen Linien dieser Doktorarbeit kein MeJA-Pool nach Verwundung generiert wurde.

Ebenso konnten die Jasmonate JA, JA-Ile und 12-OH-JA-Ile basal nicht detektiert werden, da auch diese Mengen unterhalb der Detektionsgrenze lagen. Lediglich OPDA konnte basal nachgewiesen werden. Es ließen sich aber keine Tendenzen über basale Veränderungen der OPDA-Level in den transgenen Linien feststellen.

Nach Verwundung war lokal ein deutlicher Anstieg der Jasmonate in allen Linien zu beobachten. Jedoch konnte trotz Akkumulation von JA und der damit gewährleisteten Substratverfügbarkeit keine Veränderungen der JA-Ile- und 12-OH-JA-Ile Spiegel in den transgenen Linien beobachtet werden. Zudem wurden auch keine Veränderungen der OPDA-Spiegel festgestellt. Ausbleibende Unterschiede der OPDA-Spiegel könnten anhand der Beobachtungen von Stitz *et al.*, 2011 erklärt werden, da sich die Veränderungen der Reversiblen-Methylierung nur auf die Metabolite, nicht aber auf die Vorläufer der JA auswirken.

Leichte Tendenzen veränderter Oxylipinspiegel waren für JA zu erkennen. Die JMT-OE-Linien und MJE-RNAi-Linien zeigten niedrigere JA-Spiegel, wogegen die MJE-OE-Linien leicht erhöhte Konzentrationen aufwiesen (siehe Anhang 11.2). Die beobachteten Ergebnisse könnten in der Transformation des jeweiligen Transgens begründet sein. Die Überexpression der *JMT* müsste zur vermehrten Bildung von MeJA führen, was evtl. zur Depletion des Substrates JA führt. Da beobachtet wurde, dass MeJA nach Verwundung simultan mit JA ansteigt [Creelman *et al.*, 1992], könnte die *MJE*-Überexpression eine verstärkte Hydrolyse des Methylesters begünstigen und einen erhöhten JA-Spiegel zu Folge haben. Analog zu den JMT-OE-Linien müsste in den MJE-RNAi-Linien

das Gleichgewicht zu Ungunsten der JA verschoben sein. Da die Veränderungen der JA-Spiegel nur schwach ausgeprägt waren, sind auch die ausbleibenden Tendenzen der Metabolite der JA erklärbar.

Interessanterweise zeigten sich sowohl basal als auch nach Verwundung Tendenzen höherer SA-Spiegel in den MJE-OE-Linien. Der Grund hierfür könnte in der mangelnden Spezifität der MJE-Esterase begründet sein da, diese u.a. MeSA als Substrat erkennt. Ein möglicher MeSA-Anstieg nach Verwundung könnte so in den MJE-OE-Linien die höheren SA-Level zu Folge haben. Allerdings ist wenig über die SA- und MeSA-Akkumulation nach Verwundung bekannt, da die Hauptmediatoren der Verwundung JA und Ethylen darstellen.

Wie bereits in der Einleitung in Kapitel 2.3.3 ausführlich beschrieben wurde, ist die lokale Wundantwort weitestgehend aufgeklärt und nicht nur durch einen Anstieg der *de novo* Synthese der Jasmonate geprägt, sondern auch durch eine starke Zunahme der eigenen Biosyntheseenzyme. Deren Expression wird durch die Substratverfügbarkeit sowie durch einen positiven „Feedback“-Mechanismus zwischen AOC, JA und Systemin amplifiziert [Ryan & Moura, 2002; Schillmiller & Howe, 2005]. Neben der Expression der JA-Biosyntheseenzyme ist sowohl lokal als auch distal eine Expression von Abwehrgenen wie *PIN* zu verzeichnen [Farmer & Ryan 1992]. Interessanterweise ist distal in Tomate keine *de novo* Synthese nötig, sowie auch JA-Biosyntheseenzyme wie *OPR3* nicht für die Genexpression relevant sind [Li *et al.*, 2005].

Stitz *et al.*, 2011 untersuchten daher nicht nur das Oxylinprofil sondern auch die Genexpression der Biosyntheseenzyme *LOX*, *AOS* und *OPR3*, sowie die Genexpression von Abwehrgenen wie *NaTPI*, einem Trypsin-Proteinaseinhibitor aus Tabak. Basal sowie nach Verwundung konnten sie jedoch keinen Unterschied der Expression der JA-Biosyntheseenzyme detektieren. Basal waren aber nach Verwundung reduzierte Transkriptmengen des Abwehrgens in den JMT-OE-Linien zu verzeichnen. Da aber, wie beschrieben verringerte JA-Ile-Spiegel in den Transgenen detektiert wurden, postulierten sie, dass Abwehr- und Biosynthesegene unterschiedlich reguliert werden und die JA-Akkumulation nicht an die Expression ihrer Biosyntheseenzyme gebunden ist.

Die innerhalb der vorliegenden Studie analysierten JMT-OE-Linien wiesen ebenfalls basal keinen Unterschied der AOC-Expression im Vergleich zur Kontrolle auf. Allerdings zeigten die zwei durchgeführten Studien beide eine verringerte Genexpression nach Verwundung. Die Linien mit Veränderung der MJE-Aktivität wiesen basal eine verringerte AOC-Expression auf, nach Verwundung zeigen jedoch nur die MJE-OE-Linien eine reduzierte, die MJE-RNAi-Linien hingegen eine der Kontrolle entsprechende Expression. Obwohl nicht die gleichen Tendenzen der AOC-Genexpression wie in Tabak beobachtet wurden, bleibt anhand des Vergleichs der Jasmonat-Profile und der Genexpression festzustellen, dass auch in den transgenen Linien von *S. lycopersicum* die JA-Biosynthese nicht mit der Expression ihrer Biosyntheseenzyme zu korrelieren scheint.

Die Genexpressionsanalysen des Abwehrgens *PINII* in den JMT-OE-Linien zeigten weder basal noch nach Verwundung Unterschiede zu den Kontrolllinien. Basal war nur in der MJE-OE-Linie die Tendenz einer verringerten Genexpression zu erkennen. Jedoch zeigten sowohl die MJE-OE-Linien als auch die MJE-RNAi-Linien nach Verwundung eine stärkere Genexpression des Proteinaseinhibitors. Somit konnten auch im Hinblick auf die Expression der Abwehrgene die von Stitz beobachteten Tendenz einer stärkeren Expression der Abwehrgene in JMT-OE (und JMT-OE/MJE-RNAi-Linien), die mit Veränderungen der Oxylipinspiegel einhergeht, nicht bestätigt werden.

Überraschend ist die erhöhte *PINII*-Expression der MJE-RNAi und der MJE-OE-Linien. *In vitro* konnte in beiden Linien die Veränderung der MeJA-Hydrolyseaktivität nachgewiesen werden. Die MJE-RNAi-Linien sollten daher auch endogen höhere MeJA-Konzentrationen aufweisen. Wäre MeJA ein transzelluläres Signal, welches sich von vaskulärem Gewebe aus über den Gasraum ausdehnt und in den benachbarten Mesophyllzellen die *PINII*-Genexpression induziert, sollten höhere MeJA-Spiegel zu einer verstärkten Genexpression führen. Dies könnte die stärkere Genexpression in den MJE-RNAi-Linien erklären, jedoch wäre dann ein gegenläufiger Trend in den MJE-OE-Linien zu erwarten gewesen.

Die widersprüchlichen Ergebnisse der *PINII*-Expression und die geringen bzw. ausbleibenden Unterschiede der Oxylipinprofile im Vergleich zu den Kontrolllinien, lassen daher vermuten, dass MeJA nicht als transzelluläres Signal der lokalen Verwundungsreak-

tion in *S. lycopersicum* dient. Alternativ könnten sich aber auch die Effekte der Signalgenerierung und -perzeption in den Empfängerzellen gleichermaßen stark auswirken, so dass keine Unterschiede in der lokalen Reaktion zu beobachten sind. Die Studien von Stitz *et al.*, 2011 deuten ebenfalls daraufhin, dass MeJA nicht als transzelluläres Signal agiert, da die Veränderungen der Expression von Abwehrgenen auf die Generierung eines MeJA-Pools, der eine Depletion anderer Jasmonate zu Folge hat, begründet ist. Obwohl MeJA anscheinend nicht als transzelluläres Signal Einfluss auf die lokale Verwundungsreaktion ausübt, könnten sich die Veränderungen der reversiblen Methylierung jedoch anderweitig auf die Genexpression auswirken. Da bekannt ist, dass der „second messenger“ H_2O_2 in Mesophyllzellen die *PINII*-Expression induzieren kann, wäre ein Einfluss der reversiblen Methylierung auf die Konzentrationen der reaktiven Sauerstoffspezies denkbar. Dies würde die veränderte Genexpression erklären [Orozco-Cardenas *et al.*, 2001].

Die Analyse der distalen Genexpression in den Pfropfbastarden (*ev/ev*; *ev/MJE-RNAi*) nach Verwundung zeigt eine schwächere *AOC*-Genexpression aber deutlich stärkere *PINII*-Expression im Vergleich zu den lokalen, verwundeten Blättern. Ungewöhnlich scheint die distal höhere *PINII*-Expression, da Lee und Howe diesbezüglich eine lokal stärkere, distal aber schwächere *PINII*-Expression in *S. lycopersicum* detektieren konnten [Lee & Howe, 2003]. Interessanterweise belegen Studien in *Arabidopsis*, die eine Interaktion des Ethylenweges untersuchten, im Hinblick auf die *VSP*-Expression das hier beobachtete Expressionsmuster. Lokal inhibierte der Ethylenweg die *VSP*-Genexpression, distal jedoch nicht [Roio *et al.*, 1999]. Daher wäre es interessant, auch in weiteren Studien die Interaktion des Ethylenweges in der lokalen und systemischen Verwundungsreaktion, beispielsweise anhand der *ERF3*-Expression oder der Ethylen Spiegel zu untersuchen.

Der Vergleich der Kontrollpfropfbastarde mit den Pfropfkombinationen aus Wt-Unterlage und *MJE-RNAi*-Spross wies keine Tendenzen einer veränderten *AOC*-Genexpression auf. Daher scheint der *Knock down* der *MJE* im distalen Gewebe keinen Einfluss auf die Genexpression der eigenen Biosyntheseenzyme auszuüben. Da aber

distal keine *de novo* Biosynthese stattfindet, sind die ausbleibenden Tendenzen evtl. mit der nicht vorhandenen Relevanz zu erklären.

Im Gegensatz zur AOC-Expression ist die Expression von *PIN1* in den MJE-RNAi-Sprossen in vier von sechs Experimenten tendenziell stärker, in den anderen zwei Experimenten jedoch schwächer. Wäre die MJE für die Perzeption des transportierten Signals entscheidend, so sollte eine deutlich schwächere Genexpression in den MJE-RNAi/Kontrolllinien-Kombinationen zu erwarten sein. Anhand der gegenläufigen Ergebnisse kann daher ausgeschlossen werden, dass die MJE essentiell für die Perzeption des vaskulären Signals ist. Auch kann indirekt ausgeschlossen werden, dass MeJA das systemische Signal darstellt, da MeJA nicht mit COI-interagiert und zur Induktion der *PIN1*-Genexpression führen kann [Thines *et al.*, 2007].

Da aber die endogenen MeJA-Spiegel so gering sind, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze liegen, könnten die ausbleibenden Unterschiede auch auf die MJE-Restaktivität der *Knock down*-Linien zurückzuführen sein, da Phytohormone noch in geringsten Konzentrationen ihre Wirkung entfalten. Eine weitere Erklärung könnte darin begründet sein, dass sich ein möglicherweise erhöhter MeJA-Spiegel der MJE-RNAi-Sprosse auf die Verteilung in den distalen Blättern auswirkt. Sollte mehr MeJA vorhanden sein, könnte sich der flüchtige Ester schneller mittels Gasphase über das Blatt verteilen und so indirekt durch Veränderung der Homöostase anderer Metabolite oder durch die ausreichende MJE-Restaktivität in den Zielzellen zu einer der Pfropfkontrolle entsprechenden Genexpression führen.

Neben dem aktiven Transport chemischer Signale wird die Involvierung elektrischer Signale zur Induktion der distalen Genexpression diskutiert. Auch die Versuche anhand der OPR3-Luc-Linien (siehe 6.11.1) sprechen für die Beteiligung eines schnellen Signals, da die OPR3-Promotoraktivität direkt nach Verwundung beobachtet wurde und sich rasch über die Pflanze ausdehnt, was nicht mit der Transportgeschwindigkeit eines Phloem-mobilen Signals übereinstimmt. Elektrischen Signalen mangelt es allerdings an Spezifität, daher könnte eher die Theorie von Koo *et al.*, 2009 zutreffen, die besagt, dass ein rasches elektrisches Signal der Spezifizierung der distalen Reaktion durch ein Phloem-mobiles Jasmonat-Signal vorrausgeht [Koo & Howe, 2009].

Neben MeJA wurde auch der Transport des biologisch aktiven Metaboliten JA-Ile als Signal vermutet. Studien zur Analyse eines möglichen JA-Ile-Transports liefern allerdings gegensätzliche Resultate, außerdem würden die von Stitz *et al.*, 2011 detektierten MeJA-Level im distalen Gewebe von Tabakpflanzen ausreichen um die vor-Ort-Bildung von JA-Ile zu bewerkstelligen [Wang *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2011; Stitz *et al.*, 2011]. Somit bleibt weiterhin unklar, welcher Jasmonat-Metabolit als systemisches Signal fungiert. Eine endgültige, eindeutige Klärung, ob JA-Ile oder MeJA als systemisches Signal agiert, könnte durch Pfropfungsexperimente zur Analyse der Generierung des systemischen Signals erzielt werden. *jar*- und *JMT*-RNAi+*MJE*-OE-Linien könnten als Unterlage dienen, die mit *Wt*-Sprossen kombiniert und am Wurzelstock verwundet werden. Eine ausbleibende Genexpression im Spross würde ein Indiz für das systemische Signal liefern.

7.5 Bedeutung der reversiblen Methylierung für die Pathogenresistenz gegenüber *S. sclerotiorum*

Die Resistenz der Pflanzen gegenüber Pathogenen ist abhängig von der angeborenen Immunität jeder einzelnen Zelle und ihrer Fähigkeit systemische Signale für die Immunantwort noch nicht befallener Zellen, ausgehend von der Infektionsstelle, auszusenden [Jones & Dangl, 2006]. Abhängig von der heterotrophen Ernährungsweise des jeweiligen Pathogens sind verschiedene Signale und Signalwege involviert [Pieterse *et al.*, 2009]. Für die Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen ist eine Interaktion des Ethylen- und JA-Weges ausschlaggebend für die Immunität. Experimente mit dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* belegen die Involvierung des JA-Weges in *S. lycopersicum*, da Mutanten wie *jai1*, *spr2*, *def1* und *acx1* deutlich suszeptibler als *Wt*-Pflanzen sind, sowie ein Anstieg der JA-Konzentration zu verzeichnen war [Abuqamar *et al.*, 2008; El Oiridi *et al.*, 2011]. Weiterhin konnten Seo *et al.*, 2001 in *Arabidopsis* belegen, dass die Überexpression der *JMT* zu einem Anstieg der MeJA-Konzentration und einer erhöhten Resistenz gegenüber *B. cinerea* führt. Da *B. cinerea* sowie *S. sclerotiorum* zur Familie der *Sclerotiniaceae* gehören, wurden Studien mit dem Pilz *S. sclerotiorum* durchgeführt

um die Relevanz der reversiblen Methylierung in der Pathogenresistenz von *S. lycopersicum* zu eruieren.

Analog zu den Experimenten mit *B. cinerea* wurden auch Vorexperimente mit *S. sclerotiorum* anhand von JA-Biosynthesemutanten durchgeführt, um zu überprüfen ob der JA-Biosyntheseweg für die Resistenz gegenüber dem Pathogen relevant ist. Hierzu wurden die Linien *spr2*, *acx1* und *jai1* ausgewählt und Läsionsgrößen als Anhaltspunkt für den voranschreitenden Zelltod und das Wachstum des Pilzes anhand der Expression des fungalen *Aktins* bestimmt (siehe Kapitel 6.10.4). Alle Linien wiesen sowohl größere Läsionen als auch eine stärkere Expression des fungalen *Aktins* auf. Die erhöhte Suszeptibilität der Linien lässt somit auf die Involvierung des JA-Weges schließen.

Basierend auf den Erkenntnissen der Vorexperimente wurden auch die transgenen Linien JMT-OE, MJE-OE und MJE-RNAi untersucht. Die Quantifizierung der Läsionsgrößen und die Bestimmung des Wachstums des Pilzes, zeigten interessanterweise einen deutlichen Anstieg beider Parameter in allen Linien mit endogener Modifizierung der reversiblen Methylierung. Dies führt zur Annahme, dass nicht nur der JA-Biosyntheseweg sondern auch die reversible Methylierung eine Rolle in der Pathogenresistenz gegenüber *S. sclerotiorum* einnimmt. Da bekannt ist, dass nach Pathogenbefall die Spiegel an JA- und Methyl-Jasmonat simultan ansteigen, wurde das Oxylinprofil sowie die Genexpression in den Transgenen untersucht [Grundlach *et al.*, 1992]. In Bezug auf das Oxylinprofil wurden die Metabolite OPDA, JA, JA-Ile, 12-OH-JA-Ile und MeJA analysiert. Erstaunlicherweise konnte nicht nur MeJA sondern auch JA nicht detektiert werden. Allerdings war sowohl für den JA- Vorläufer OPDA als auch den JA-Metabolit JA-Ile ein deutlicher Anstieg in allen Linien zu verzeichnen, was auf eine sehr schnelle Metabolisierung von JA schließen lässt.

Durch den starken Anstieg von JA-Ile konnten in den Linien mit veränderter MJE-Aktivität sowohl nach 24 h als auch nach 40 - 48 h deutlich höhere Konzentrationen als in der Kontrolllinie detektiert werden. In den JMT-OE-Linien zeigte sich der Trend nur nach 40 - 48 h. Neben JA-Ile wurde ebenfalls ein Anstieg der 12-OH-JA-Ile-Konzentration in den transgenen Linien mit Veränderung der MJE-Aktivität verzeichnet. Allerdings akkumulierte der Metabolit im Gegensatz zu JA-Ile erst zu späteren Zeitpunkten der Probenahme. Die verzögerte Akkumulation korreliert mit der Annah-

me, dass es sich um die biologisch inaktive Form von JA-Ile handelt [Miersch *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2011]. Im Hinblick auf die Analyse der OPDA-Spiegel zeigte die MJE-RNAi-Linie keine im Vergleich zur Kontrolllinie veränderten Spiegel, die MJE-OE-Linien wiesen im Gegensatz dazu zu beiden Zeitpunkten höhere Konzentrationen auf sowie die JMT-OE-Linie in zwei von zwei Experimenten nach 24 h höhere und nach 40 h niedrigere Konzentrationen aufweist. Somit ist zu beobachten, dass nur die Akkumulation der Oxylipine JA-Ile und 12-OH-JA-Ile miteinander korrelieren, nicht aber OPDA.

Neben der Analyse des Oxylinprofils wurden auch Genexpressionsstudien durchgeführt. Interessanterweise zeigten beide Überexpressionslinien eine verstärkte *PINII*-Genexpression, die MJE-RNAi-Linie weist jedoch keine Tendenzen einer veränderten Genexpression auf. Aufgrund der erhöhten JA-Ile-Spiegel wäre aber in allen Linien eine verstärkte *PINII*-Genexpression zu erwarten gewesen. Dies lässt auf eine mögliche Regulation der Genexpression schließen, die unabhängig von der JA-Ile-Bildung ist. Eine Möglichkeit wäre eine zusätzliche Deregulation der JAZ-Repressoren. Weiterhin zeigten Experimente mit *B. cinerea*, dass der nekrotrophe Pilz im Laufe der Evolution Strategien entwickelt hat, um trotz Aktivierung des für ihn schädlichen JA-Biosyntheseweges, die Expression von Abwehrgenen wie *PINII* durch Aktivierung des SA-Weges und die damit einhergehende Expression von *NPR1* zu unterbinden, was sich positiv auf dessen Virulenz auswirkt [El Oirdi *et al.*, 2011].

Um zu eruieren, ob die erhöhte Suszeptibilität der Transgenen ebenfalls durch Interaktion mit anderen Signalwegen begründet ist, wurde die Expression von *NPR1* und von *ERF3*, einem Transkriptionsfaktor des Ethylenweges, nach *S. sclerotiorum* Inokulation in den MJE-RNAi-Linien untersucht und mit der Expression des JA-Biosynthesegens AOC verglichen (*NPR1*, *ERF3* Genexpression siehe Bachelorarbeit Stephanie Müller, 2011).

Die von El Oirdi beobachtete Interaktion des SA- und JA-Biosyntheseweges konnte für *S. sclerotiorum* nicht verifiziert werden, da die *NPR1*-Expression sowohl in der MJE-RNAi-Linie als auch in der Kontrolllinie in Bezug auf die Kontrollbehandlungen unverändert blieb. Somit scheint *S. sclerotiorum* andere Strategien als *B. cinerea* zur Repression schädlicher Abwehrmechanismen zu nutzen. Allerdings ist eine posttranslationale Degradation des PCD-Suppressors *NPR1* nicht auszuschließen, die zu einer erhöhten Suszeptibilität führen könnte [Wu *et al.*, 2012].

Auch die Genexpressionsanalyse von *AOC* und *ERF3* zeigte keinen Unterschied zwischen den Kontrolllinien und den MJE-RNAi-Linien. Damit ist auch eine Störung des Ethylenweges in den MJE-RNAi-Linien nicht der Grund für die erhöhte Empfindlichkeit der Transgenen gegenüber *S. sclerotiorum*.

In Anbetracht der *AOC*-Genexpression aller Linien scheint es ungewöhnlich, dass trotz höherer JA-Ile Spiegel 40-48 h post Inokulation ein Abfall der *AOC*-Transkripte zu verzeichnen war. Entgegen der allgemeinläufigen Theorie, dass JA-Biosyntheseenzyme durch Substratverfügbarkeit induziert und einen positiven „Feedback“-Mechanismus amplifiziert werden, könnten die Beobachtungen von Koo *et al.*, 2009 hier zutreffen. Diese beschreiben einen negativen Feedback-Mechanismus da sie trotz hoher JA-Spiegel eine Abnahme JA-responsiver Gene beobachten konnten [Koo *et al.*, 2009; Koo & Howe, 2009]. Weiterhin könnte aber auch die höhere *AOC*-Expression nach 24 h auf einen aktiven Abwehrmechanismus der Pflanze zurückzuführen sein, der zur kontrollierten Bildung von Jasmonaten führt. Die verstärkte Akkumulation der Jasmonate an Tag zwei könnte auf den Membranzusammenbruch der Zellwände durch den PCD und die daraus resultierende, unkontrollierte Freisetzung von Substraten durch den Pilz zurückzuführen sein. Diese Hypothese wird auch durch die Pathogenese des Pilzes bekräftigt, da die Expression der Zellwand-degradierenden Enzyme (CWDE), die zu einer Freisetzung der Substrate des JA-Biosyntheseweges führt, und die Ausbildung nekrotischer Läsionen erst in der späten pathogenen Phase auftreten. Dies könnte die geringen Unterschiede 24 h nach Befall und die ausgeprägten Unterschiede nach 40- 48 h erklären.

Verwunderlich ist, dass alle Linien der reversiblen Methylierung eine deutlich höhere Suszeptibilität gegenüber dem Pathogen *S. sclerotiorum* aufweisen und alle Linien eine höhere Akkumulation der JA-Metabolite JA-Ile und 12-OH-JA-Ile zeigen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte darin begründet sein, dass JA-Ile nicht nur für die Induktion der eigenen Biosyntheseenzyme und Abwehrgene verantwortlich ist, sondern auch die Genexpression von *SAMT* aktiviert [Tieman *et al.*, 2010]. *SAMT* katalysiert die Umwandlung von SA in MeSA, was als systemisches Signal der SAR dient. Hohe Konzentrationen des Salicylestere könnten so in distales, anliegendes Gewebe gelangen und dort

in Form von SA den SA-induzierten Zelltod fördern, der das Wachstum des nekrotrophen Pilzes begünstigt [Rao & Davis, 1999].

Ein weiteres Indiz für das schnellere Wachstum des Pilzes lieferten Metabolomanalysen der MJE-RNAi-Linien mittels LC-MS. Anhand der Studien konnte ein Marker für das Pilzwachstum identifiziert werden, der in den MJE-RNAi-Linien in 2-fach höherer Konzentration detektiert wurde. Durch Analyse von fungalen Hyphen, die auf Agarplatten angezogen wurden, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um einen pflanzlichen Marker handelte. Die identifizierte Substanz hat eine Elementarzusammensetzung mit der Summenformel $C_{26}H_{50}O_8$. Damit ist auszuschließen, dass es sich hierbei um Oxalsäure oder Sklerin, welches Nekrosen induziert, handelt [Findling *et al.*, 2012 submitted].

Jedoch bleibt fraglich, was die Ursache für die erhöhte Empfindlichkeit der Linien für den Pathogenbefall mit *S. sclerotiorum* ist. Die Ursache könnte auf der mangelnden Spezifität der MeJA-Esterase beruhen, die zu einer Störung des endogenen Hormongleichgewichtes führen könnte. MJE hydrolysiert neben MeJA auch MeSA. Tiemann *et al.*, 2010 spekulierten, dass die Methylierung als Mechanismus zur Regulation der Hormonlevel dient. Basierend auf dieser Theorie und der abnehmenden Hormonkonzentration ausgehend vom Entstehungs- zum Wirkort, könnte die Modifizierung der MJE zu einer Störung des MeSA- und SA-Gleichgewichtes führen. Durch verstärkte Hydrolyse von MeSA am Infektionsort könnten SA-Spiegel erreicht werden, die zu einer Induktion des lokalen PCD führen, zudem könnten höhere MeSA-Konzentrationen innerhalb den MJE-RNAi-Linien in den anliegenden Bereichen des Pflanzengewebes zu einer Induktion der SAR führen, die letztlich ebenfalls in der Induktion des PCD resultiert. Diese Hypothese, wird durch die Analyse der SA-Level der MJE-OE-Linien bekräftigt. Basal, sowie nach Verwundung waren höhere SA-Konzentrationen der Transgenen zu detektieren (siehe Anhang 11.2.1.7). Daher sollten weitere Studien auch die SA-Level nach Pathogenbefall analysieren. Erste Studien (Anhang 11.4.21) deuten auf einen stärkeren SA-Anstieg in MJE-OE-Linien nach Pathogenbefall hin.

Aus den Ergebnissen der Studie lässt sich zudem keine Korrelation der Jasmonatspiegel und der Geninduktion erkennen, die eine erhöhte Empfindlichkeit der transgenen Linien durch eine verminderte Induktion von Abwehrprozessen erklärt. Was letztlich

verantwortlich für die Suszeptibilität ist, bleibt unklar, jedoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Erklärung nicht allein in der Jasmonat-vermittelten Abwehrreaktion gegenüber nekrotrophen Pathogenen zu finden ist, sondern eher in der Interaktion des JA-Biosyntheseweges mit anderen Hormonen, Transkriptionsfaktoren oder Signalwegen oder einer Infektionsstrategie des Pilzes die zur Supprimierung einer Abwehrreaktion führt. Jedoch könnte auch eine JA-Ile-vermittelte Aktivierung von Abwehrgenen, welche sich negativ auf die Pathogenresistenz auswirken, der Grund für die verminderte Pathogenresistenz sein. Festzuhalten ist, dass sich die Modifikation des Gleichgewichtes der reversiblen Methylierung negativ auf die Pathogenresistenz gegenüber *S. sclerotiorum* auswirkt, was sich Anhand der Größe der Läsionen und Wachstum des Pilzes manifestierte.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit konnten erfolgreich transgene Linien zur Überexpression der *JMT* und der *MJE* sowie zum *Knock down* der *MJE* hergestellt werden, die verminderte bzw. erhöhte Transkriptspiegel dieser Enzyme zeigen.

Die Analyse der *in vitro* Hydrolyseaktivität zeigte eine eindeutig höhere Aktivität der *MJE*-OE-Linien, sowie eine reprimierte Aktivität der RNAi-Linien. Da der verminderte *MJE*-Transkriptlevel nicht direkt mit der Reduzierung der Hydrolyseaktivität korreliert, ist zwar anzunehmen, dass es sich um die primäre *MJE* handelte, allerdings bleibt nicht auszuschließen, dass weitere redundante Esterasen mit MeJA-Hydrolyseaktivität existieren.

Anhand der *MJE*-RNAi-Linien mit reduzierter MeJA-Hydrolyse-Aktivität wurden Studien zur Klärung der biologischen Aktivität von MeJA durchgeführt. Allerdings konnte weder anhand der MeJA-Applikationsversuche über die Gasphase noch über die wässrige Phase herausgefunden werden, ob MeJA andere biologische Aktivitäten als JA bzw. JA-Ile aufweist.

Auch Verwundungsexperimente, die zur Aufklärung der Funktion von MeJA als transzelluläres oder systemisches Signal dienten, lieferten kein Indiz dafür, dass MeJA als solches agiert, noch belegen sie eine Involvierung der *MJE* in der Perzeption eines systemischen Signals.

Pathogenexperimente mit dem nekrotrophen Pilz *S. sclerotiorum* belegen jedoch eine erhöhte Suszeptibilität aller Linien mit Veränderungen der reversiblen Methylierung. Alle Linien wiesen größere Läsionen und ein verstärktes Pilzwachstum auf. Interessanterweise war nach Pathogenbefall keine JA zu detektieren, jedoch zeigten alle Linien eine deutlich höhere Akkumulation des biologisch aktiven Metaboliten JA-Ile, sowie erhöhte Konzentrationen des inaktiven Jasmonats 12-OH-JA-Ile. Ungewöhnlich scheint die mangelnde Korrelation der JA-Ile Spiegel mit der Genexpression des JA-Biosyntheseenzym *AOC* und des spät-responsiven Abwehrgens *PINII*. Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Akkumulation der Jasmonate wahrscheinlich auf den induzierten Zelltod und den damit verbundenen Membranzusammenbruch zurückzuführen ist und zur Vermutung, dass *S. sclerotiorum* Strategien entwickelt hat, eine starke Expression von JA-Abwehrgenen trotz JA-Ile-Bildung zu unterdrücken.

Weiterhin konnte ein Einfluss auf die Keimungsrate festgestellt werden, da die meisten transgenen Linien eine verringerte Keimung aufwiesen. Zudem konnten Veränderungen des vegetativen Wachstums beobachtet werden. MJE-OE-Linien wiesen ein zur Vergeilung neigendes Wachstum auf, wohingegen die JMT-OE-Linien ein gegensätzliches, gedrungenes Wachstum zeigten.

Trotz Analyse der *in vitro* MJE-Hydrolyseaktivität, die darauf hindeutet, dass die MJE die primäre MeJA-hydrolysierende-Esterase darstellt, bleibt jedoch ihre *in vivo* Funktion fraglich. Zum einen konnte in den transgenen Linien -selbst in den MJE-RNAi-Linien- basal und nach Stressinduktion- kein MeJA detektiert werden, zum anderen konnte keine verminderte Sensitivität der MJE-RNAi-Linien nach MeJA-Applikation festgestellt werden. Auch schien die MJE keine Rolle in der Verwundungsreaktion zu spielen. Dies und die Ergebnisse der Pathogenexperimente lassen vermuten, dass die MJE *in vivo* eine andere Funktion als die Hydrolyse von MeJA ausübt. Die mangelnde Substratspezifität, wie sie auch für die Superfamilie der Esterasen in *Arabidopsis* gezeigt wurde, lässt vermuten, dass die MJE eventuell andere Ester hydrolysiert. Die Hydrolyse von MeSA, OPDA-Me, ABA-Me oder BA-Me könnte so zu einer Veränderung der Hormonhomöostase führen, die sich auf Abwehrreaktionen wie die Pathogenabwehr nekrotropher Pilze auswirkt.

Vielversprechend ist daher die weiterführende Analyse der Phytohormone nach *S. sclerotiorum* Behandlung, sowie auch die Reaktion auf die Infektion *in vivo* nachvollzogen werden sollte. Erste Versuche der Pathogenbehandlung mit *S. sclerotiorum* im Hintergrund der transgenen OPR3-Luc-Linien belegen die Induzierbarkeit des Promotors hinsichtlich des Stimulus. Anhand der klonierten VIGS-Vektoren (Diplomarbeit Katharina Maaser) zum transienten *Knock down* der JMT und MJE könnte der Einfluss der reversiblen Methylierung auf die Pathogenresistenz gegenüber *S. sclerotiorum* nachvollzogen werden. Aufgrund der Einfachheit des Systems sollten auch Vorexperimente mit anderen nekrotrophen Pilzen durchgeführt werden, um u. a. optimale Zeitpunkte für die Induktion JA-responsiver-Gene zu bestimmen. Die zeitabhängige Induktion des JA-responsiven-Promotors liefert wichtige Einblicke bezüglich der Involvierung des JA-Bioytheseweges in den verschiedenen Stadien der Pathogenese, was das Verständnis der Pathogenabwehr erleichtert.

Weiterhin sollten andere Stimuli im Hintergrund der transgenen Linien getestet werden bei denen der JA-Biosyntheseweg essentiell für eine Abwehrreaktion ist. Hierfür würde sich der Herbivorbefall z.B. mit *Lacanobia (Diataraxia) oleracea*, *Spodoptera exigua* oder die Behandlung mit bakteriellen Pathogenen wie *Pseudomonas syringae pv. tomato* anbieten.

Da zudem ein Einfluss der reversiblen Methylierung auf die Keimung zu verzeichnen war und hohe Oxylipinspiegel in Samen und Blüten zu detektieren sind, sollte auch der Einfluss der reversiblen Methylierung auf Keimung und Blütenentwicklung weiterhin untersucht werden. Hier wäre es zudem sinnvoll die OPDA-Spiegel und die des korrespondierenden Esters zu detektieren. Neuere Studien belegen die Involvierung des JA-Vorläufers in der Keimung von *S. lycopersicum* [Wasternack *et al.*, 2012]. Die Störung des Gleichgewichts zwischen der biologisch aktiven OPDA und dem inaktivem Metabolit OPDA-Me in den MJE-RNAi- und MJE-OE-Linien könnte ebenfalls Grund für die reduzierte Keimungsrate sein.

9 Abkürzungsverzeichnis

ACX1.....	Acyl-CoA-Oxidase
AOC	Allenoxidcyclase
AOS.....	Allenoxidsynthase
BAP.....	Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
c.....	Konzentration
CCD.....	charge coupled device
cDNA	complementary DNA
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CoA.....	Coenzym A
cm.....	Zentimeter
C _t	Cycle treshold
CTAB.....	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tag
Da	Dalton
DEPC.....	Desoxyribonucleinsäure
dhJA.....	Dihydro-Jasmonsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dnOPDA.....	Dinor-OPDA
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA.....	doppelsträngige RNA
E	Extinktion
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure / Ethylendiamintetraacetat
EF-1 α	Elongationsfaktor-1 α
EOT.....	Epoxyoctadecatriensäure
ESI.....	Elektrospray Ionisation
<i>et al.,</i>	<i>et alii</i>

EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ev	(Leervektor)kontrolllinie
fg.....	Femtogramm
for	forward
Fw	Frischgewicht (engl.: fresh weight)
g.....	Gramm
h.....	Stunde
HPOT.....	Hydroperoxyoctadecatriensäure
hpRNA.....	hairpin RNA
Hz.....	Hertz
Ile.....	Isoleucin
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	Jasmonsäureisoleucin
JAR1	Jasmonate Resistant 1
JMT	Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferase
k.....	Kilo
KAT.....	L3-Keto-Acyl-CoA Thiolase
kat.....	Katal
kb.....	Kilo-Basen
l.....	Liter
LOX	Lipoxygenase
LUC	Luziferase
m.....	Milli
M	Molar
M-MLV.....	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MeJA.....	Methyljasmonat
MeOH	Methanol
MFP.....	Multifunktionelles Protein
min.....	Minute
MJE	Methyljasmonatesterase
mRNA.....	messenger RNA

MS	Massenspektrometer
n	Nano
NVA	Norvalin
OD	Optische Dichte
OPC-6	3-Oxo-2-(2'[Z]-Pentenyl)-Cyclopentan-1-Hexansäure
OPC-8	3-Oxo-2-(2'[Z]-Pentenyl)-Cyclopentan-1-Octansäure
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure
OPR3.....	OPDA-Reduktase3
p	Piko
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH.....	pondus hydrogenii
PINII.....	Proteinase-InhibitorII
PTGS	Post transcriptional gene silencing
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm.....	Umdrehungen pro Minute (engl.:revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s.....	Sekunden
SA	Salicylsäure
SAM.....	S-Adenosyl-Methionin
ssRNA	einzelsträngige RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE.....	Tris-EDTA
tRNA.....	Transfer RNA
ÜN	Übernacht
UPLC.....	Ultra performance Liquid Chromatography
UV.....	Ultraviolett
v.....	Volumen
V	Volt
VIGS.....	Virus induced gene silencing
Wt.....	Wildtyp
z.....	Ladungszahl

9.1 Glossar

- acx1**S. lycopersicum* EMS-Mutante mit Defekt der Acyl-CoA-Oxidase (1ter Schritt der β -Oxidation von OPDA)
- COI1(coronatine insensitive) F-Box Protein, putativer JA-Ile-Rezeptor
- jai1*(*S. lycopersicum*) Ortholog zu *A. thaliana coi1*
- JAZ(jasmonate ZIM domain) Transkriptions-Repressoren
- SCF^{COI}(Skp/Cullin/F-Box) vermittelt Ubiquitin abhängige Degradation derJAZ-Repressoren
- spr2**S. lycopersicum* EMS-Mutante mit Defekt der Fettsäure-Desaturase(Pflanzen sind 18:3 und 16:3 defizient)

10 Literaturverzeichnis

- Abuqamar, S., Chai, M. F., Luo, H., Song, F., Mengiste, T. (2008).** Tomato protein kinase 1b mediates signaling of plant responses to necrotrophic fungi and insect herbivory. *Plant Cell*, 20(7), 1964-1983.
- Aldridge D. C., Galt S., Giles D., Turner W.B. (1971).** Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae* Imperial Chemical Industries Limited, 1623-1627
- Ament, K., Kant, M. R., Sabelis, M. W., Haring, M. A., Schuurink, R. C. (2004).** Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiol*, 135(4), 2025-2037.
- Ayers, W. A., & Adams, P. B. (1979).** Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotinia* and *Sclerotium* species by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Can J Microbiol*, 25(1), 17-23.
- Bateman, D. F., & Beer, S. V. (1965).** Simultaneous Production and Synergistic Action of Oxalic Acid and Polygalacturonase during Pathogenesis by *Sclerotium Rolfsii*. *Phytopathology*, 55, 204-211.
- Birkett, M. A., Campbell, C. A., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Hick, A. J., Martin, J. L., Woodcock, C. M. (2000).** New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(16), 9329-9334.
- Boland G.J., Hall, R. (1994).** Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 16, 93–108.
- Bolton, M. D., Thomma, B. P., Nelson, B. D. (2006).** *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol*, 7(1), 1-16.

- Bostock, R. M. (2005).** Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 545-580.
- Boughton A. J., Hoover K., Felton G.W. (2006).** Impact of chemical elicitor applications on greenhouse tomato plants and population growth of the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 120, 175–188.
- Boughton, A. J., Hoover, K., & Felton, G. W. (2005).** Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *J Chem Ecol*, 31(9), 2211-2216.
- Bradford M.M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Brash, A. R., Baertschi, S. W., Ingram, C. D., & Harris, T. M. (1988).** Isolation and characterization of natural allene oxides: unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(10), 3382-3386.
- Breithaupt, C., Kurzbauer, R., Lilie, H., Schaller, A., Strassner, J., Huber, R., . Clausen, T. (2006).** Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: self-inhibition by dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(39), 14337-14342.
- Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B., Low, P. S. (2000).** Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell*, 12(11), 2191-2200.
- Chen, G., Hu, Z., & Grierson, D. (2008).** Differential regulation of tomato ethylene responsive factor *LeERF3b*, a putative repressor, and the activator Pti4 in ripening mutants and in response to environmental stresses. *J Plant Physiol*, 165(6), 662-670.

- Cipollini, D. (2007).** Consequences of the overproduction of methyl jasmonate on seed production, tolerance to defoliation and competitive effect and response of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 173(1), 146-153.
- Creelman, R. A., Tierney, M. L., Mullet, J. E. (1992).** Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), 4938-4941.
- Dathe W., Schindler C., Schneider G., Schmidt J., Porzel A., Jensen E., Yamaguchi I. (1991).** Curcubic acid and its 6,7,-stereoisomers. *Phytochemistry*, 30 (6), 1909–191.
- Dathe W., Rönsch H., Preiss A., Schade W., Sembdner G., Schreiber K. (1981).** Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-Jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp, *Planta* 155, 530-535.
- Demole E., Lederer E., Mercier D. (1962).** Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin, *Helvetica et Chimica Acta* 45 675-685
- Dickman, M.B. and Mitra, A. (1992).** *Arabidopsis thaliana* as a model for studying *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41, 255–263
- El Oirdi, M., El Rahman, T. A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M. C., Daayf, F., Bouarab, K. (2011).** *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell*, 23(6), 2405-2421.
- Falkenstein E., Groth B., Mithöfer A., Weiler E.W. (1991).** Methyljasmonate and α -linolenic acid are potent inducer of tendril coiling. *Planta* 185, 316–322.

Farmer, E. E. (2001). Surface-to-air signals. *Nature*, 411(6839), 854-856.

Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19), 7713-7716.

Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, 4(2), 129-134.

Favaron, F., Sella, L., D'Ovidio, R. (2004). Relationships among endopolygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Mol Plant Microbe Interact*, 17(12), 1402-1409.

Felix G., Boller T. (1995). Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. *The Plant Journal* 7 (3), 381–389.

Feys, B., Benedetti, C. E., Penfold, C. N., Turner, J. G. (1994). *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin Coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*, 6(5), 751-759.

Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature chemical biology*, 5(5), 344-350.

Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486 (7402), 228-232.

- Glazebrook, J. (2005).** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology*, 43, 205-227.
- Gleave, A. P. (1992).** A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol*, 20(6), 1203-1207.
- Godoy G., Steadman J.R., Dickman M.B., Dam R. (1990).** Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37, 179–191
- Goetz, S., Hellwege, A., Stenzel, I., Kutter, C., Hauptmann, V., Forner, S., Hause, B. (2012).** Role of cis-12-oxo-phytodienoic acid in tomato embryo development. *Plant Physiol*, 158(4), 1715-1727.
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000).** The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol*, 10(13), 751-757.
- Green, T. R., & Ryan, C. A. (1972).** Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against Insects. *Science*, 175(4023), 776-777.
- Guimaraes, R. L., & Stotz, H. U. (2004).** Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiol*, 136(3), 3703-3711.
- Guranowski, A., Miersch, O., Staswick, P. E., Suza, W., Wasternack, C. (2007).** Substrate specificity and products of side-reactions catalyzed by jasmonate:amino acid synthetase (JAR1). *FEBS Lett*, 581(5), 815-820.
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M., Zenk, M.H. (1992).** Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 2389-2393.

- Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Miersch, O., Wasternack, C. (2003).** Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant Cell Physiol*, 44(6), 643-648.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J., & Wasternack, C. (2000).** Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant J*, 24(1), 113-126.
- Hegedus, D. D., & Rimmer, S. R. (2005).** *Sclerotinia sclerotiorum*: when "to be or not to be" a pathogen? *FEMS Microbiol Lett*, 251(2), 177-184.
- Heil, M., & Ton, J. (2008).** Long-distance signalling in plant defence. *Trends Plant Sci*, 13(6), 264-272.
- Herde O., Pena-Cortes H., Willmitzer L., Eisahn J. (1997).** Stomatal responses to jasmonic acid, linolenic acid and abscisic acid in wild-type and ABA-deficient tomato plants. *Plant, Cell and Environment* 20, 136-141.
- Hyun, Y., Choi, S., Hwang, H. J., Yu, J., Nam, S. J., Ko, J., Lee, I. (2008).** Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Dev Cell*, 14(2), 183-192.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., Okada, K. (2001).** The DEFECTIVE IN ANTHOR DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell*, 13(10), 2191-2209.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006).** The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.

- Karban R., Baldwin I.T. (2000).** Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia* 125, 66-71
- Koch, T, Bandemer K, Boland, W. (1997).** Biosynthesis of cis-jasmone. A pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? *Helvetica Chimica Acta* 80, 838-850
- Koo, A. J., Cooke, T. F., Howe, G. A. (2011).** Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(22), 9298-9303.
- Koo, A. J., Gao, X., Jones, A. D., Howe, G. A. (2009).** A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J*, 59(6), 974-986.
- Koo, A. J., & Howe, G. A. (2009).** The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1571-1580.
- Kuppusamy, K. T., Walcher, C. L., Nemhauser, J. L. (2009).** Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Mol Biol*, 69(4), 375-381.
- Le Tourneau, D. (1979).** Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology*, 69, 887-890.
- Lee, G. I., & Howe, G. A. (2003).** The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant J*, 33(3), 567-576.

- Li, C., Liu, G., Xu, C., Lee, G. I., Bauer, P., Ling, H. Q., Howe, G. A. (2003).** The tomato suppressor of prosystemin-mediated responses2 gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Cell*, 15(7), 1646-1661.
- Li, C., Schillmiller, A. L., Liu, G., Lee, G. I., Jayanty, S., Sageman, C., Howe, G. A. (2005).** Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell*, 17(3), 971-986.
- Li, L., & Howe, G. A. (2001).** Alternative splicing of prosystemin pre-mRNA produces two isoforms that are active as signals in the wound response pathway. *Plant Mol Biol*, 46(4), 409-419.
- Li, L., Li, C., Lee, G. I., & Howe, G. A. (2002).** Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(9), 6416-6421.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., Whalon, M. E., .Howe, G. A. (2004).** The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell*, 16(1), 126-143.
- Liechti, R., & Farmer, E. E. (2002).** The jasmonate pathway. *Science*, 296(5573), 1649-1650.
- Liu, Y., Schiff, M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2002).** Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J*, 31(6), 777-786.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J. J., Solano, R. (2003).** ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, 15(1), 165-178.

- McCormic S., Niedermeyer J., Fry J., Barnson A., Horsch, R., Fraley R. (1986).** Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 5, 81-84
- McGurl, B., Pearce, G., Ryan, C. A. (1994).** Polypeptide signalling for plant defence genes. *Biochem Soc Symp*, 60, 149-154.
- Mielke, K., Forner, S., Kramell, R., Conrad, U., Hause, B. (2011).** Cell-specific visualization of jasmonates in wounded tomato and *Arabidopsis* leaves using jasmonate-specific antibodies. *New Phytol*, 190(4), 1069-1080.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., Wasternack, C. (2008).** Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol*, 177(1), 114-127.
- Miersch, O., & Wasternack, C. (2000).** Octadecanoid and jasmonate signaling in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves: endogenous jasmonates do not induce jasmonate biosynthesis. *Biol Chem*, 381(8), 715-722.
- Miersch, O., Weichert, H., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Feussner, I., Wasternack, C. (2004).** Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus) elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves. *Phytochemistry*, 65(7), 847-856.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273.

Nakamura, Y., Mithofer, A., Kombrink, E., Boland, W., Hamamoto, S., Uozumi, N., Ueda, M. (2011). 12-hydroxyjasmonic acid glucoside is a COI1-JAZ-independent activator of leaf-closing movement in *Samanea saman*. *Plant Physiol*, 155(3), 1226-1236.

Nakamura Y., Matsubara A., Miyatake R., Okada M., Ueda M. (2006). Bioactive substances to control nyctinasty of *Albizia* plants and its biochemistry. *Regulation of Plant Growth & Development* 41(Supplement): 44.

Narvaez-Vasquez, J., Florin-Christensen, J., Ryan, C. A. (1999). Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell*, 11(11), 2249-2260.

Noyes, R.D. & Hancock, J.G. (1981). Role of oxalic acid in the *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Physiol. Plant Pathol.* 18, 123-132.

O'Donnell, P. J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J. B., Klee, H. J. (2003). Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiol*, 133(3), 1181-1189.

Ohme-Takagi, M., & Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7(2), 173-182.

Orozco-Cardenas, M. L., Narvaez-Vasquez, J., Ryan, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell*, 13(1), 179-191.

Park, S. W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D. F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318(5847), 113-116.

- Pedras, M. S., & Ahiahonu, P. W. (2004).** Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Chem Ecol*, 30(11), 2163-2179.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S. C. (2009).** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol*, 5(5), 308-316.
- Qunkert, G., Adam, F., Dürner, G. (1982).** Asymmetrische Synthese von Methyljasmonat. *Angew. Chem.*, 94, 866–867.
- Rao, M. V., & Davis, K. R. (1999).** Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J*, 17(6), 603-614.
- Reumann, S. (2004).** Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant Physiol*, 135(2), 783-800.
- Rojo, E., Leon, J., and Sanchez-Serrano, J.J. (1999).** Cross-talk between wound signaling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 20, 135–142.
- Ryan, C. A. (2000).** The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et biophysica acta*, 1477(1-2), 112-121.
- Ryan, C. A., & Moura, D. S. (2002).** Systemic wound signaling in plants: a new perception. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(10), 6519-6520.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I., Estelle, M. (2009).** Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol*, 5(5), 301-307.

- Sato, C., Aikawa, K., Sugiyama, S., Nabeta, K., Masuta, C., Matsuura, H. (2011).** Distal transport of exogenously applied jasmonoyl-isoleucine with wounding stress. *Plant & cell physiology*, 52(3), 509-517.
- Schaller, A., & Oecking, C. (1999).** Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell*, 11(2), 263-272.
- Schaller, F., Biesgen, C., Mussig, C., Altmann, T., Weiler, E. W. (2000).** 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*, 210(6), 979-984.
- Schilmiller, A. L., & Howe, G. A. (2005).** Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol*, 8(4), 369-377.
- Sembner G, Parthier B, (1993).** The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates . *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 569-859
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., Choi, Y. D. (2001).** Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8), 4788-4793.
- Shockey, J. M., Fulda, M. S., & Browse, J. (2003).** *Arabidopsis* contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme a synthetases. *Plant Physiol*, 132(2), 1065-1076.
- Sivasankar, S., Sheldrick, B., & Rothstein, S. J. (2000).** Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol*, 122(4), 1335-1342.

- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., Ecker, J. R. (1998).** Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev*, 12(23), 3703-3714.
- Song M.S., Kim D.G., Lee S.H. (2005).** Isolation and characterization of a jasmonic acid carboxyl methyltransferase from Hot Pepper (*Capsicum annuum L.*). *J Plant Biology*. 48(3), 292-297
- Spoel, S. H., Johnson, J. S., Dong, X. (2007).** Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(47), 18842-18847.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Pieterse, C. M. (2003).** NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, 15(3), 760-770.
- Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Pitzschke, A., Miersch, O., Ziegler, J., Wasternack, C. (2003).** Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *Plant J*, 33(3), 577-589.
- Stitz, M., Gase, K., Baldwin, I. T., Gaquerel, E. (2011).** Ectopic expression of AtJMT in *Nicotiana attenuata*: creating a metabolic sink has tissue-specific consequences for the jasmonate metabolic network and silences downstream gene expression. *Plant Physiol*, 157(1), 341-354.
- Stork, W., Diezel, C., Halitschke, R., Galis, I., Baldwin, I. T. (2009).** An ecological analysis of the herbivory-elicited JA burst and its metabolism: plant memory processes and predictions of the moving target model. *PLoS One*, 4(3), e4697.

- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U. B., Howe, G. A., Weiler, E. W., Amrhein, N., Schaller, A. (2002).** Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J*, 32(4), 585-601.
- Stratmann, J. W., & Ryan, C. A. (1997).** Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(20), 11085-11089.
- Stuhlfelder, C., Lottspeich, F., Mueller, M. J. (2002).** Purification and partial amino acid sequences of an esterase from tomato. *Phytochemistry*, 60(3), 233-240.
- Stuhlfelder, C., Mueller, M. J., Warzecha, H. (2004).** Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *European journal of biochemistry / FEBS*, 271(14), 2976-2983.
- Sun, J. Q., Jiang, H. L., & Li, C. Y. (2011).** Systemin/Jasmonate-mediated systemic defense signaling in tomato. *Mol Plant*, 4(4), 607-615.
- Suza, W. P., Rowe, M. L., Hamberg, M., Staswick, P. E. (2010).** A tomato enzyme synthesizes (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isooleucine in wounded leaves. *Planta*, 231(3), 717-728.
- Suza, W. P., & Staswick, P. E. (2008).** The role of JAR1 in Jasmonoyl-L-isooleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta*, 227(6), 1221-1232.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Ohta, H. (2005).** 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 139(3), 1268-1283.

- Tamogami, S., Rakwal, R., Agrawal, G. K. (2008).** Interplant communication: airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochem Biophys Res Commun*, 376(4), 723-727.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Browse, J. (2007).** JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661-665.
- Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F., & Cammue, B. P. (2001).** The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol*, 13(1), 63-68.
- Thorpe, M. R., Ferrieri, A. P., Herth, M. M., Ferrieri, R. A. (2007).** 11C-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta*, 226(2), 541-551.
- Tieman, D., Zeigler, M., Schmelz, E., Taylor, M. G., Rushing, S., Jones, J. B., Klee, H. J. (2010).** Functional analysis of a tomato salicylic acid methyl transferase and its role in synthesis of the flavor volatile methyl salicylate. *Plant J*, 62(1), 113-123.
- Tilton, G. B., Shockey, J. M., Browse, J. (2004).** Biochemical and molecular characterization of ACH2, an acyl-CoA thioesterase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 279(9), 7487-7494.
- Tournier, B., Sanchez-Ballesta, M. T., Jones, B., Pesquet, E., Regad, F., Latche, A., Bouzayen, M. (2003).** New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Lett*, 550(1-3), 149-154.

- Tu, J.C. (1985).** Tolerance of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) associated with tolerance to oxalic acid. *Physiol. Plant Pathol.* 26, 111–117.
- Vick, B. A., & Zimmerman, D. C. (1983).** The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochemical and biophysical research communications*, 111(2), 470-477.
- Vick, B. A., & Zimmerman, D. C. (1984).** Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol*, 75(2), 458-461.
- Vlot, A. C., Liu, P. P., Cameron, R. K., Park, S. W., Yang, Y., Kumar, D., Klessig, D. F. (2008).** Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 56(3), 445-456.
- Von Dahl, C. C., & Baldwin, I. T. (2004).** Methyl jasmonate and cis-jasmone do not dispose of the herbivore-induced jasmonate burst in *Nicotiana attenuata*. *Physiol Plant*, 120(3), 474-481.
- Wang, L., Allmann, S., Wu, J., Baldwin, I.T. (2008).** Comparisons of LIPOXYGENASE3- and JASMONATE-RESISTANT4/6-silenced plants reveal that jasmonic acid and jasmonic acid-amino acid conjugates play different roles in herbivore resistance of *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiol*, 146(3), 904-915.
- Wasternack, C. (2007).** Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of botany*, 100(4), 681-697.
- Wasternack, C., Forner, S., Strnad, M., Hause, B. (2012).** Jasmonates in flower and seed development. *Biochimie*.

- Wasternack, C., & Hause, B. (2002).** Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 72, 165-221.
- Wasternack, C., & Kombrink, E. (2010).** Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chem Biol*, 5(1), 63-77.
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Miersch, O. (2006).** The wound response in tomato--role of jasmonic acid. *J Plant Physiol*, 163(3), 297-306.
- Weber, H., Vick, B. A., Farmer, E. E. (1997).** Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19), 10473-10478.
- Wu Y., Zhang D., Chu J.Y., Boyle P., Wang Y., Brindle I.D., De Luca V., Despres C. (2012).** The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Reports* 1, 1-9.
- Wu, J., Wang, L., & Baldwin, I. T. (2008).** Methyl jasmonate-elicited herbivore resistance: does MeJA function as a signal without being hydrolyzed to JA? *Planta*, 227(5), 1161-1168.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T. M., Kleier, D. A., Raskin, I. (1991).** Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell*, 3(8), 809-818.
- Yang, Y., Xu, R., Ma, C. J., Vlot, A. C., Klessig, D. F., Pichersky, E. (2008).** Inactive methyl indole-3-acetic acid ester can be hydrolyzed and activated by several esterases belonging to the *AtMES* esterase family of Arabidopsis. *Plant Physiol*, 147(3), 1034-1045.

Yoshihara T., Omer E-L.A., Koshino H., Sakamura S., Kikuta Y., Koda Y. (1989). Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agriculture & Biological Chemistry* 53, 2835–2837.

Ziegler, J., I. Stenzel, B. Hause, H. Maucher, M. Hamberg, R. Grimm, M. Ganai, and C. Wasternack. (2000). Molecular cloning of allene oxide cyclase. The Enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J Biol Chem* 275, (25), 19132-19138.

Zimmermann, M. R., H. Maischak, A. Mithofer, W. Boland, and H. H. Felle. (2009). System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, Induced by wounding. *Plant Physiol* 149 (3), 1593-600.

Bücher:

Pfitzner J.P. (1998) Methods in Molecular Biology Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance Volume 81, 359-363

Schopfer, P.Brennicke A. (2010). Pflanzenphysiologie, Spektrum, 7. Aufl. **ISBN:978-3-8274-2351-1**

Webquellen:

[<http://www.sclerotia.org>]

[<http://www.pi.csiro.au/RNAi/vectors.htm>]

Dissertationen/ Diplomarbeiten/ Bachelorarbeiten:

Dissertation Stuhlfelder (2004)

Bachelorarbeit Stephanie Müller (2011)

Diplomarbeit Stefan Müller (2005)

Diplomarbeit Henrik Brandt (2011)

Diplomarbeit Katharina Maaser (2011)

11 Anhang

11.1 Bestimmung der MJE-Hydrolyseaktivität transgener Linien

11.1.1 MJE-OE-Linien

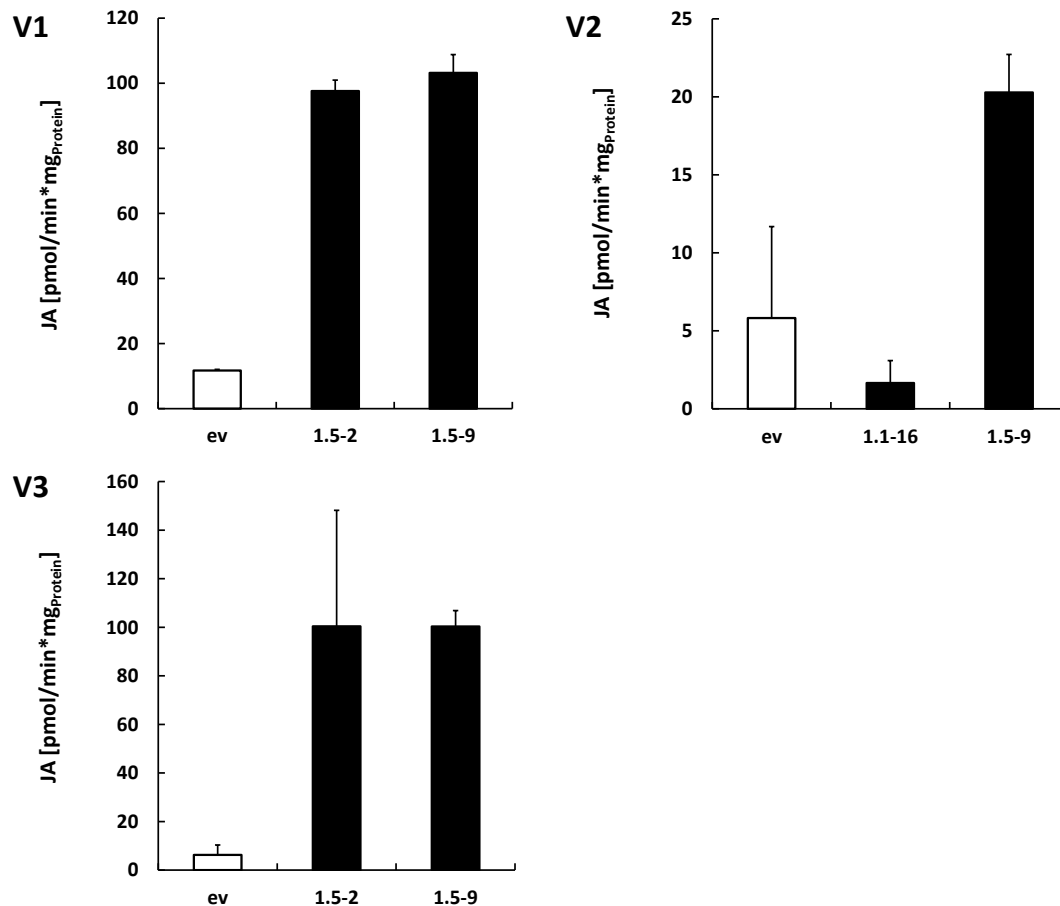


Abbildung 49: Hydrolyseaktivität der MJE-OE-Linien 1.5-2, 1.5-9 und 1.1-16

Abgebildet ist der Mittelwert der katalytischen MJE-Aktivität berechnet aus drei technischen Replikaten +STABW. ev = Kontrolllinie

Linie	JA [pmol/min*mg _{Protein}]			% Hydrolyseaktivität	n
	V1	V2	V3		
ev	11,7	5,8	6,2	100	3
1.5-2	97,6	-	100,4	1220	3
1.5-9	103,2	20,3	100,4	945	3
1.1-16	-	1,7	-	14	3

11.1.2 MJE-RNAi Linien

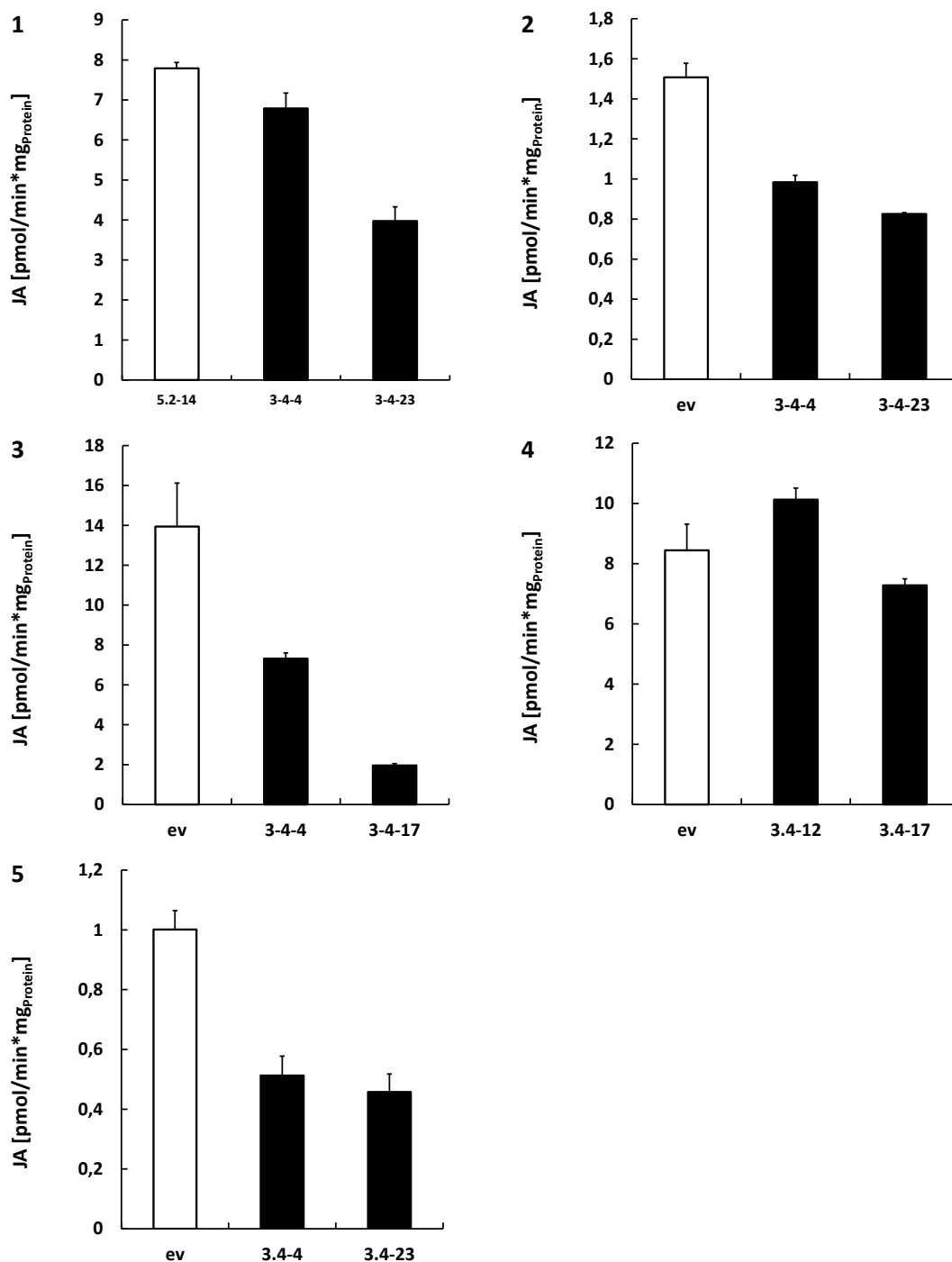


Abbildung 50: MeJA-Hydrolyseaktivität der MJE-RNAi Linien 3.4-4, 3.4-12, 3.4-17 und 3.4-23

Dargestellt ist der Mittelwert der Hydrolyseaktivität berechnet aus 3 technischen Replikaten +STABW

Linie	JA [pmol/min*mg _{Protein}]					% Hydrolyseaktivität	n
	V1	V2	V3	V4	V5		
ev	7,8	1,51	13,94	8,44	1,00	100	3
3.4-4	6,8	0,98	7,32	-	0,51	64,03	3
3.4-12	-	-	-	10,13	-	119,94	3
3.4-23	3,9	0,83	-	-	-	52,88	3
3.4-17	-	-	1,95	7,28	0,46	48,65	3

11.2 Verwundung lokal

11.2.1 MJE-OE-Linien

11.2.1.1 AOC-Expression

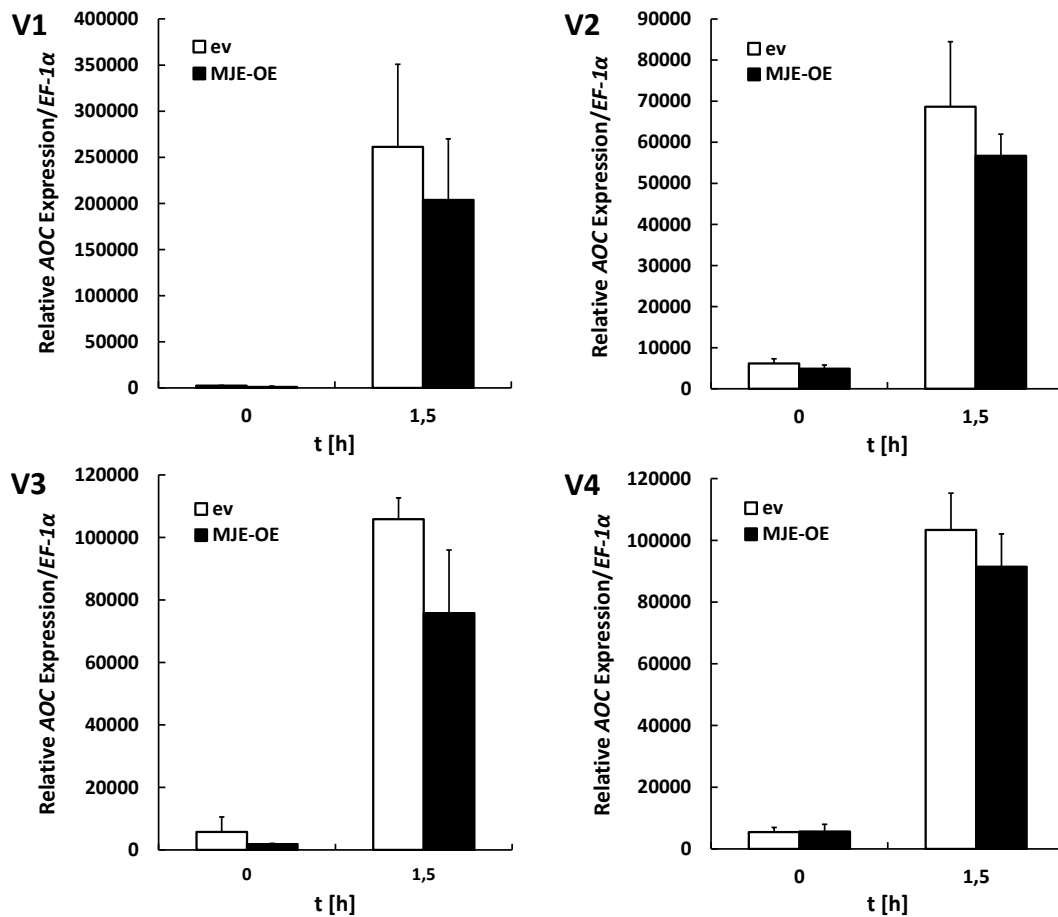


Abbildung 51: Lokale Genexpression von AOC in MJE-OE-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

AOC	ev		MJE-OE		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	2554	261301	1117	203773	3
V2	6159	68656	4900	56712	5
V3	5732	105847	1827	75768	5
V4	5456	103382	5608	91456	5

11.2.1.2 *PINII*-Expression

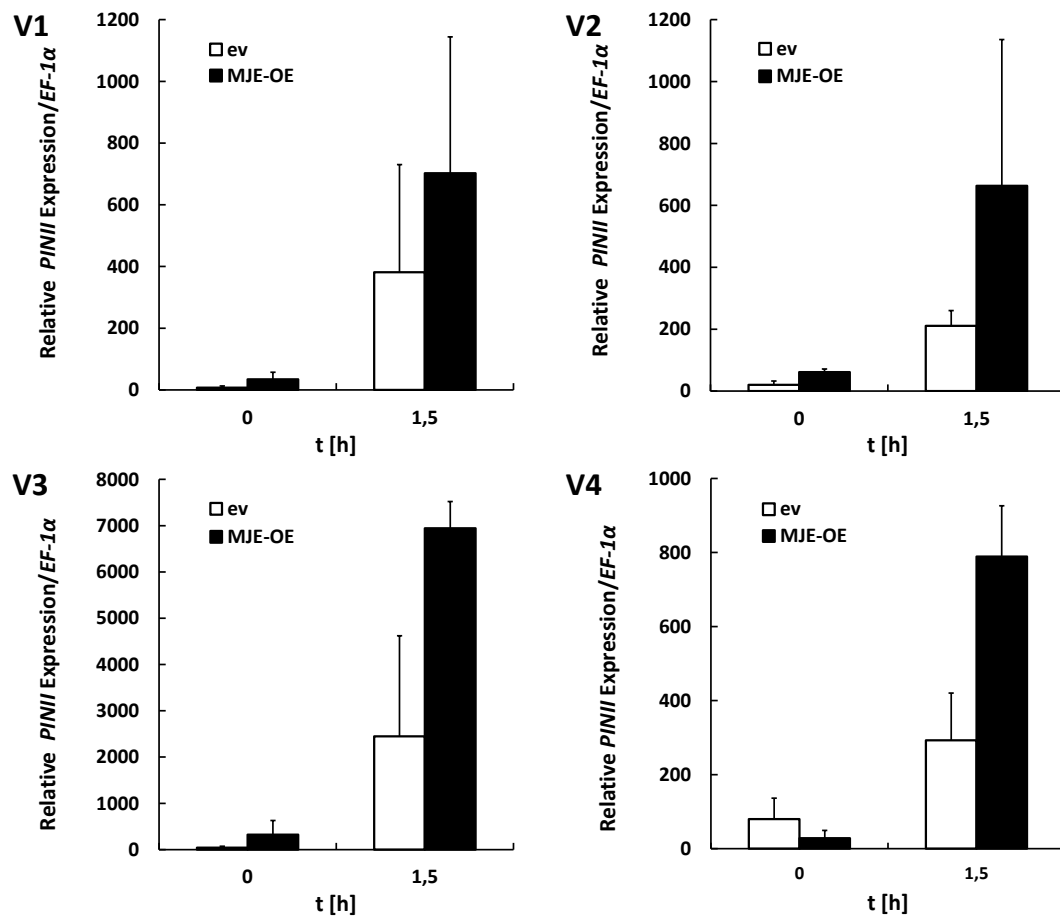


Abbildung 52: : Lokale Genexpression von *PINII* in MJE-OE-Linien nach Verwendung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

<i>PINII</i>	ev		MJE-OE		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	7	381	34	702	3
V2	20	211	61	663	5
V3	80	293	28	789	5
V4	42	2447	324	6944	5

11.2.1.3 JA-Spiegel

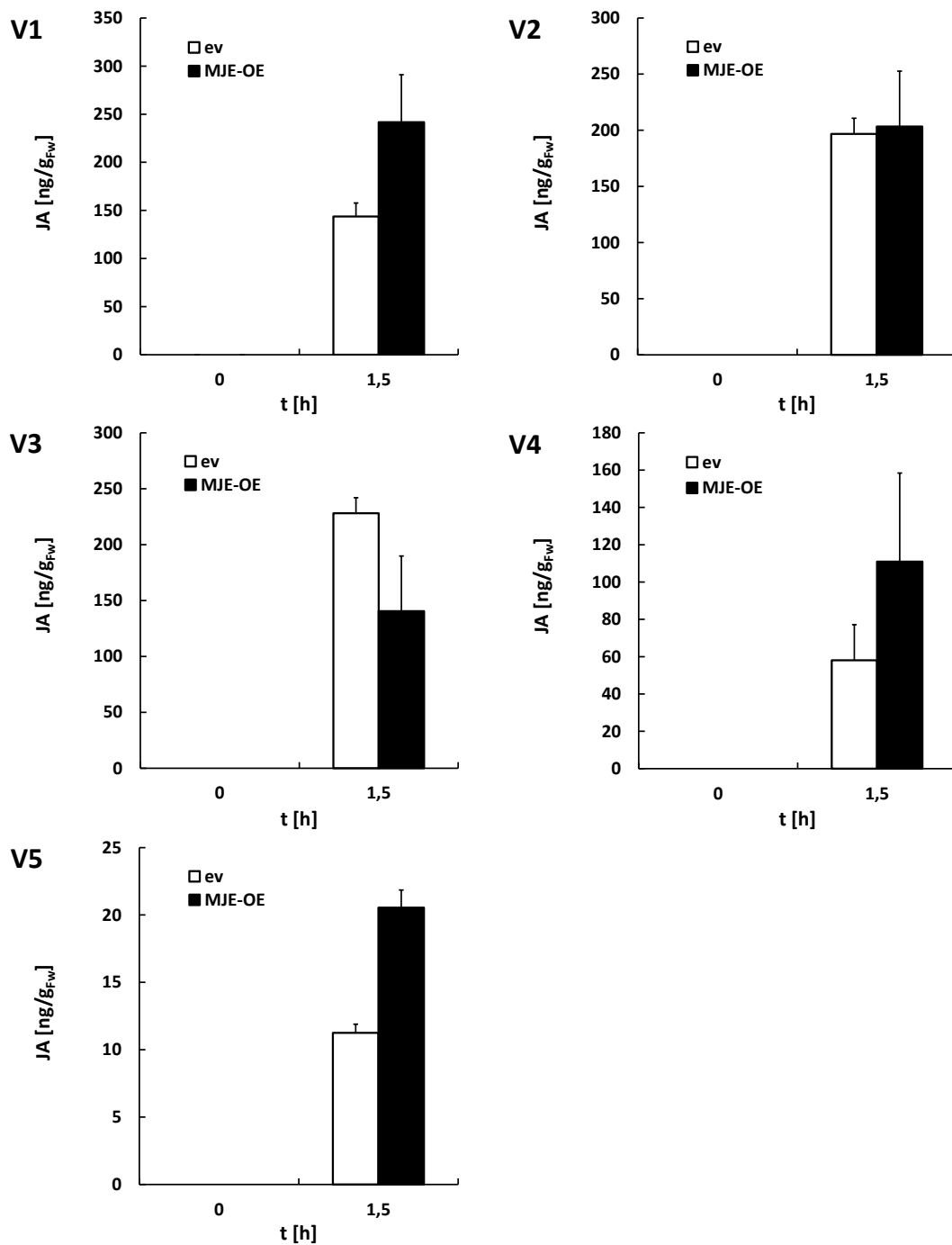


Abbildung 53: JA-Akkumulation in MJE-OE-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

JA [ng/gFw]	ev		MJE-OE		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	n.d.	143,73	n.d.	241,74	5
V2	n.d.	196,77	n.d.	203,33	5
V3	n.d.	228,04	n.d.	140,45	5
V4	n.d.	58,04	n.d.	110,95	4
V5	n.d.	10,25	n.d.	20,54	3

11.2.1.4 JA-Ile-Spiegel

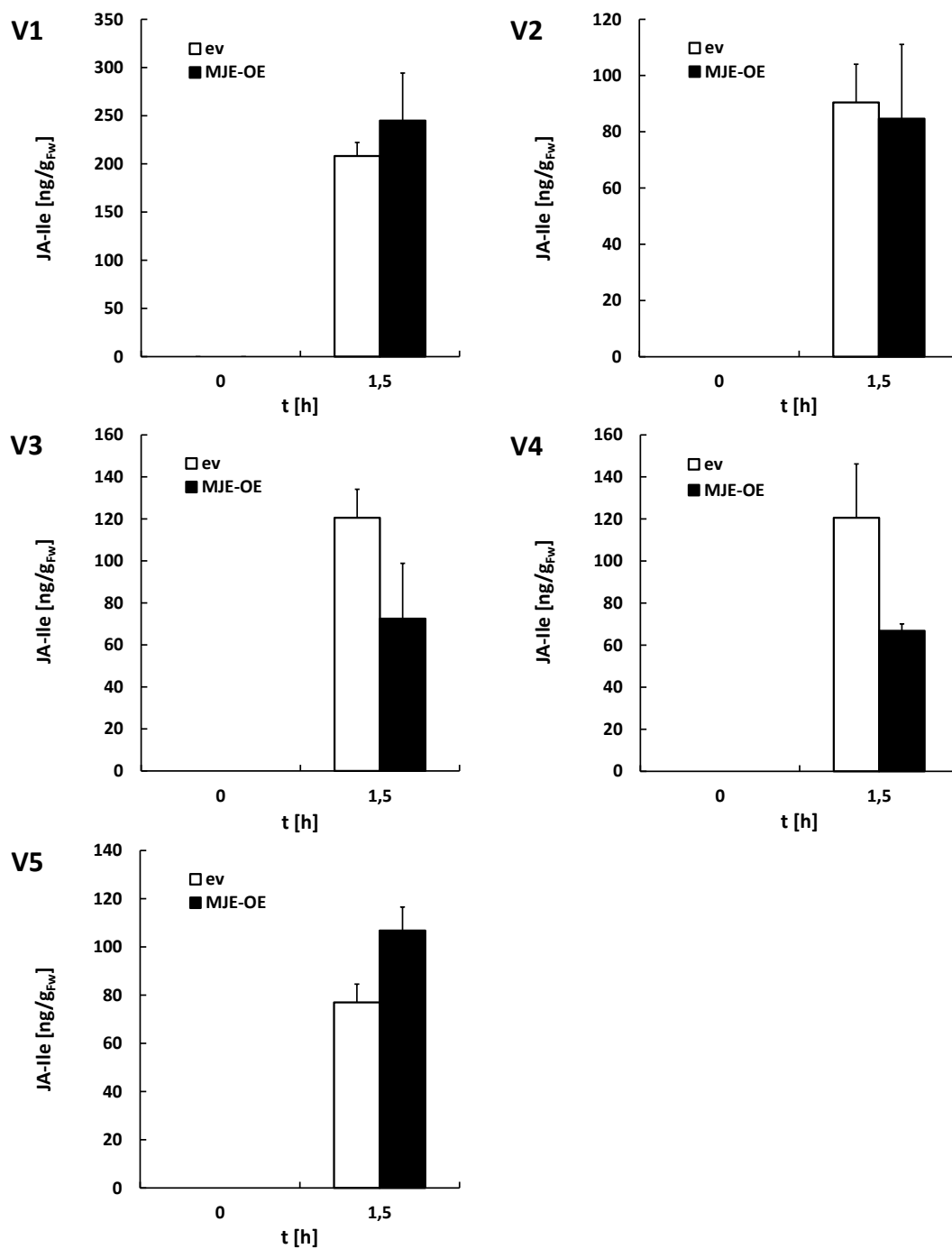


Abbildung 54: JA-Ile-Akkumulation in MJE-OE-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

JA-Ile [ng/g _{Fw}]	ev		MJE-OE		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	n.d.	208,20	n.d.	244,84	5
V2	n.d.	90,44	n.d.	84,68	5
V3	n.d.	28120,54	n.d.	72,47	5
V4	n.d.	120,54	n.d.	66,80	4
V5	n.d.	76,95	n.d.	106,75	3

11.2.1.5 12-OH-JA-Ile-Spiegel

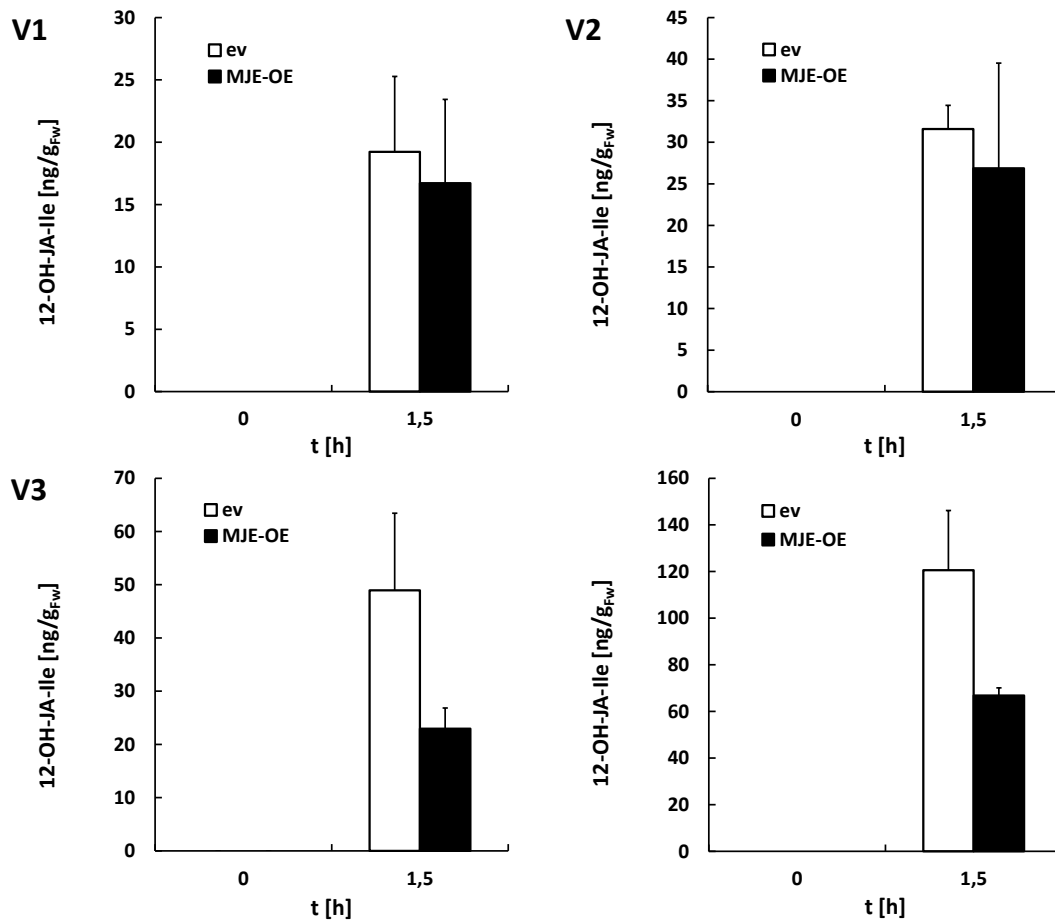


Abbildung 55: 12-OH-JA-Ile-Akkumulation in MJE-OE-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

12-OH-JA-Ile [ng/g _{Fw}]	ev		MJE-OE		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	n.d.	19,23	n.d.	16,71	5
V2	n.d.	31,59	n.d.	26,88	5
V3	n.d.	48,95	n.d.	22,95	5
V4	n.d.	17,49	n.d.	39,27	4

11.2.1.6 OPDA-Spiegel

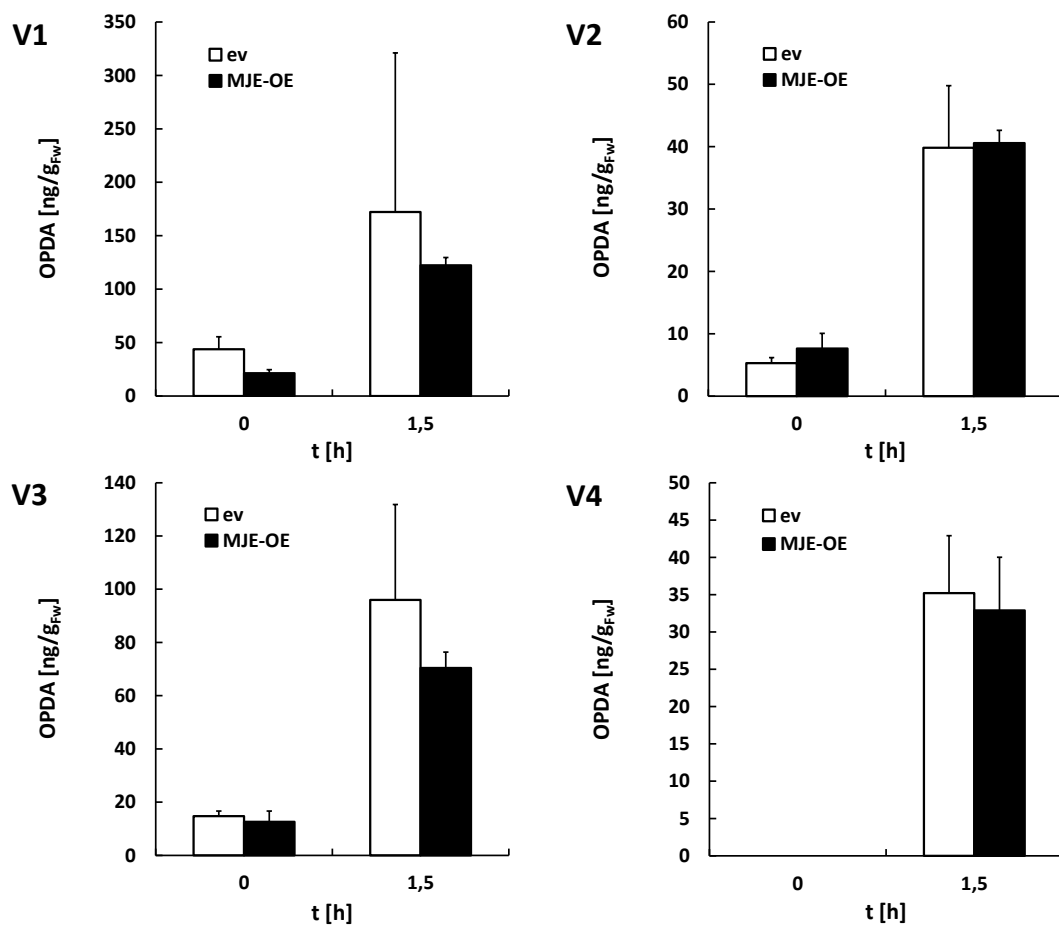


Abbildung 56: OPDA-Akkumulation in MJE-OE-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

OPDA [ng/g _{FW}]	ev		MJE-OE		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	43,76	172,25	21,42	122,35	5
V2	5,31	39,82	7,64	40,58	5
V3	14,74	95,97	12,62	70,41	5
V4	n.d.	35,21	n.d.	32,89	4

11.2.1.7 SA-Spiegel

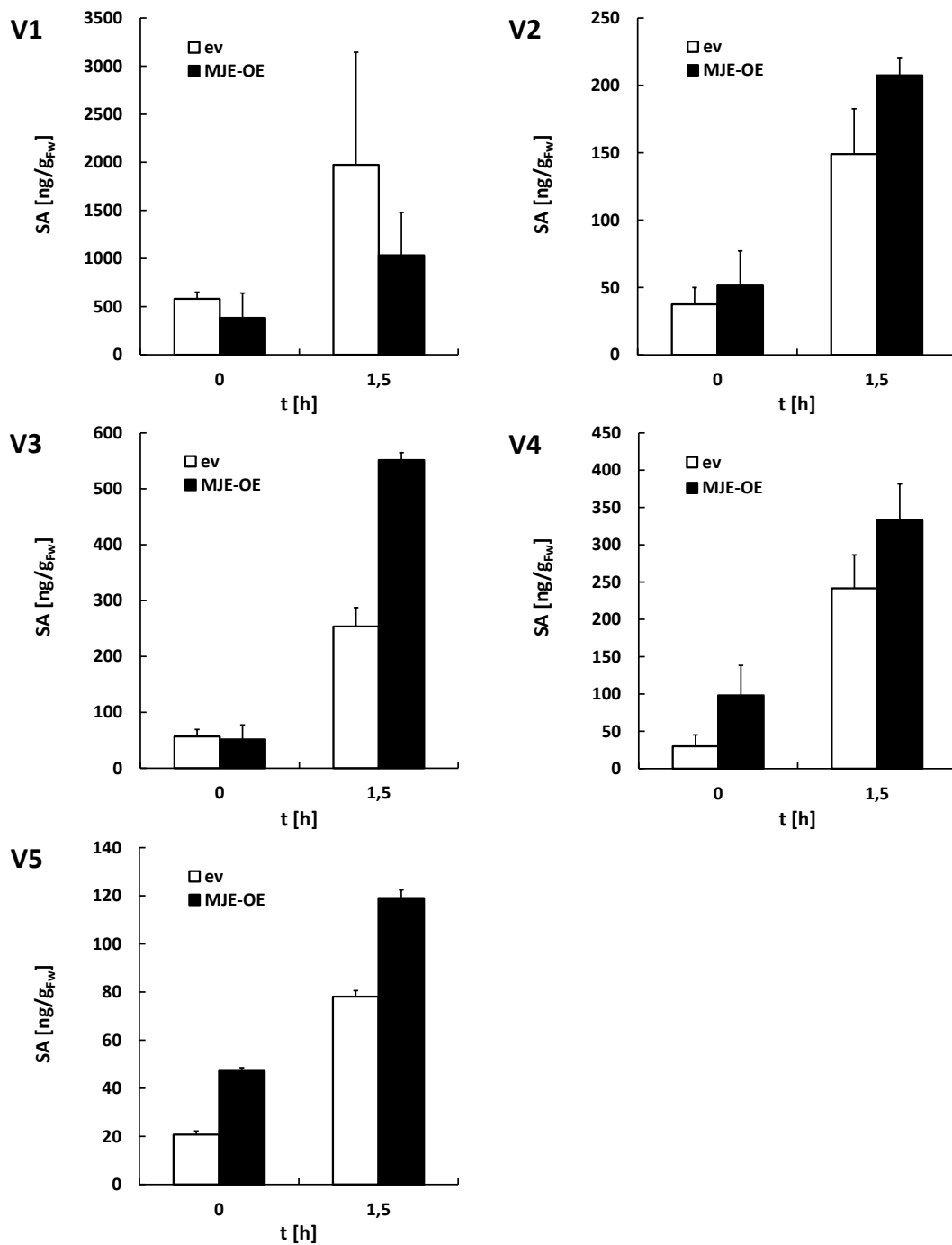


Abbildung 57: SA-Akkumulation in MJE-OE Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

SA [ng/g _{Fw}]	ev		JA-Ile ng/gFw		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	581,63	1973,51	384,19	1034,18	5
V2	37,46	148,97	51,43	207,46	5
V3	56,78	253,66	51,56	551,35	5
V4	29,87	241,64	98,06	332,77	4
V5	20,73	78,10	47,21	119,05	3

11.2.2 MJE-RNAi-Linien

11.2.2.1 AOC-Expression

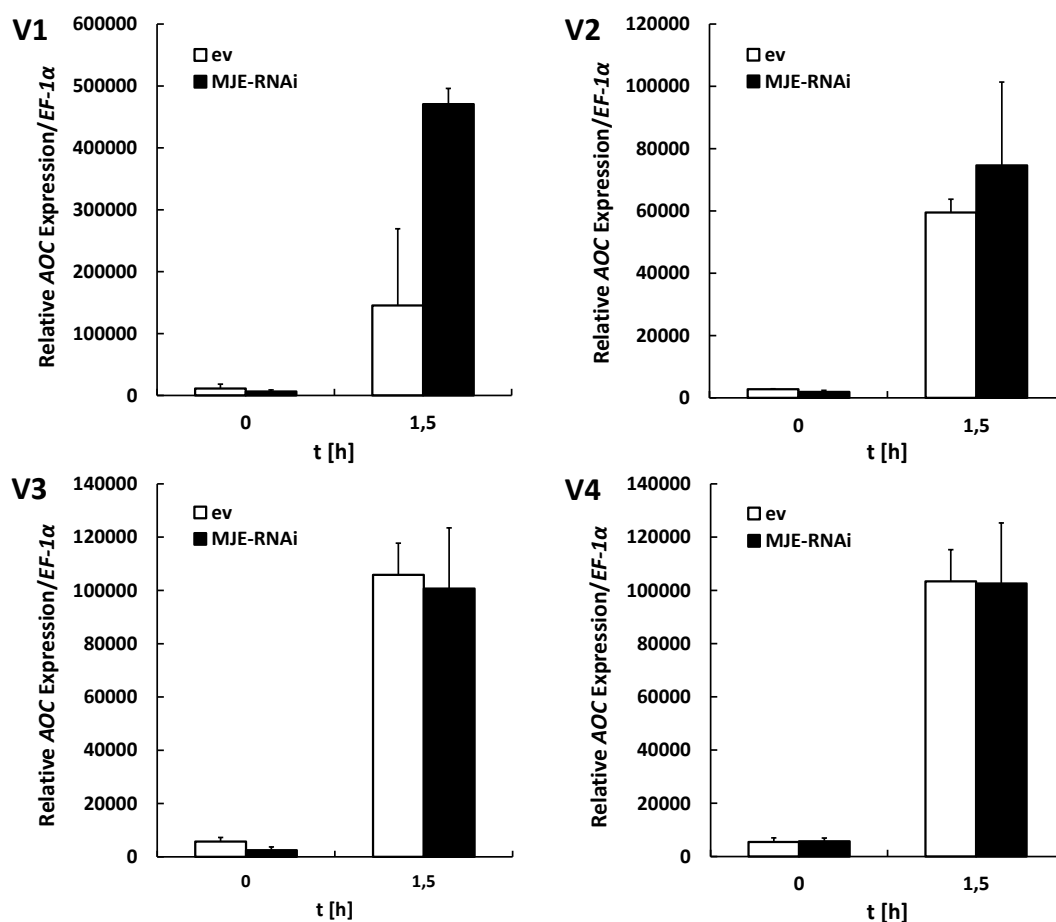


Abbildung 58: Lokale Genexpression von AOC in MJE-RNAi-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

AOC	ev		MJE-RNAi		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	11130	145488	6495	470608	3-4
V2	2777	59519	1902	74612	3/5
V3	5732	105847	2473	100715	5
V4	5456	103382	5727	102574	5

11.2.2.2 *PINII*-Expression

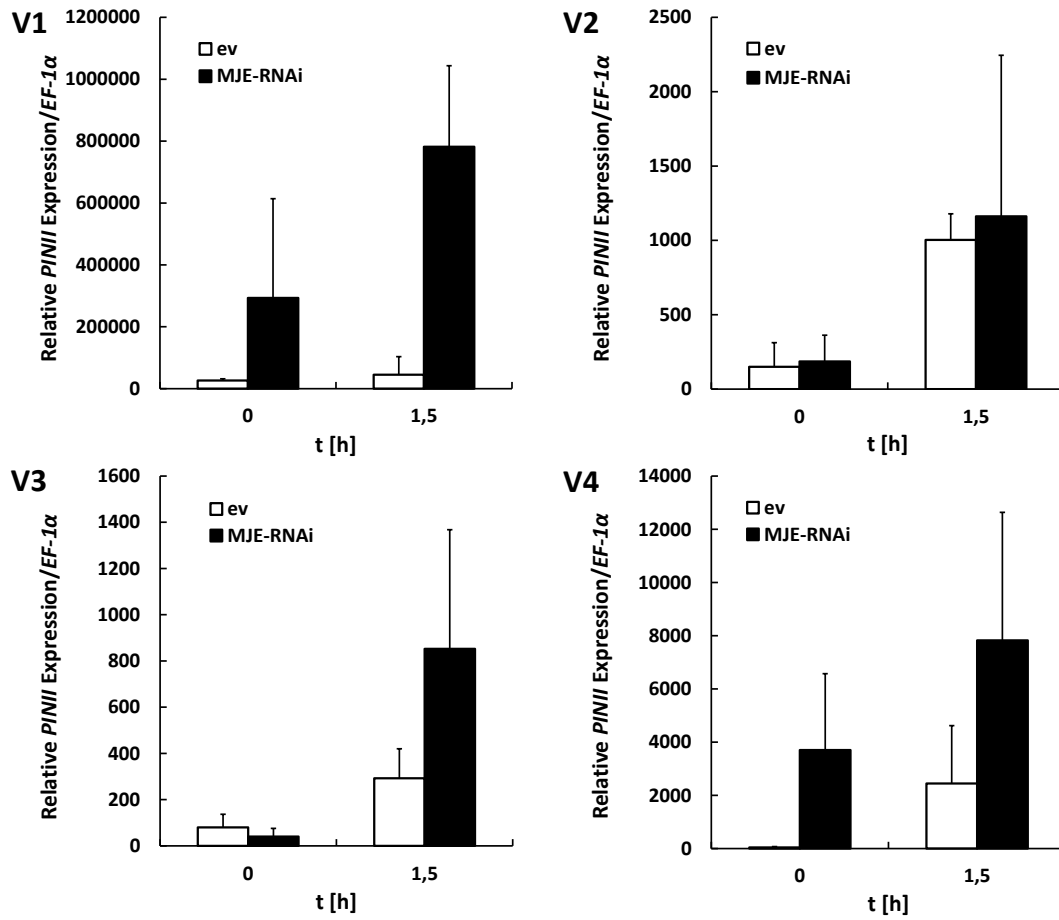


Abbildung 59: Lokale Genexpression von *PINII* in MJE-RNAi-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

<i>PINII</i>	ev		MJE-RNAi		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	26538	45178	293398	781986	3-4
V2	150	1003	186	1161	3/5
V3	80	293	40	853	5
V4	43	2447	3702	7828	5

11.2.2.3 JA-Spiegel

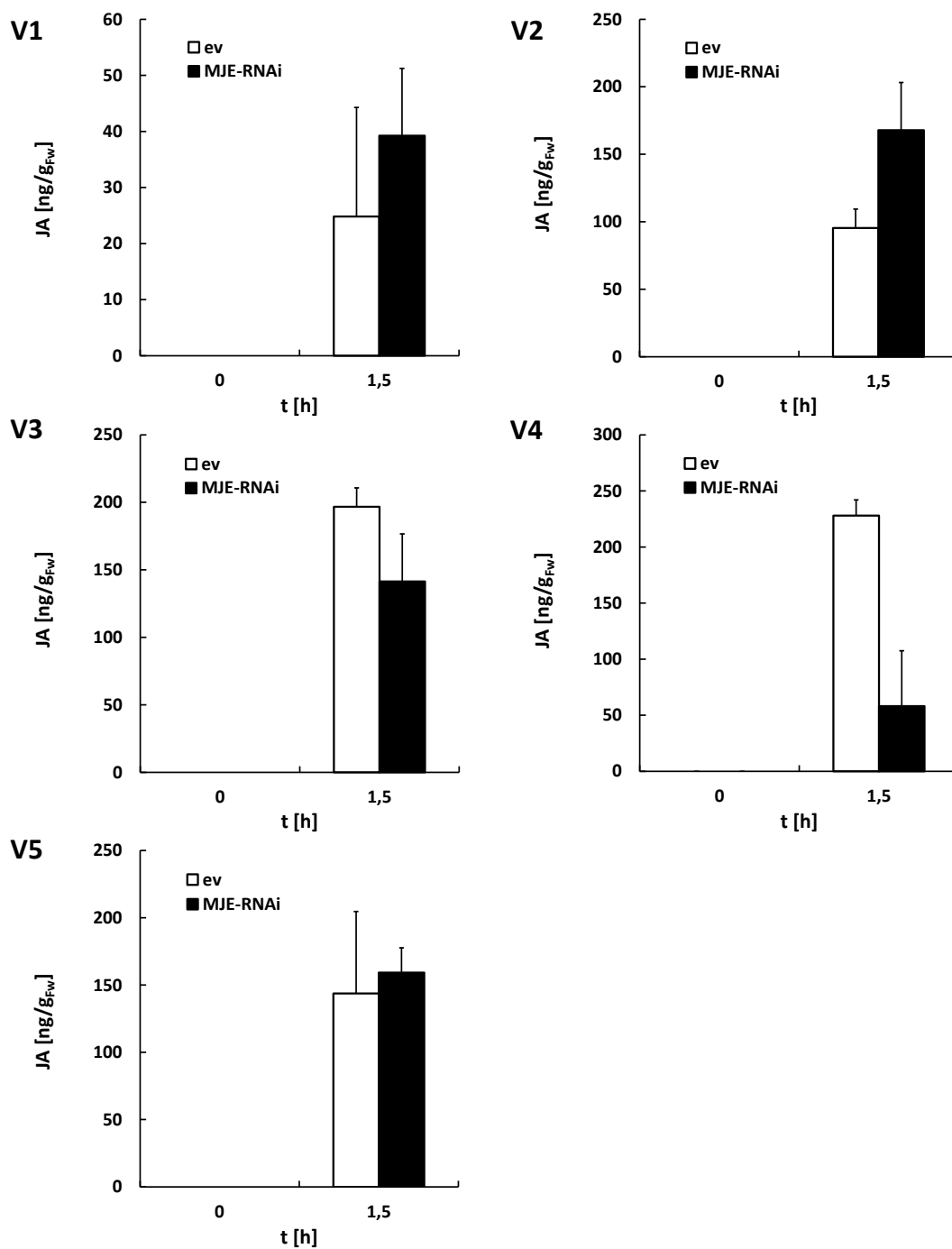


Abbildung 60: JA-Akkumulation in MJE-RNAi-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

JA [ng/g _{FW}]	ev		MJE-RNAi		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	n.d.	24,82	n.d.	39,25	3-4
V2	n.d.	95,40	n.d.	167,88	3/5
V3	n.d.	196,77	n.d.	141,38	5
V4	n.d.	228,04	n.d.	58,15	5
V5	n.d.	143,73	n.d.	159,24	3-5

11.2.2.4 JA-Ile-Spiegel

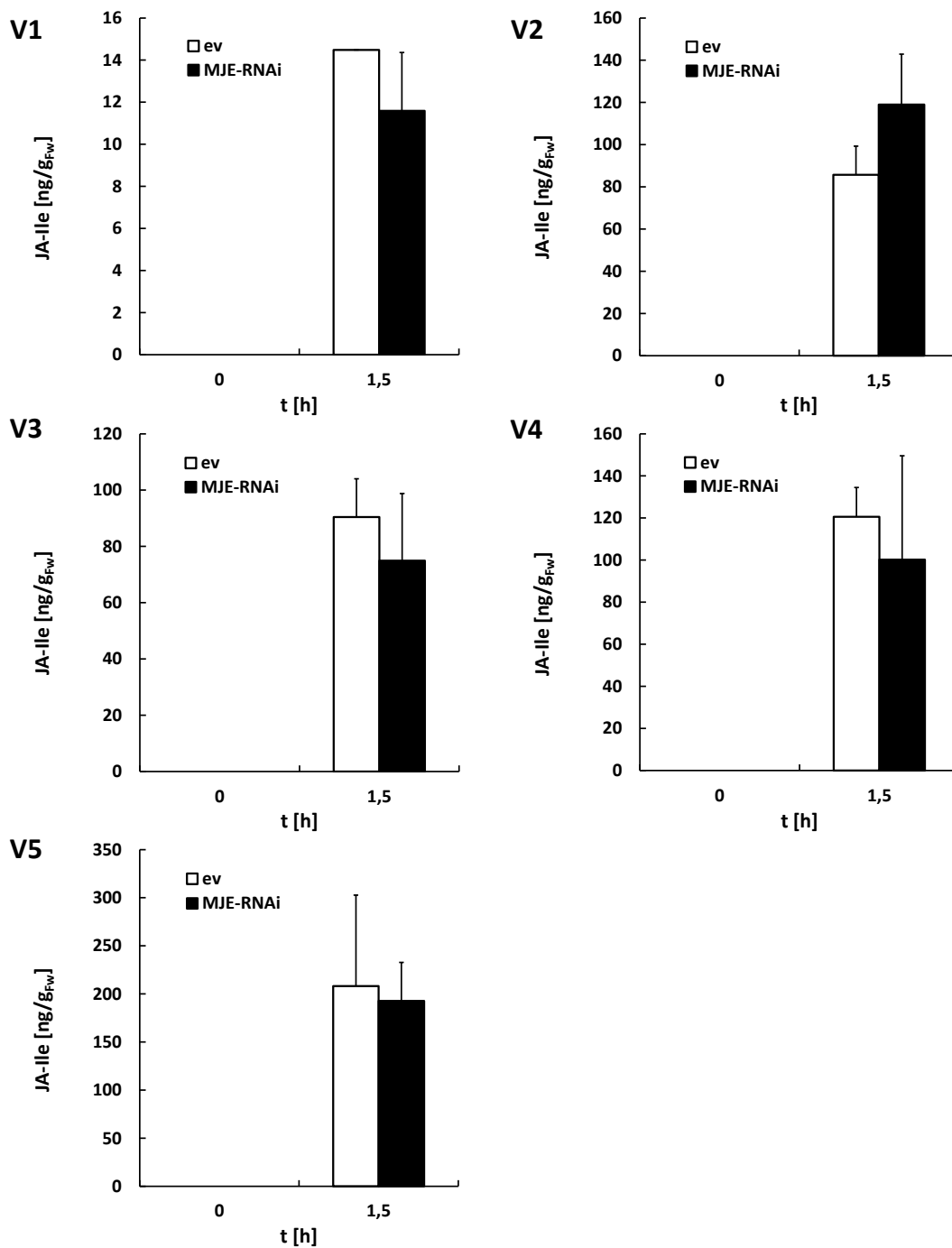


Abbildung 61: JA-Ile-Akkumulation in MJE-RNAi-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

JA-Ile [ng/g _{FW}]	ev		MJE-RNAi		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	n.d.	14,48	n.d.	11,59	3-4
V2	n.d.	85,73	n.d.	119,02	3/5
V3	n.d.	90,43	n.d.	74,92	5
V4	n.d.	120,54	n.d.	100,19	5
V5	n.d.	208,20	n.d.	192,72	3-5

11.2.2.5 12-OH-JA-Ile-Spiegel

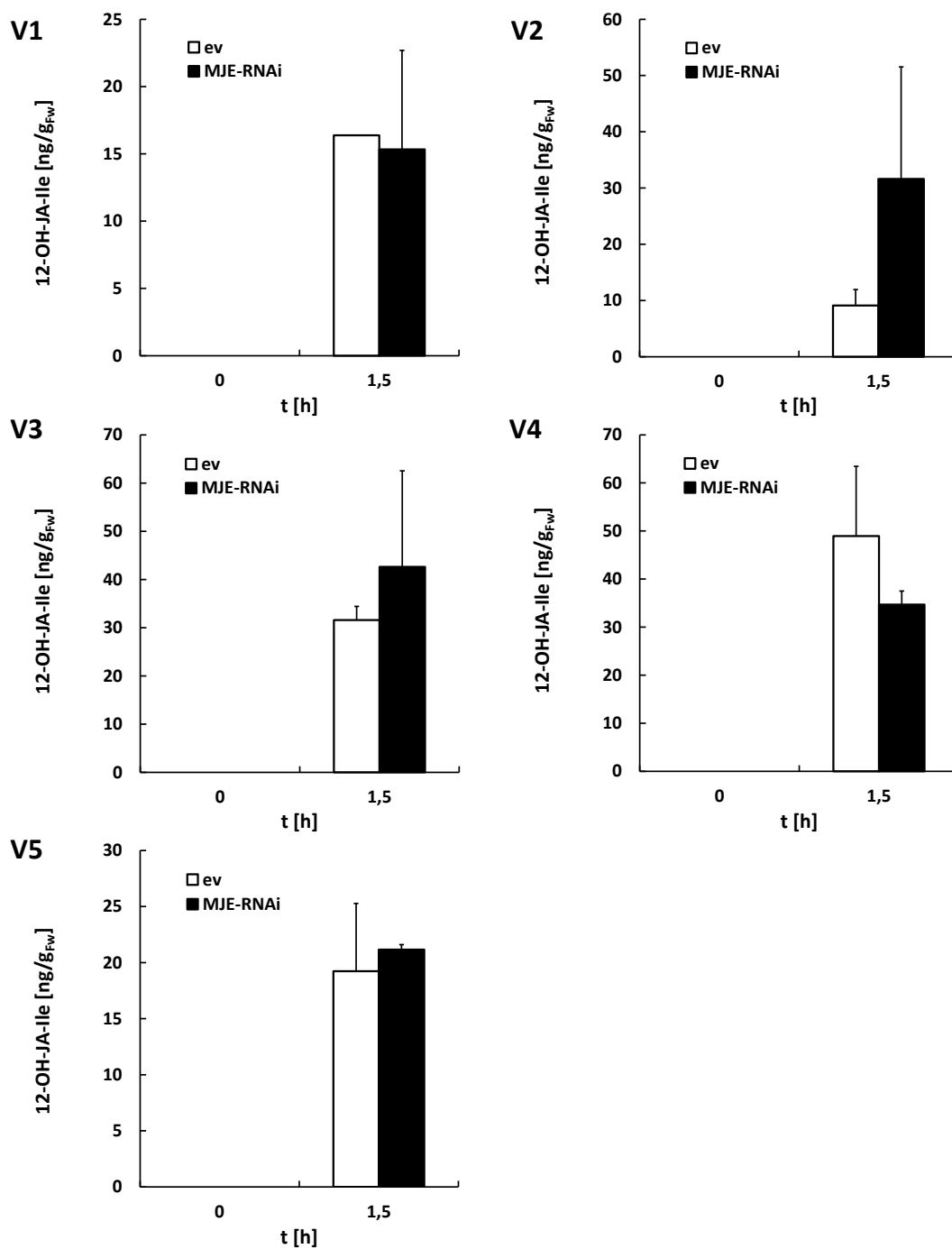


Abbildung 62: 12-OH-JA-Ile-Akkumulation in MJE-RNAi-Linien nach Verwendung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

12-OH-JA-Ile [ng/g _{FW}]	ev		MJE-RNAi		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	n.d.	16,38	n.d.	15,33	3-4
V2	n.d.	9,11	n.d.	31,61	3/5
V3	n.d.	31,59	n.d.	42,62	5
V4	n.d.	48,95	n.d.	34,69	5
V5	n.d.	19,23	n.d.	21,16	3-5

11.2.2.6 OPDA-Spiegel

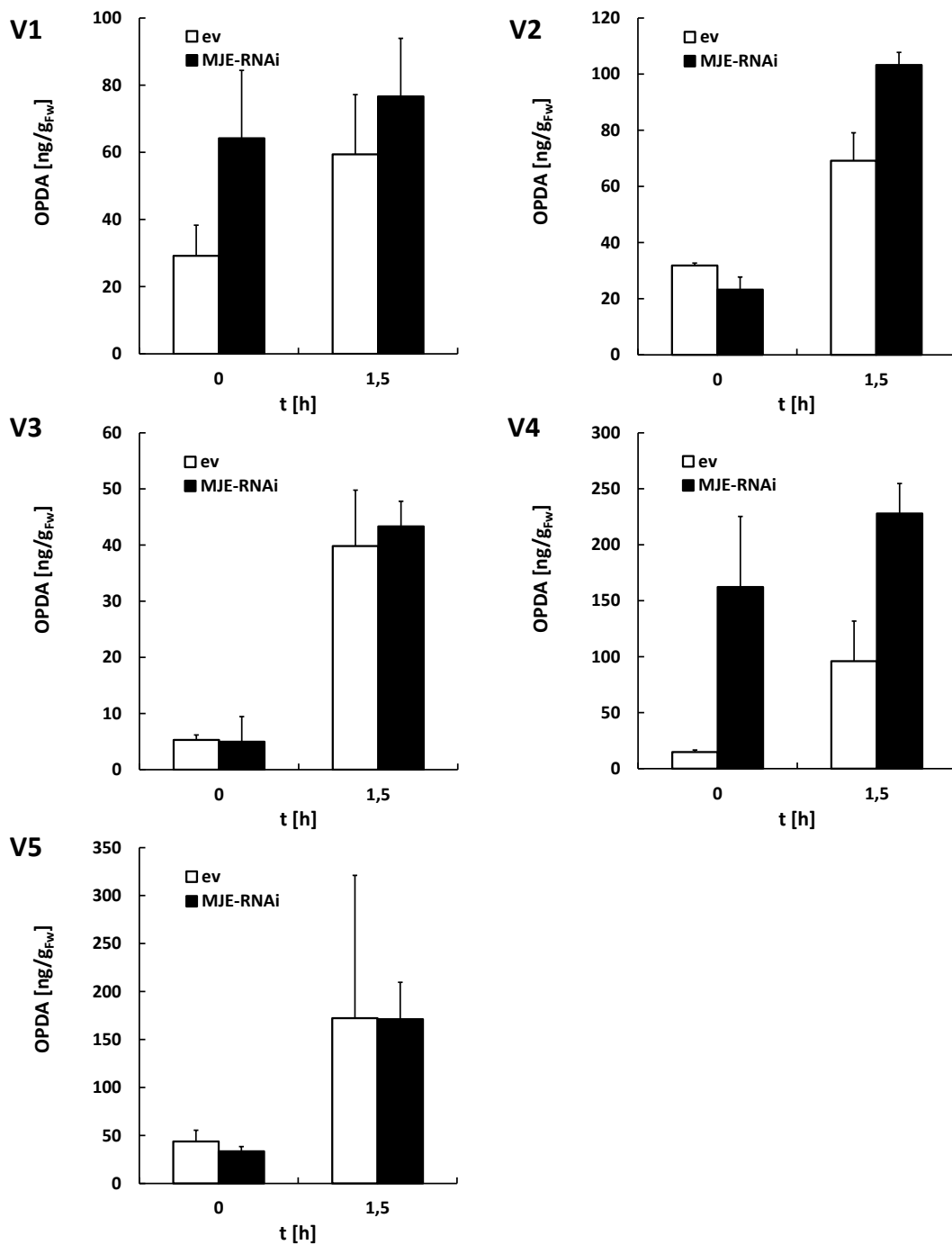


Abbildung 63: OPDA-Akkumulation in MJE-RNAi-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

OPDA [ng/g _{f.w.}]	ev		MJE-RNAi		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	29,19	59,37	64,17	76,64	3-4
V2	31,81	69,13	23,24	103,26	3/5
V3	5,31	39,82	4,98	43,33	5
V4	14,74	95,97	162,21	227,87	5
V5	43,76	172,25	33,45	171,13	3-5

11.2.2.7 SA-Spiegel

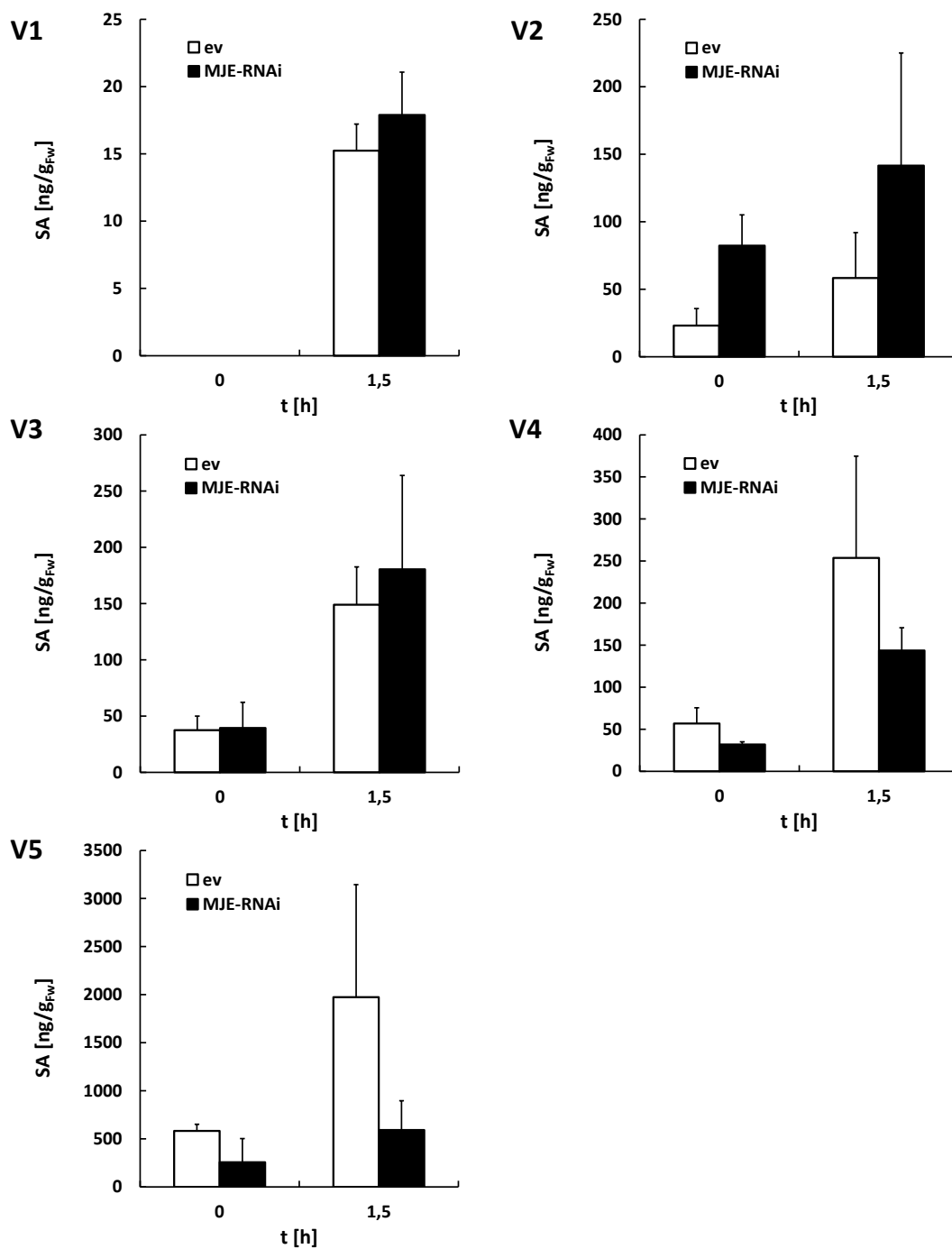


Abbildung 64: SA-Akkumulation in MJE-RNAi-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

SA [ng/g _{Fw}]	ev		MJE-RNAi		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1		15,24		17,89	3-4
V2	23,16	58,35	82,31	141,65	3/5
V3	37,48	148,97	39,41	180,45	5
V4	56,78	253,66	31,82	143,65	5
V5	581,63	1973,51	256,97	591,28	3-5

11.2.3 JMT-OE-Linien

11.2.3.1 AOC-Expression

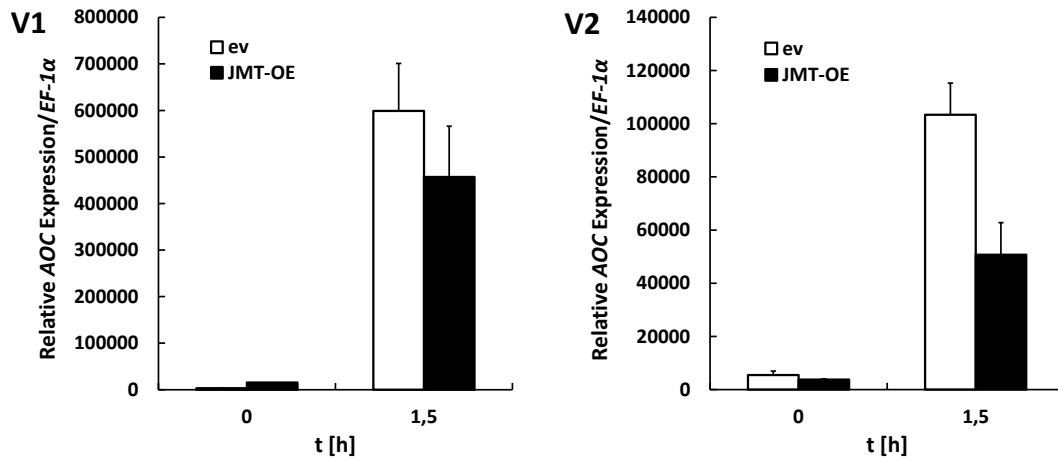


Abbildung 65: Lokale Genexpression von AOC in JMT-OE-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

AOC	ev		JMT-OE		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	5456	103382	3787	50733	5
V2	3342	598916	15479	456931	3

11.2.3.2 PINII-Expression

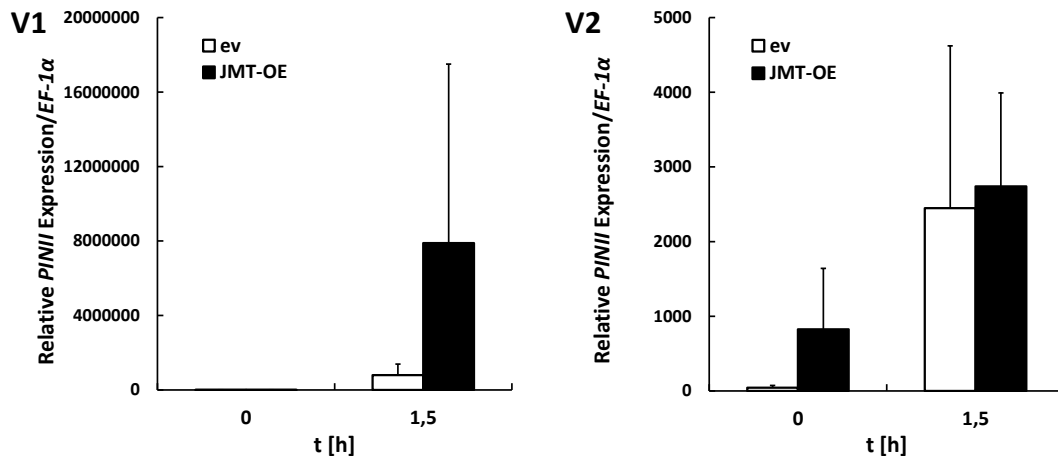


Abbildung 66: Lokale Genexpression von PINII in JMT-OE-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

PINII	ev		JMT-OE		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	43	2447	826	2739	5
V2	148	794598	101	7889167	3

11.2.3.3 JA-Spiegel

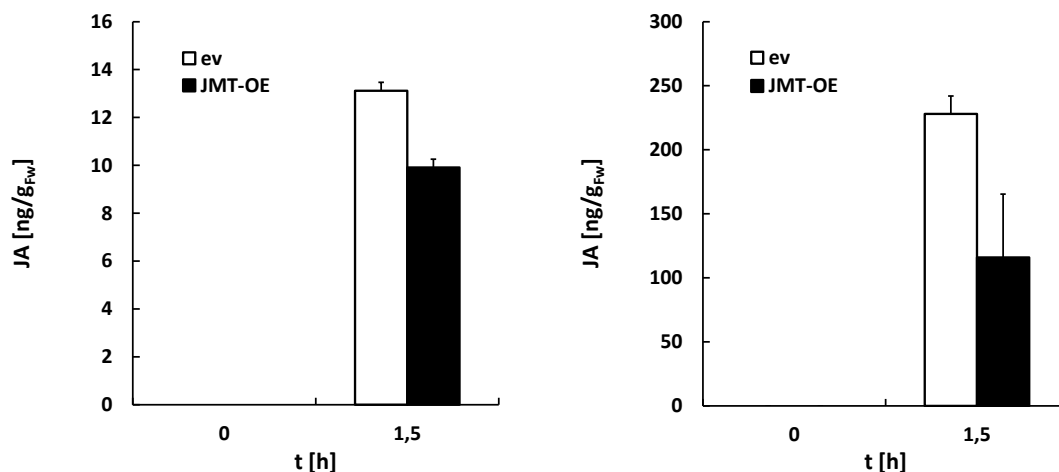


Abbildung 67: JA-Akkumulation in JMT-OE-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

JA [ng/g _{FW}]	ev		JMT-OE		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	n.d.	228,03	n.d.	115,97	5
V2	n.d.	13,11	n.d.	9,91	5

11.2.3.4 JA-Ile-Spiegel

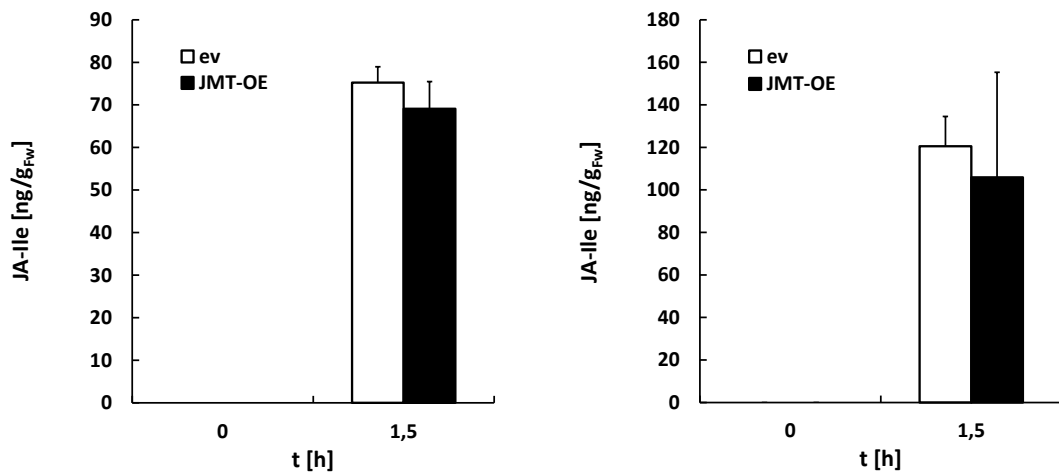


Abbildung 68: JA-Ile-Akkumulation in JMT-OE-Linien nach Verwundung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

JA-Ile [ng/g _{FW}]	ev		JMT-OE		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	n.d.	120,54	n.d.	105,91	5
V2	n.d.	75,24	n.d.	69,10	5

11.3 Pfropfungsexperimente

11.3.1 AOC-Expression

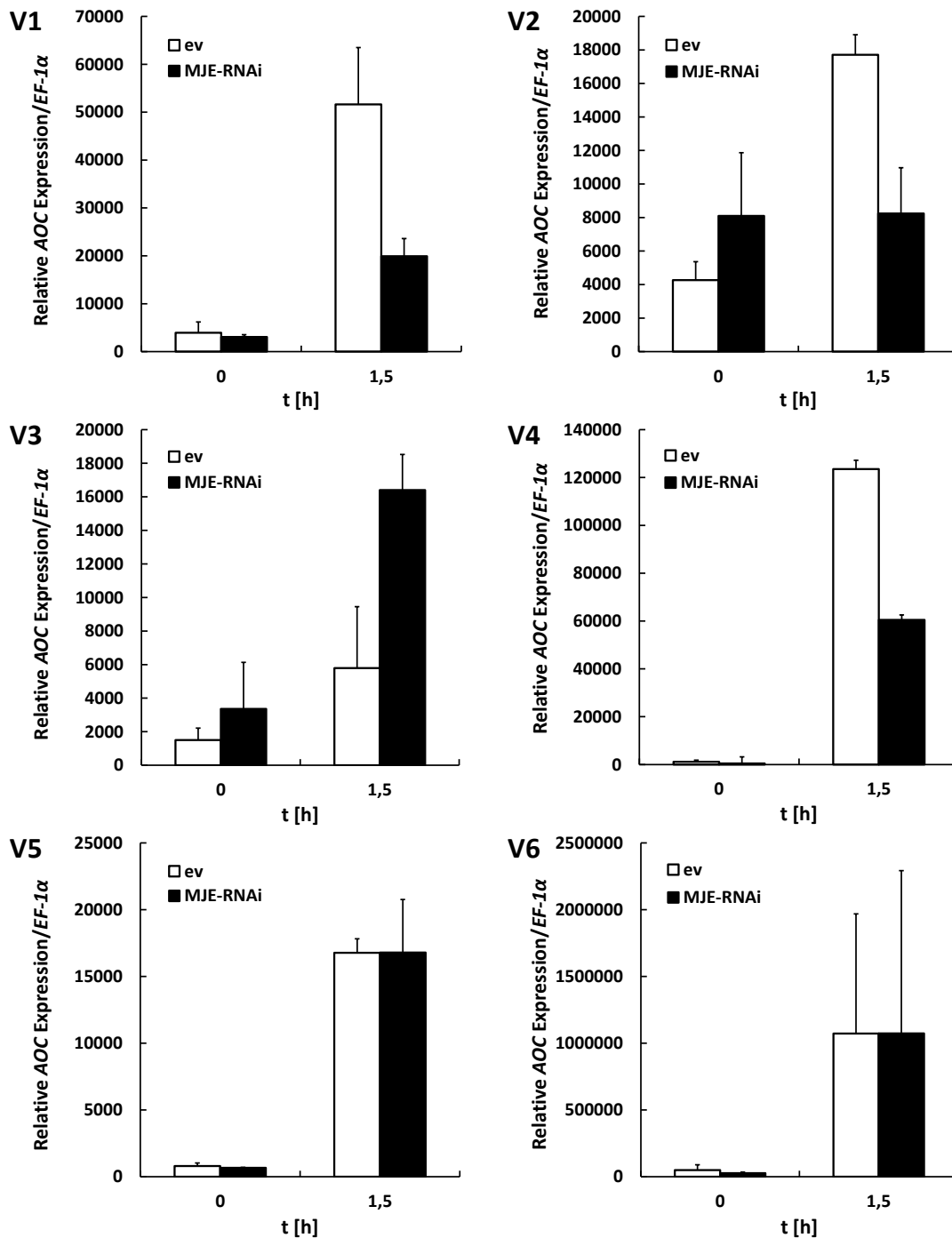


Abbildung 69: AOC-Expression in distalen Bereichen der Pfropfbastarde nach Verwendung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 technischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h).

AOC	ev		MJE-RNAi		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	3938	51627	3056	19914	3
V2	4269	17708	8096	8244	3
V3	1502	5792	33571	16406	3
V4	1148	123523	431	60453	3
V5	805	16769	666	16790	3
V6	49557	1072441	27293	1073488	3

11.3.2 PINII-Expression

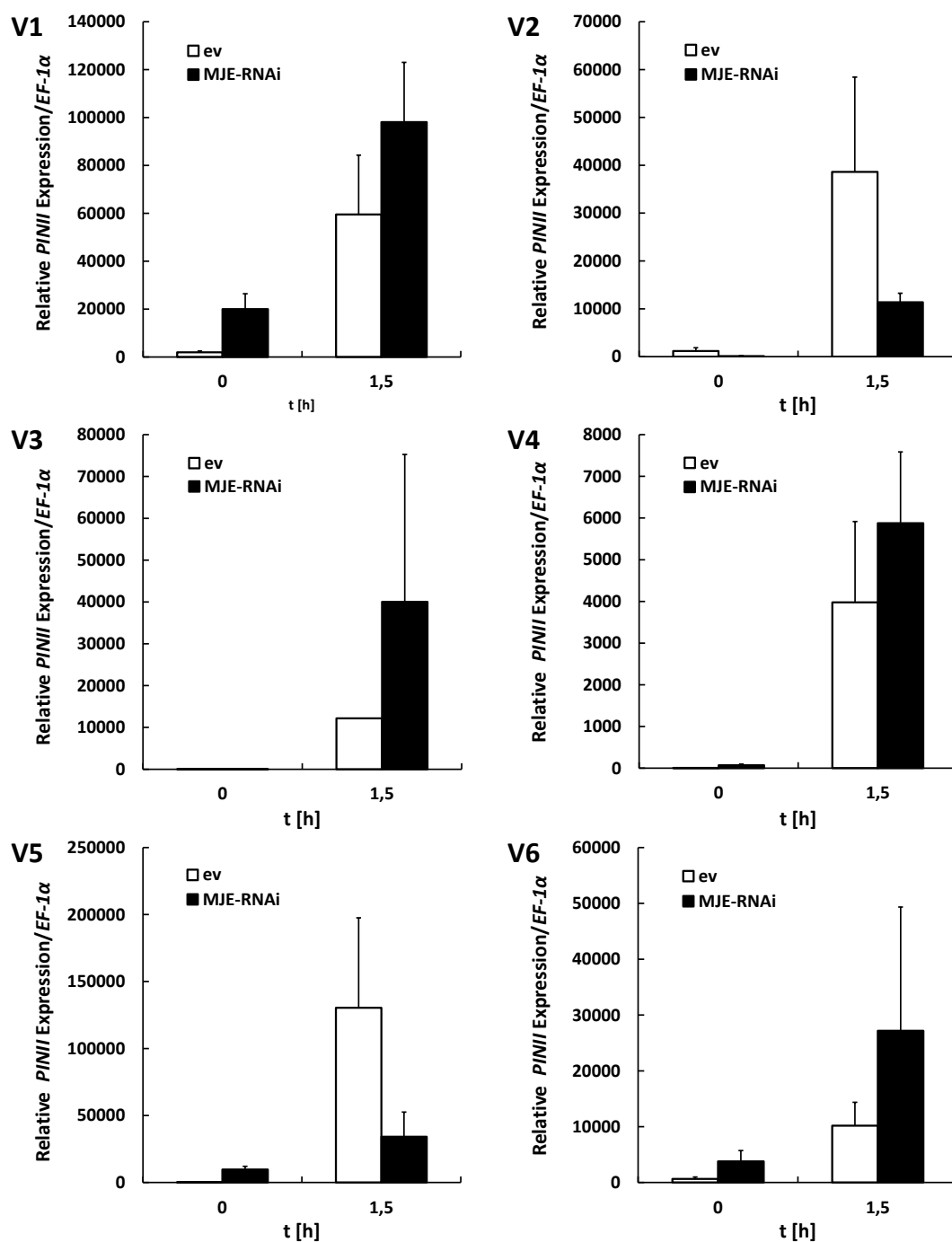


Abbildung 70: PINII-Expression in distalen Bereichen der Pfropfbastarde nach Verwundung
 Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 technischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h).

PINII	ev		MJE-RNAi		n
	0 h	1,5 h	0 h	1,5 h	
V1	1949	59538	20001	98130	3
V2	430	24943	6016	11873	3
V3	56	12170	21	40017	3
V4	8	3979	71	5877	3
V5	289	130438	9700	34173	3
V6	648	10182	3777	27181	3

11.4 Pathogenexperimente mit *S. sclerotiorum*

11.4.1 AOC-Expression der MJE-OE-Linien

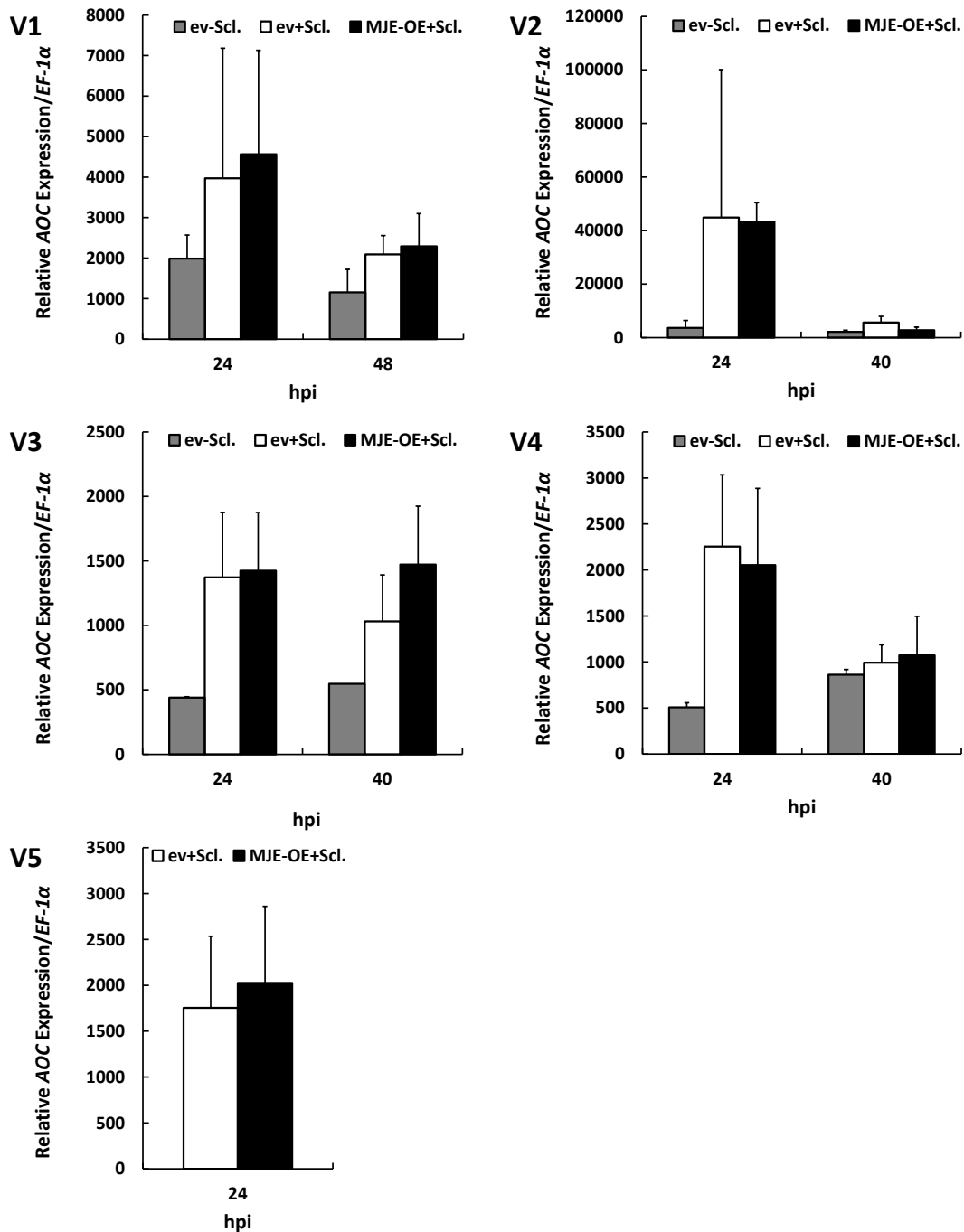


Abbildung 71: AOC-Expression der MJE-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

AOC	ev-Sclerotinia		ev+Sclerotinia		MJE-OE+Sclerotinia	
	24 h	48	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	1987	1156	3970	2092	4563	2292
V2	3631	2142	44849	5664	43284	2801
V3	439	547	1372	1031	1432	1471
V4	506	862	2255	993	2052	1072
V5	-	-	1754	-	2026	-

11.4.2 AOC-Expression der MJE-RNAi-Linien

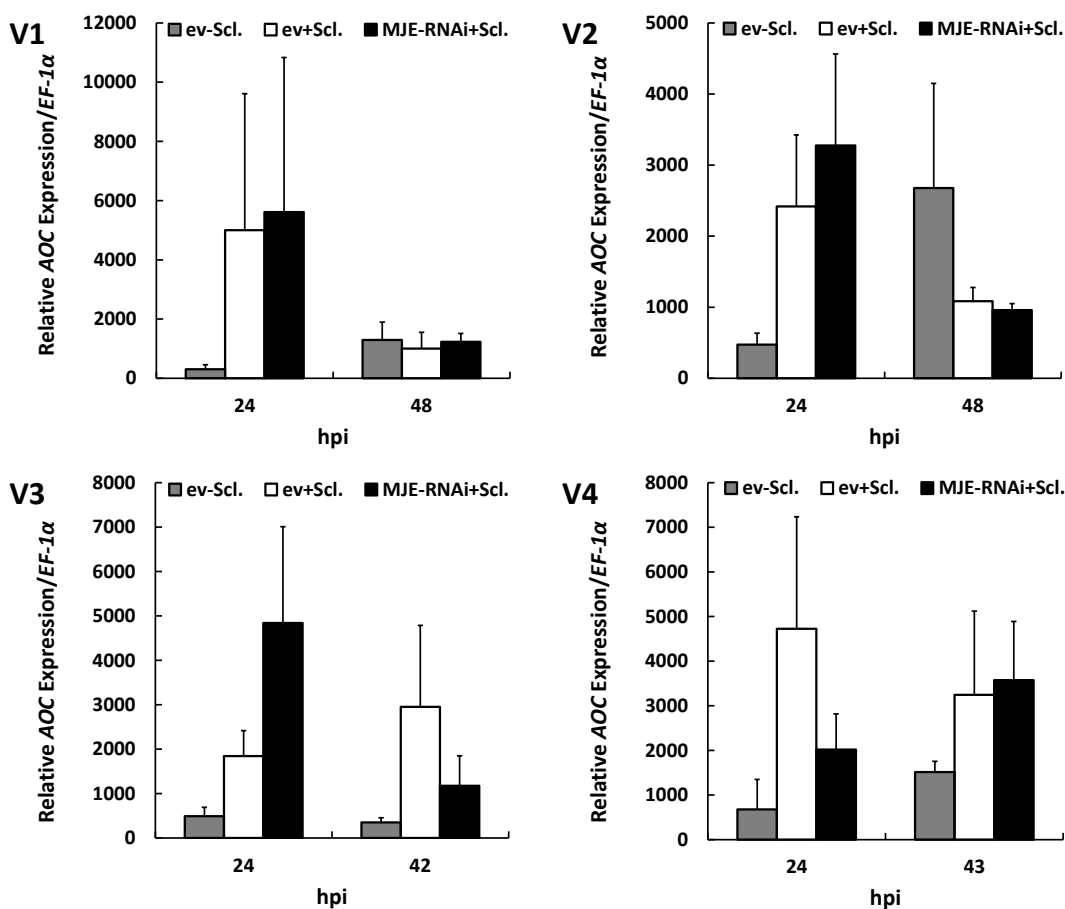


Abbildung 72: AOC-Expression der MJE-RNAi-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

AOC	ev-Sclerotinia		ev+Sclerotinia		MJE-RNAi+Sclerotinia	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	309	1294	5000	1006	5613	1233
V2	475	2678	2418	1084	3276	959
V3	489	350	1845	2951	4840	1176
V4	678	1513	4725	3246	2016	3573

11.4.3 AOC-Expression der JMT-OE-Linien

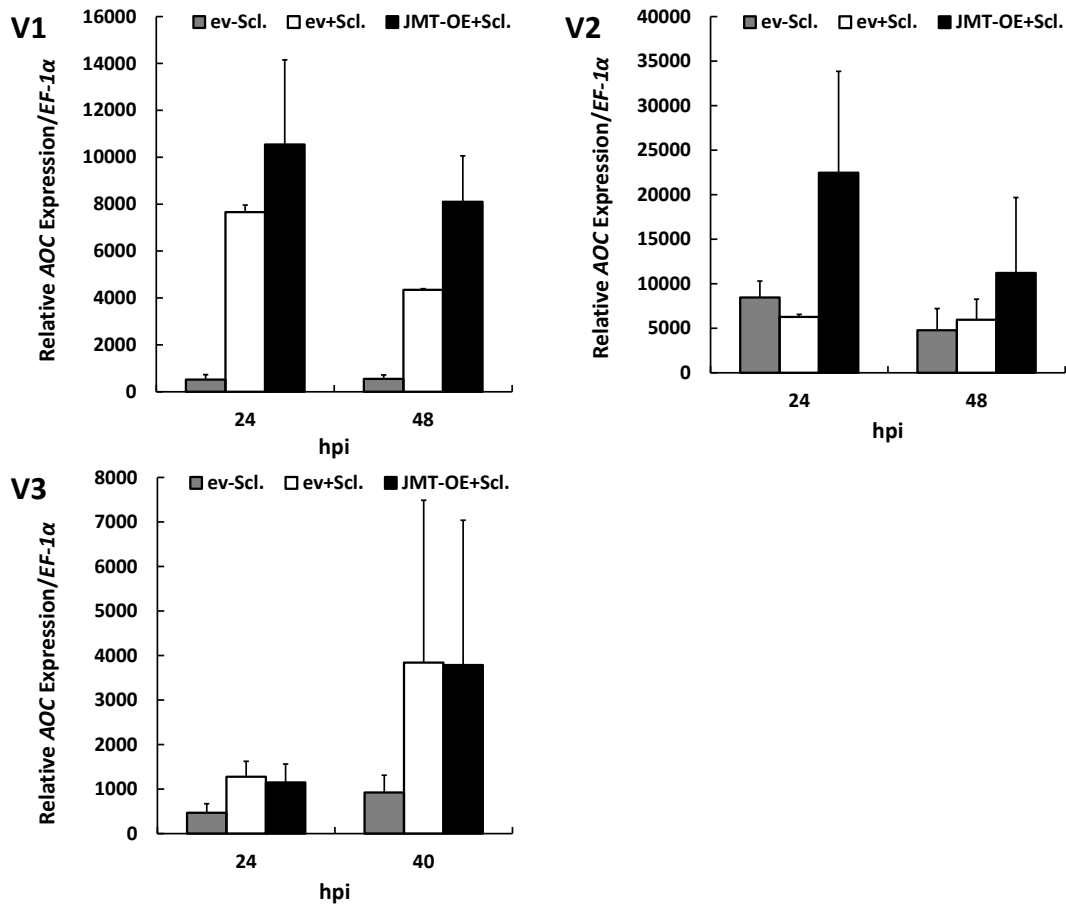


Abbildung 73 AOC-Expression der JMT-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

AOC	ev-Sclerotinia		ev+Sclerotinia		JMT-OE+Sclerotinia	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	515	546	7659	4343	10540	8098
V2	8463	4785	6272	5958	17896	11200
V3	470	925	1276	3841	1150	3786

11.4.4 PINII-Expression der MJE-OE-Linien

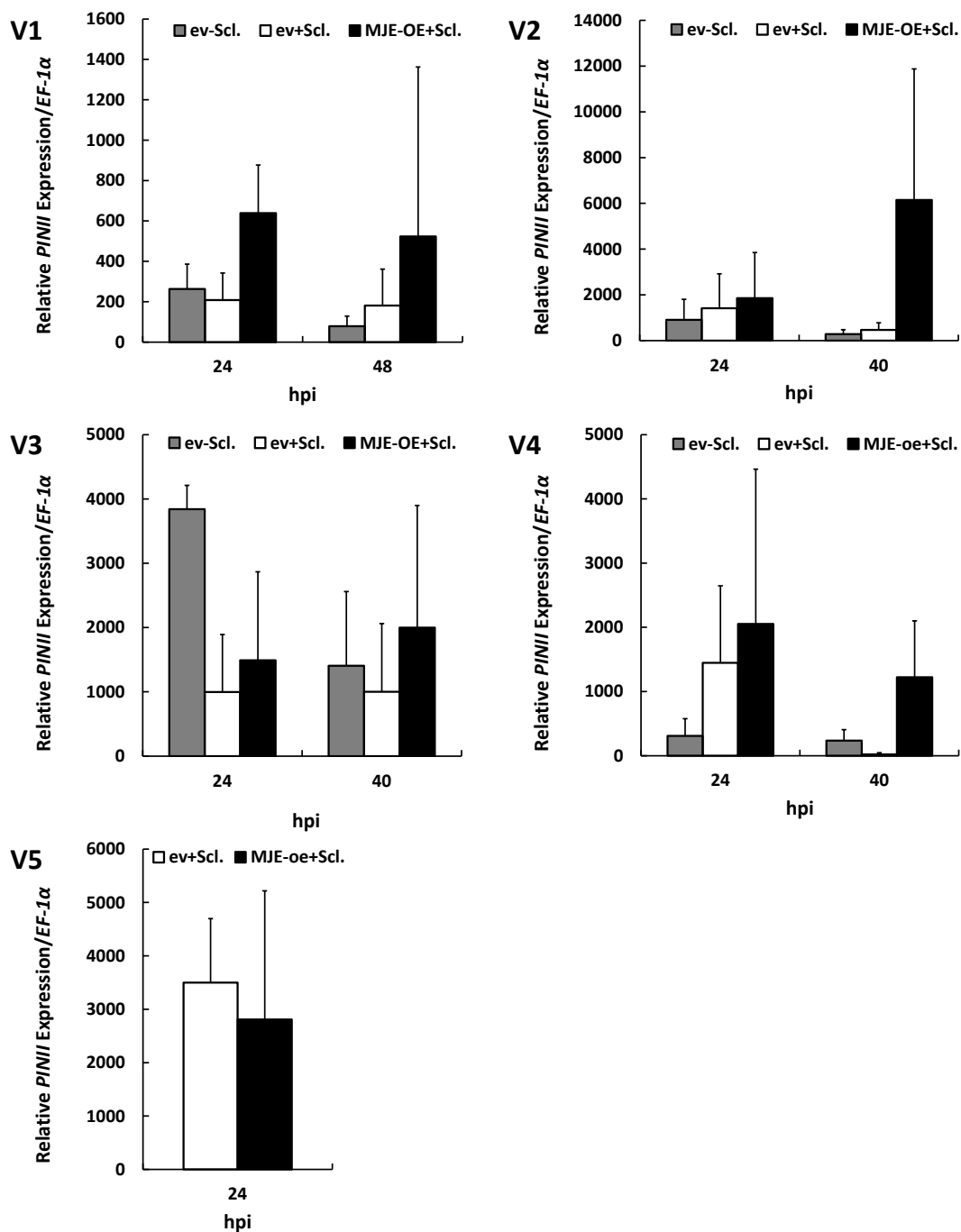


Abbildung 74: PINII-Expression der MJE-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

PINII	ev-Sclerotinia		ev+Sclerotinia		MJE-OE+Sclerotinia	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	263	79	208	181	639	523
V2	907	287	1415	471	1858	6147
V3	3840	1405	998	1002	1490	1998
V4	308	235	1448	21	2053	1223
V5	-	-	-	3499	-	2808

11.4.5 *PINII*-Expression der MJE-RNAi-Linien

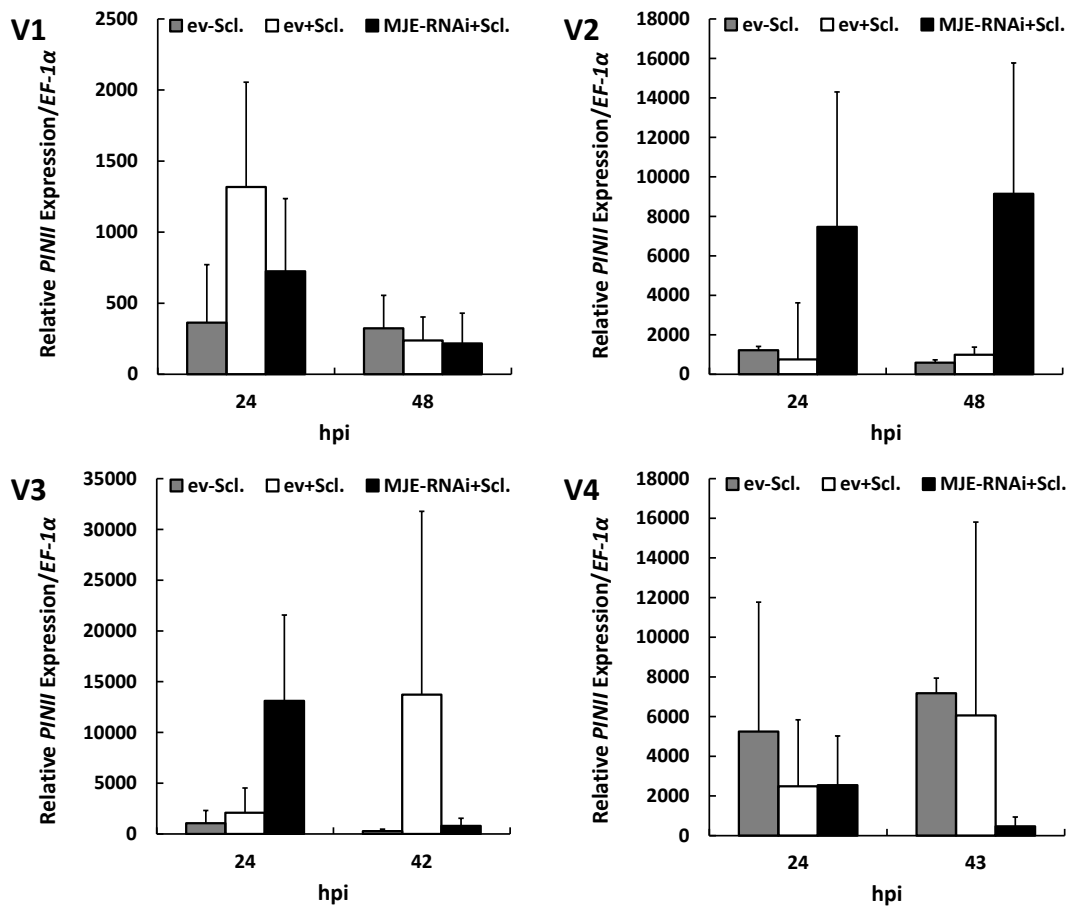


Abbildung 75: *PINII*-Expression der MJE-RNAi-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

<i>PINII</i>	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>MJE-RNAi+Sclerotinia</i>	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	363	324	1318	238	724	217
V2	1218	592	756	987	7464	9143
V3	1061	287	2097	13722	13108	795
V4	5248	7180	2487	6658	2542	465

11.4.6 *PINII*-Expression der JMT-OE-Linien

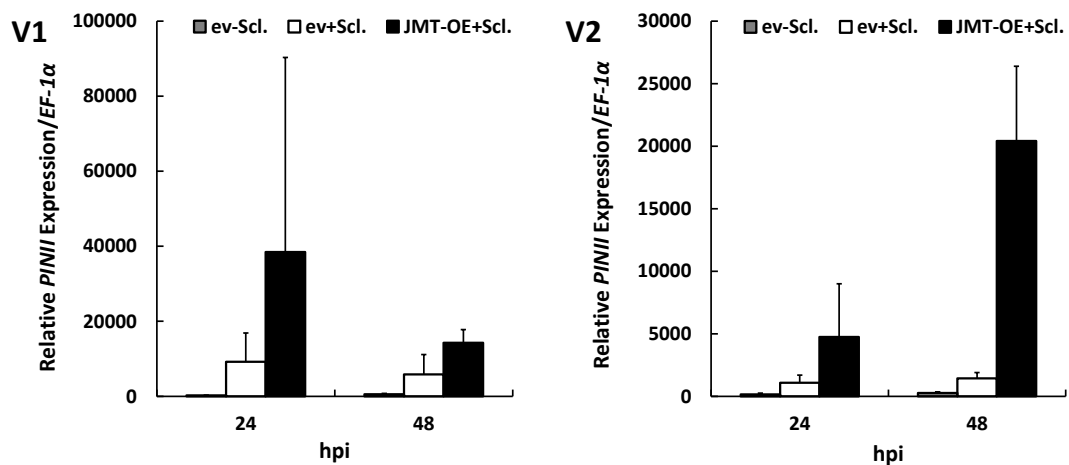


Abbildung 76 *PINII*-Expression der JMT-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

<i>PINII</i>	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>JMT-OE+Sclerotinia</i>	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	234	565	9188	5854	38445	14253
V2	159	264	1853	1440	4750	20416

11.4.7 Expression des fughalen *Aktins* in MJE-OE-Linien

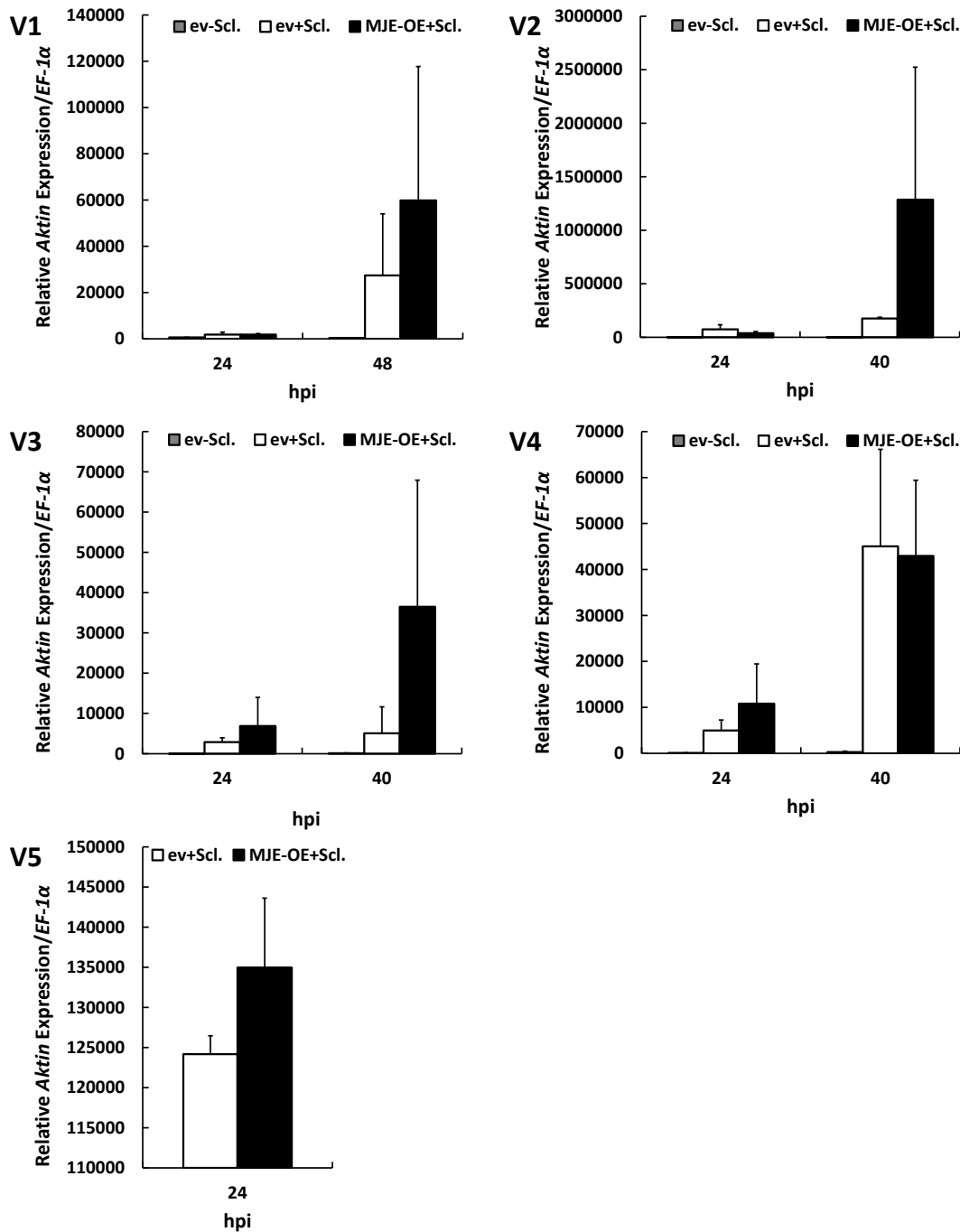


Abbildung 77 Expression des fughalen *Aktins* in MJE-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

<i>Aktin</i>	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>MJE-OE+Sclerotinia</i>	
	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	592	362	1839	27382	1822	59822
V2	64	296	74109	175422	38912	1286324
V3	16	102	2886	5048	6885	36490
V4	77	265	4957	45022	10813	42939
V5	-	-	-	124171	-	134960

11.4.8 Expression des fungenen *Aktins* in MJE-RNAi-Linien

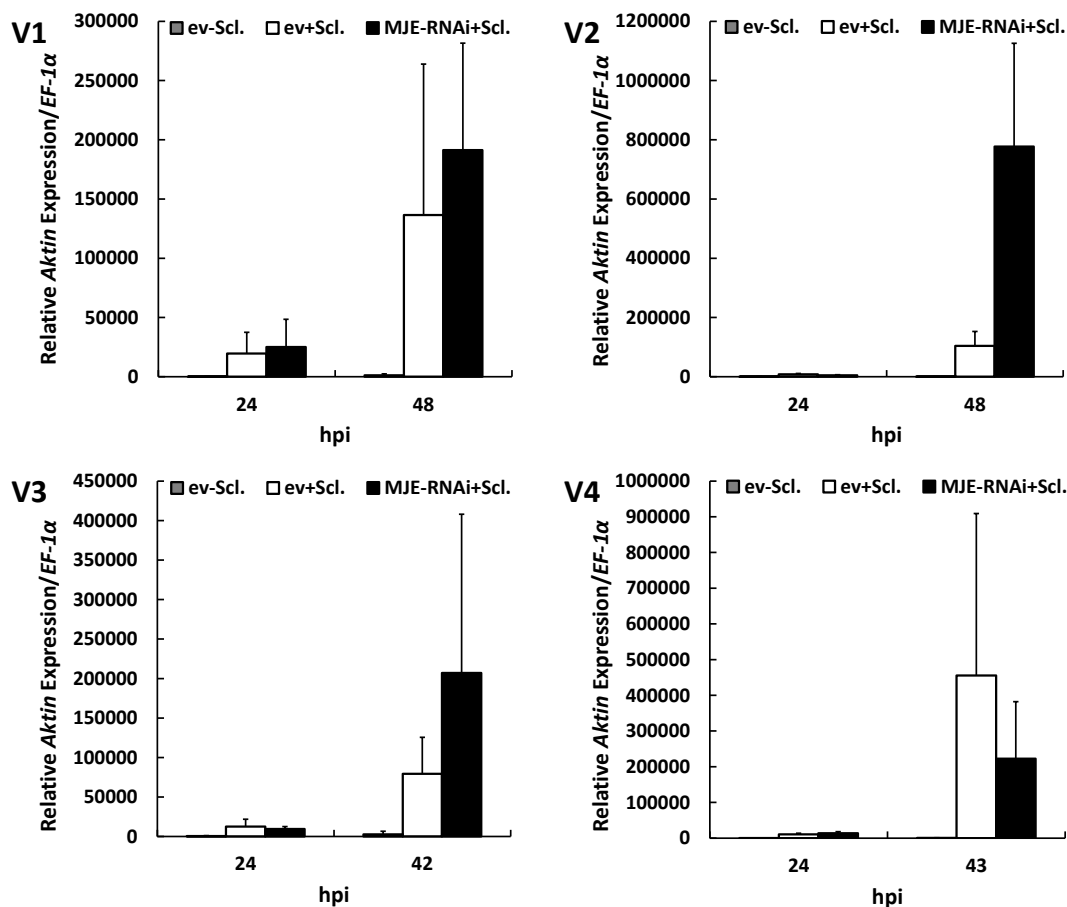


Abbildung 78: Expression des fungenen *Aktins* in MJE-RNAi-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

<i>Aktin</i>	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>MJE-RNAi+Sclerotinia</i>	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	141	1206	19621	136545	25077	191311
V2	177	81	8258	104372	4733	777169
V3	506	2652	12602	79399	9527	207130
V4	40	535	10497	455572	13730	222361

11.4.9 Expression des fungalen *Aktins* in JMT-OE-Linien

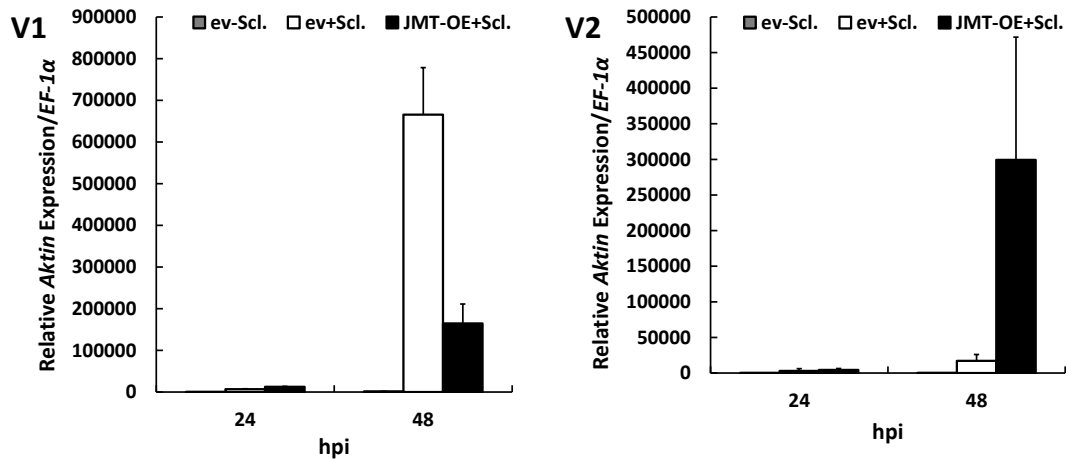


Abbildung 79: Expression des fungalen *Aktins* in JMT-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

<i>Aktin</i>	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>JMT-OE+Sclerotinia</i>	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	31	1289	6769	665675	12294	46609
V2	86	9	3010	17150	4407	299297

11.4.10 Läsionsgrößen der MJE-OE-Linien

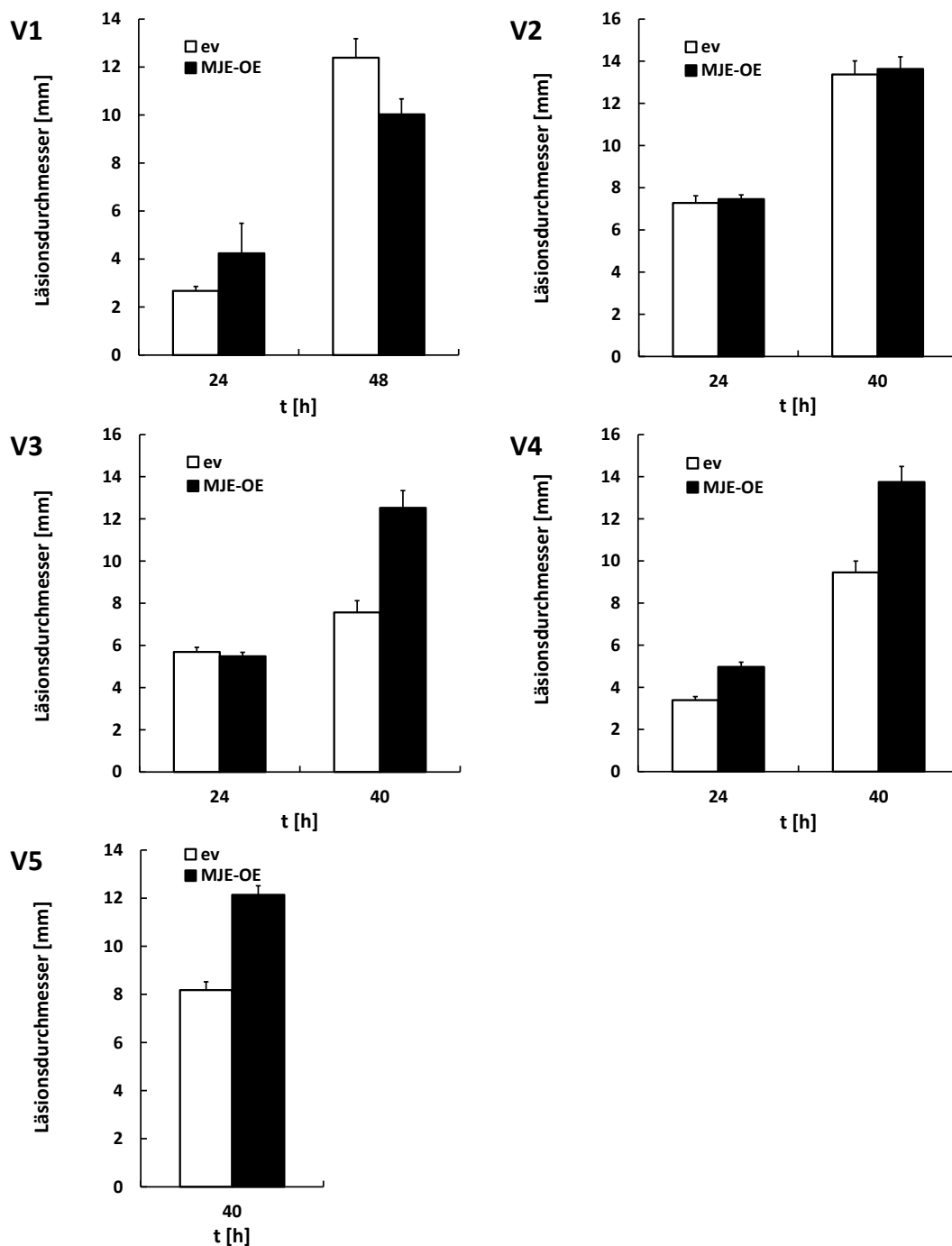


Abbildung 80: Läsionsgrößen der MJE-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 26-60 Läsionen + SEM. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

Läsionen [mm]	ev		MJE-OE	
	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	2,67	12,39	4,24	10,03
V2	7,28	13,37	7,46	13,63
V3	5,69	7,56	5,48	12,53
V4	3,39	9,46	4,97	13,74
V5	-	8,18	-	12,14

11.4.11 Läsionsgrößen der MJE-RNAi-Linien

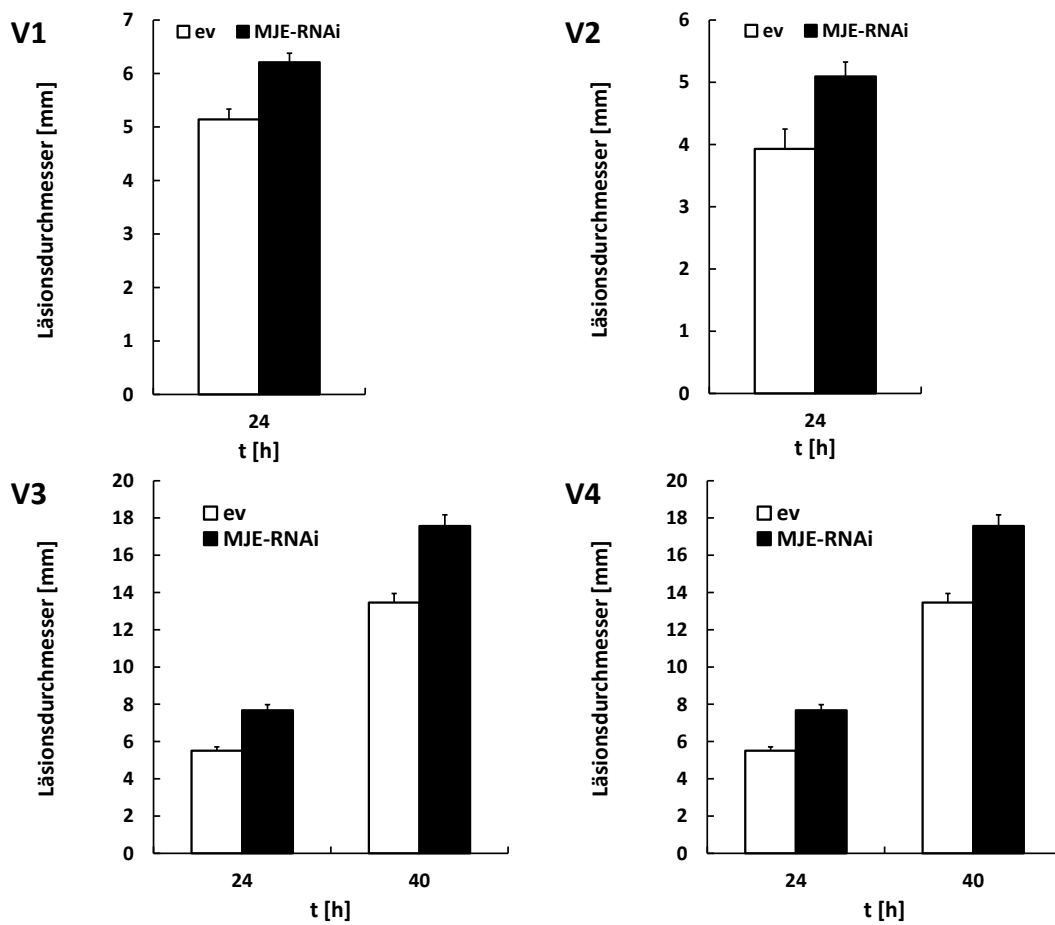


Abbildung 81: Läsionsgrößen der MJE-RNAi-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 37-60 Läsionen + SEM. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

Läsionen [mm]	ev		MJE-RNAi	
	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	5,14	-	6,21	-
V2	3,93	-	5,09	-
V3	5,36	10,01	5,88	14,28
V4	5,51	13,46	7,68	17,57

11.4.12 Läsionsgrößen der JMT-OE-Linien

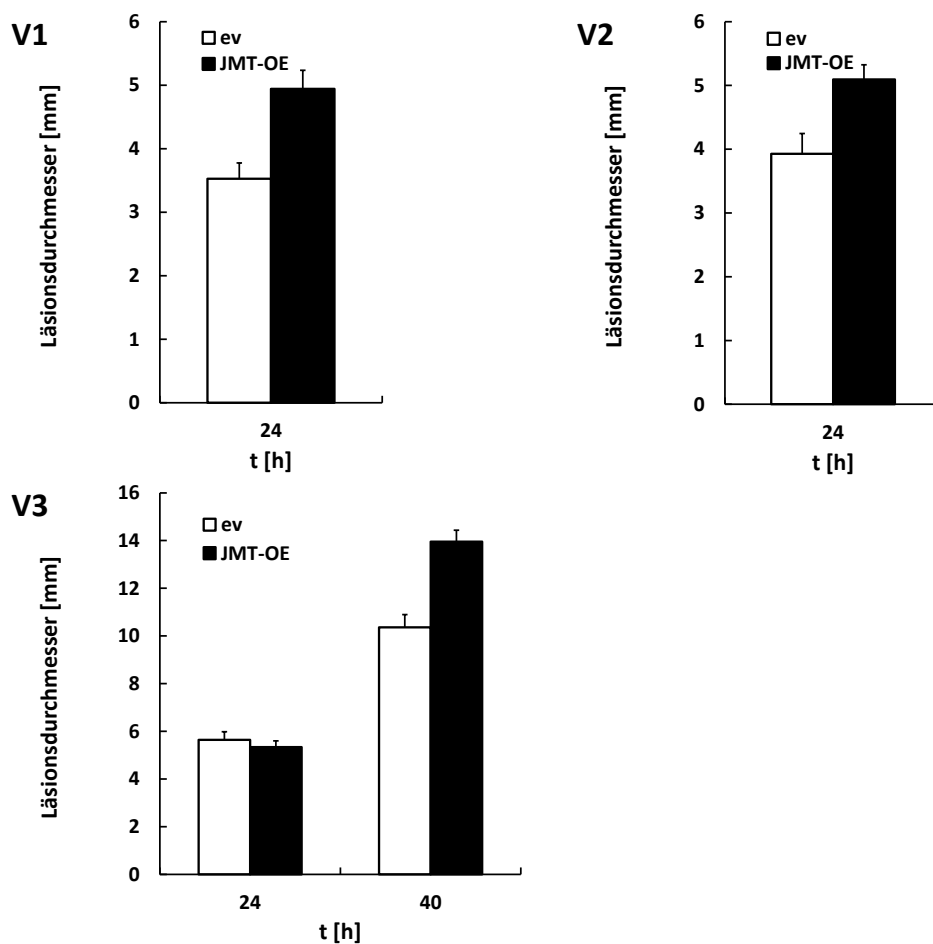


Abbildung 82 Läsionsgrößen der JMT-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 21-50 Läsionen + SEM. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

Läsionen [mm]	ev		JMT-OE	
	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	3,53	-	4,94	-
V2	3,93	-	5,09	-
V3	5,64	10,36	5,34	13,95

11.4.13 JA-Ile-Akkumulation der MJE-OE-Linien

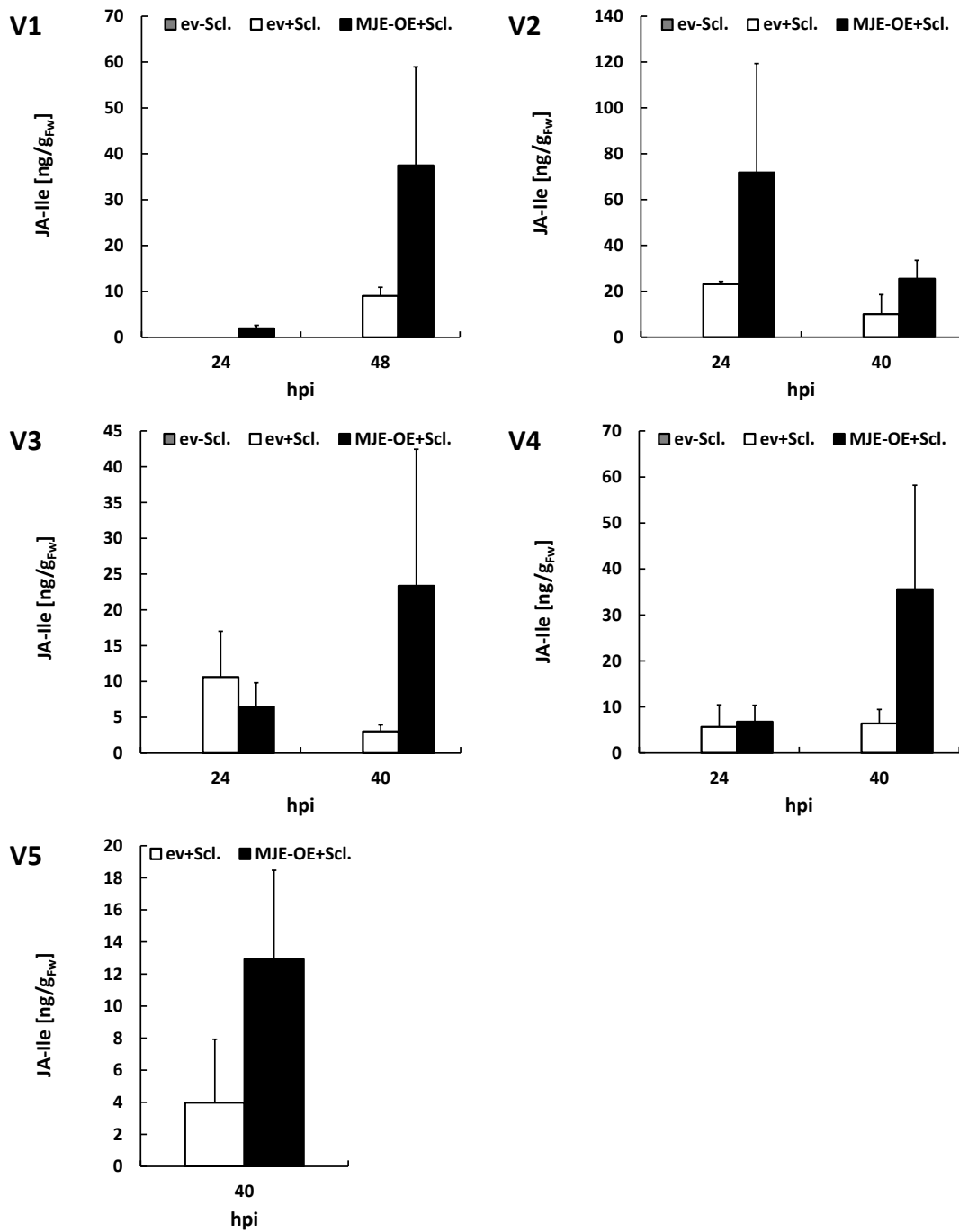


Abbildung 83: JA-Ile Akkumulation in MJE-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

JA-Ile [ng/g _{Fw}]	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>MJE-OE+Sclerotinia</i>	
	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	n.d.	n.d.	n.d.	9,06	1,97	37,47
V2	n.d.	n.d.	23,13	10,01	71,83	25,49
V3	n.d.	n.d.	10,63	3,03	6,48	23,36
V4	n.d.	n.d.	5,65	6,41	6,81	35,59
V5	-	-	-	3,97	-	12,92

11.4.14 JA-Ile Akkumulation der MJE-RNAi-Linien

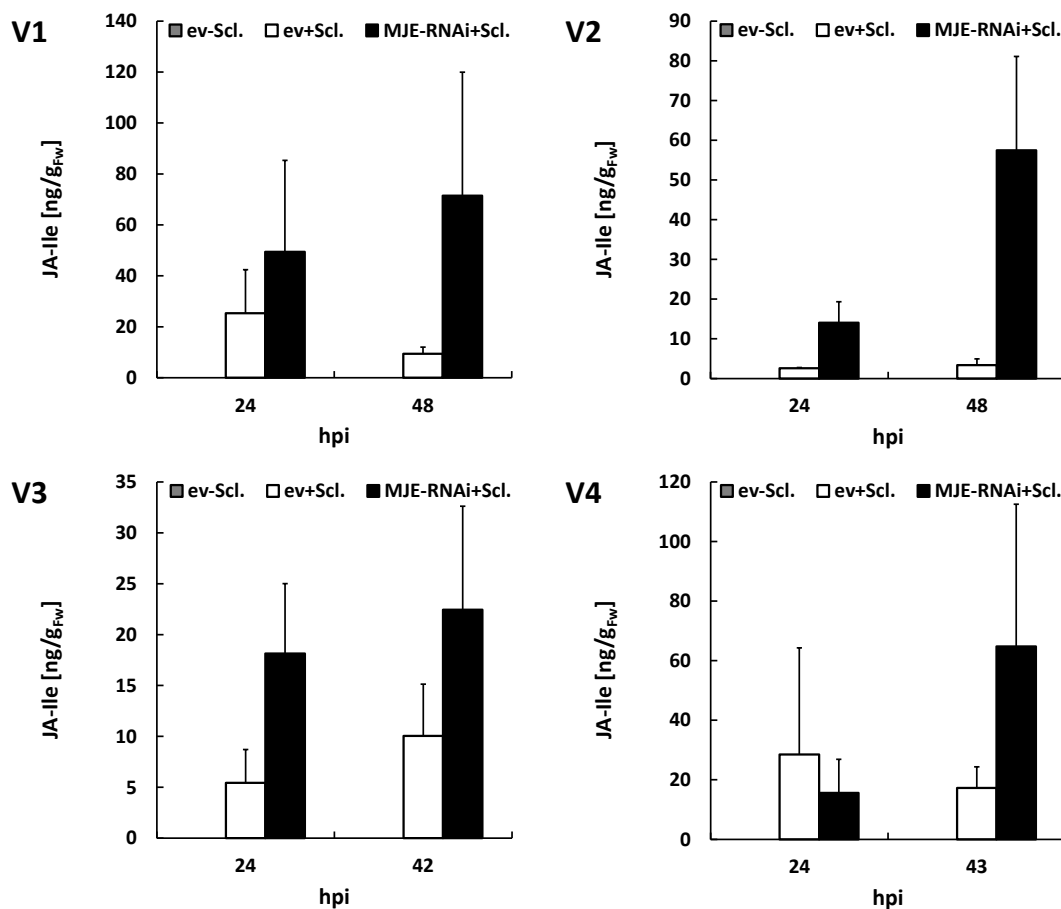


Abbildung 84: JA-Ile Akkumulation in MJE-RNAi-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

JA-Ile [ng/g _{Fw}]	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>MJE-RNAi+Sclerotinia</i>	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	n.d.	n.d.	25,34	9,41	49,42	71,49
V2	n.d.	n.d.	2,58	3,39	14,04	57,45
V3	n.d.	n.d.	5,43	10,05	18,13	22,44
V4	n.d.	n.d.	28,50	17,24	15,59	64,75

11.4.15 JA-Ile-Akkumulation der JMT-OE-Linien

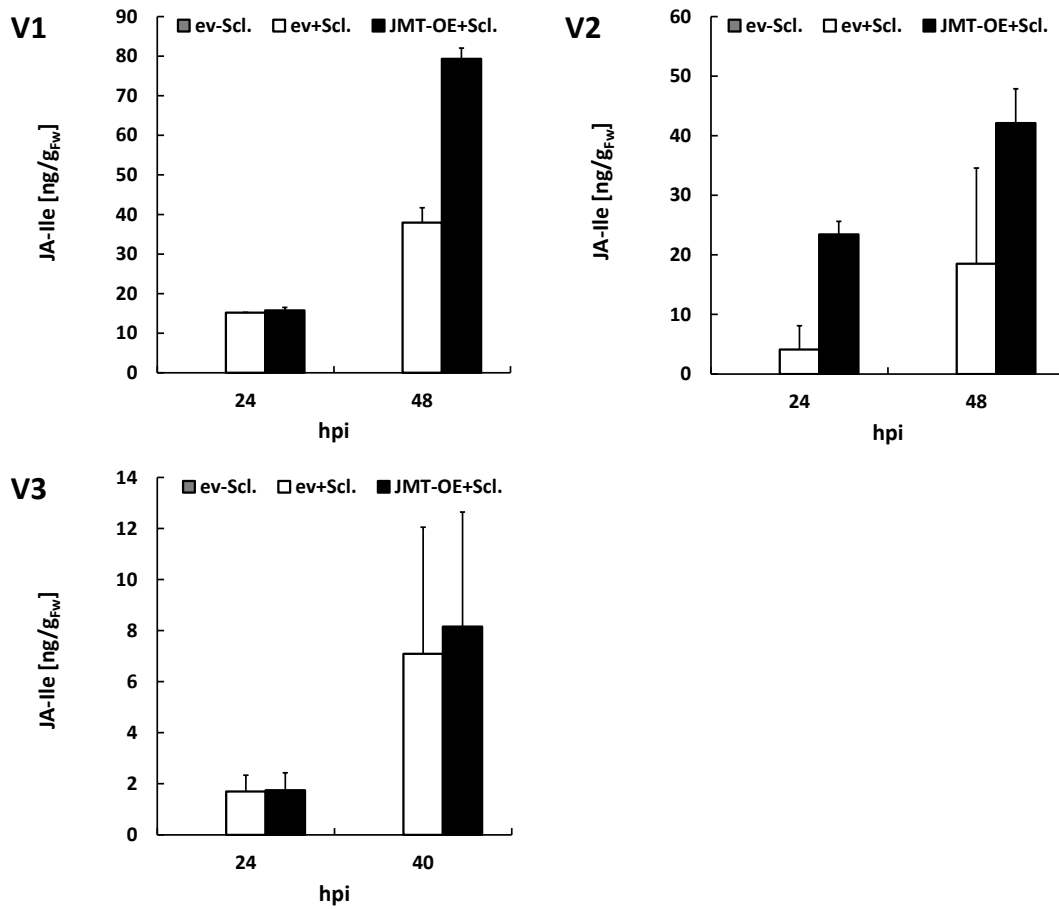


Abbildung 85: JA-Ile-Akkumulation in JMT-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

JA-Ile [ng/g _{Fw}]	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>JMT-OE+Sclerotinia</i>	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	n.d.	n.d.	15,20	37,96	15,75	79,31
V2	n.d.	n.d.	4,12	18,51	23,44	42,11
V3	n.d.	n.d.	1,69	7,09	1,75	8,15

11.4.16 12-OH-JA-Ile-Akkumulation der MJE-OE-Linien

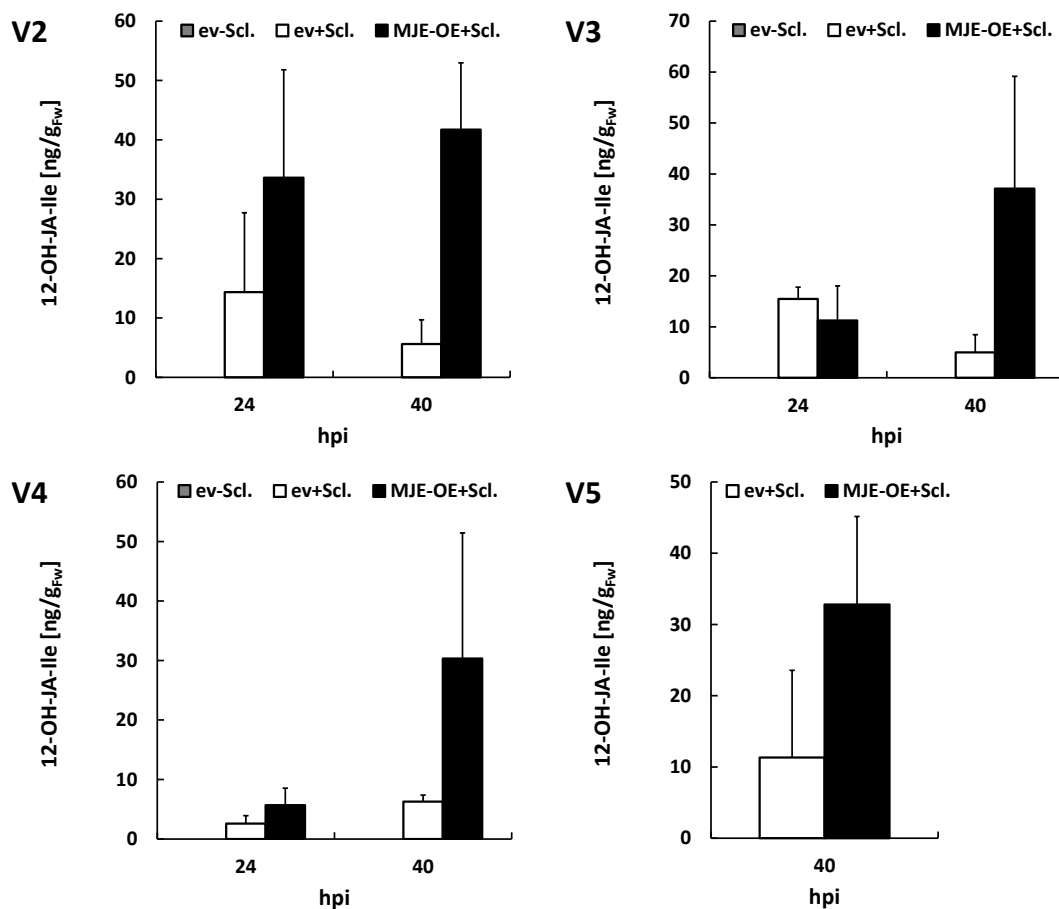


Abbildung 86: 12-OH-JA-Ile-Akkumulation in MJE-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

12-OH-JA-Ile[ng/g _{Fw}]	ev-Sclerotinia		ev+Sclerotinia		MJE-OE+Sclerotinia	
	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V2	n.d.	n.d.	14,37	5,61	33,62	41,73
V3	n.d.	n.d.	15,48	4,99	11,25	37,12
V4	n.d.	n.d.	n.d.	6,29	5,69	30,32
V5	-	-	-	11,33	-	32,84

11.4.17 12-OH-JA-Ile-Akkumulation der MJE-RNAi-Linien

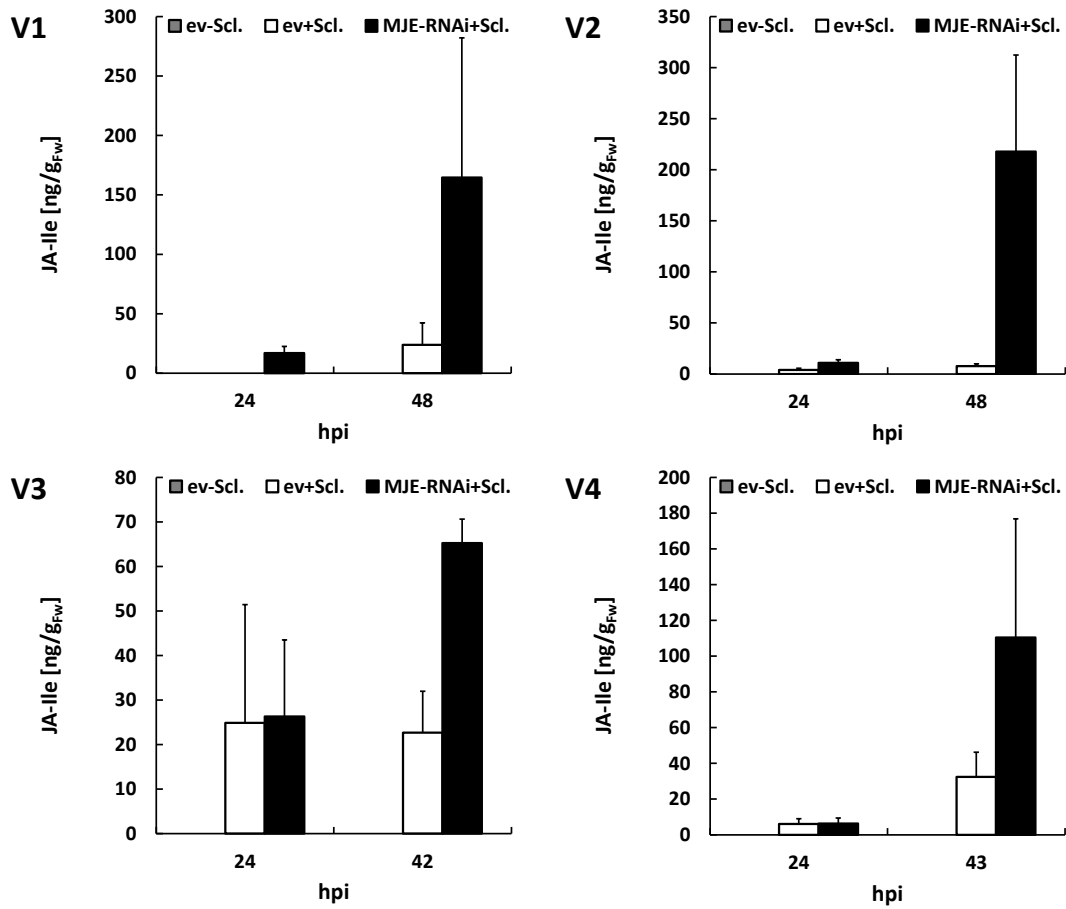


Abbildung 87: 12-OH-JA-Ile-Akkumulation in MJE-RNAi-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

12-OH-JA-Ile [ng/g _{Fw}]	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>MJE-RNAi+Sclerotinia</i>	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	n.d.	n.d.	n.d.	23,87	17,00	164,60
V2	n.d.	n.d.	3,97	7,73	10,86	217,77
V3	n.d.	n.d.	24,88	22,67	26,31	65,25
V4	n.d.	n.d.	6,09	32,39	6,28	110,44

11.4.18 OPDA-Spiegel der MJE-OE-Linien

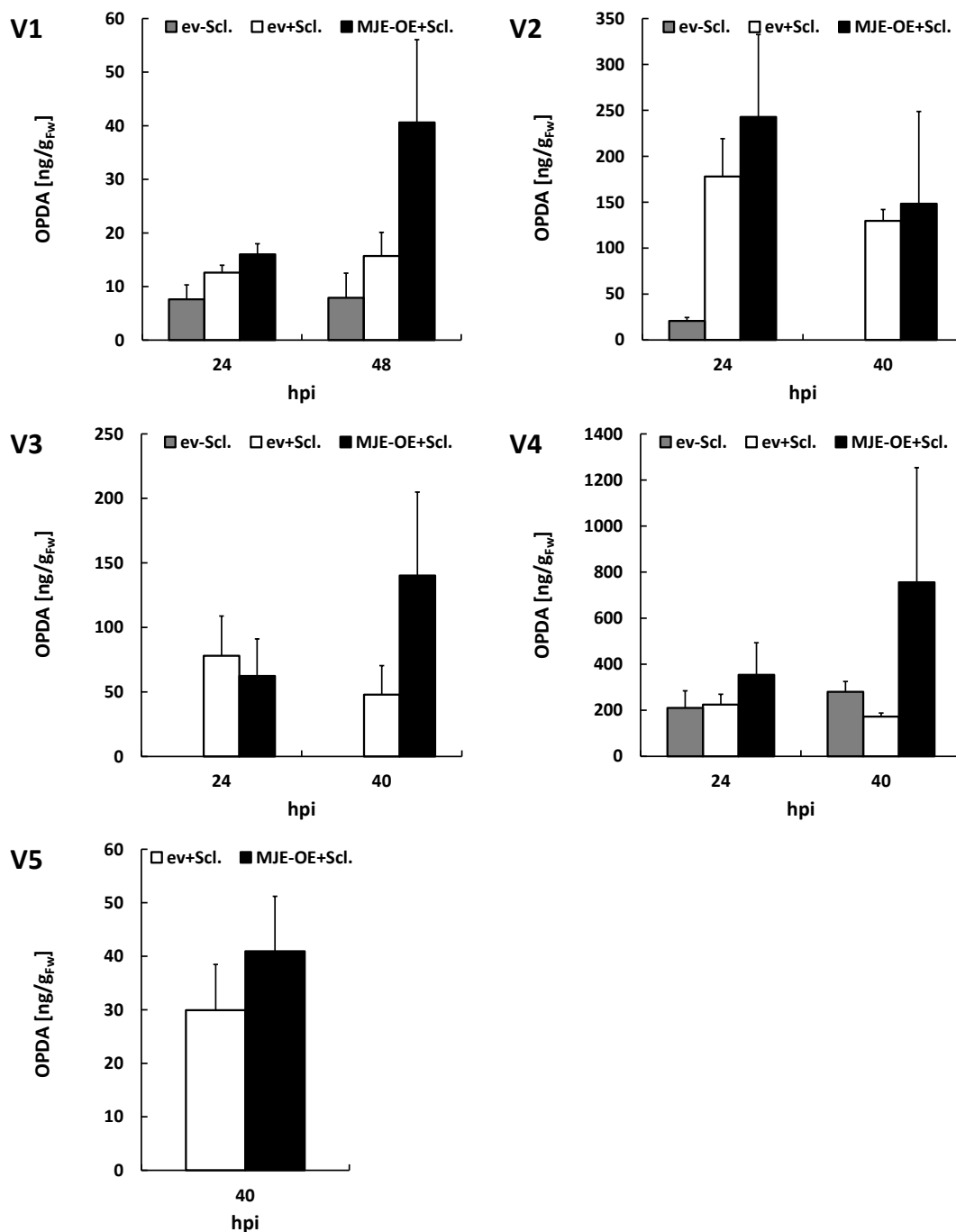


Abbildung 88: OPDA-Akkumulation in MJE-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

OPDA [ng/g _{FW}]	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>MJE-OE+Sclerotinia</i>	
	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	7,63	7,89	12,59	15,69	16,01	40,62
V2	20,71	n.d.	177,95	129,75	242,81	148,33
V3	n.d.	n.d.	77,98	62,4	62,4	140,17
V4	210,01	280,15	224,77	172,30	353,71	755,86
V5	-	-	-	29,94	-	40,94

11.4.19 OPDA-Spiegel der MJE-RNAi-Linien

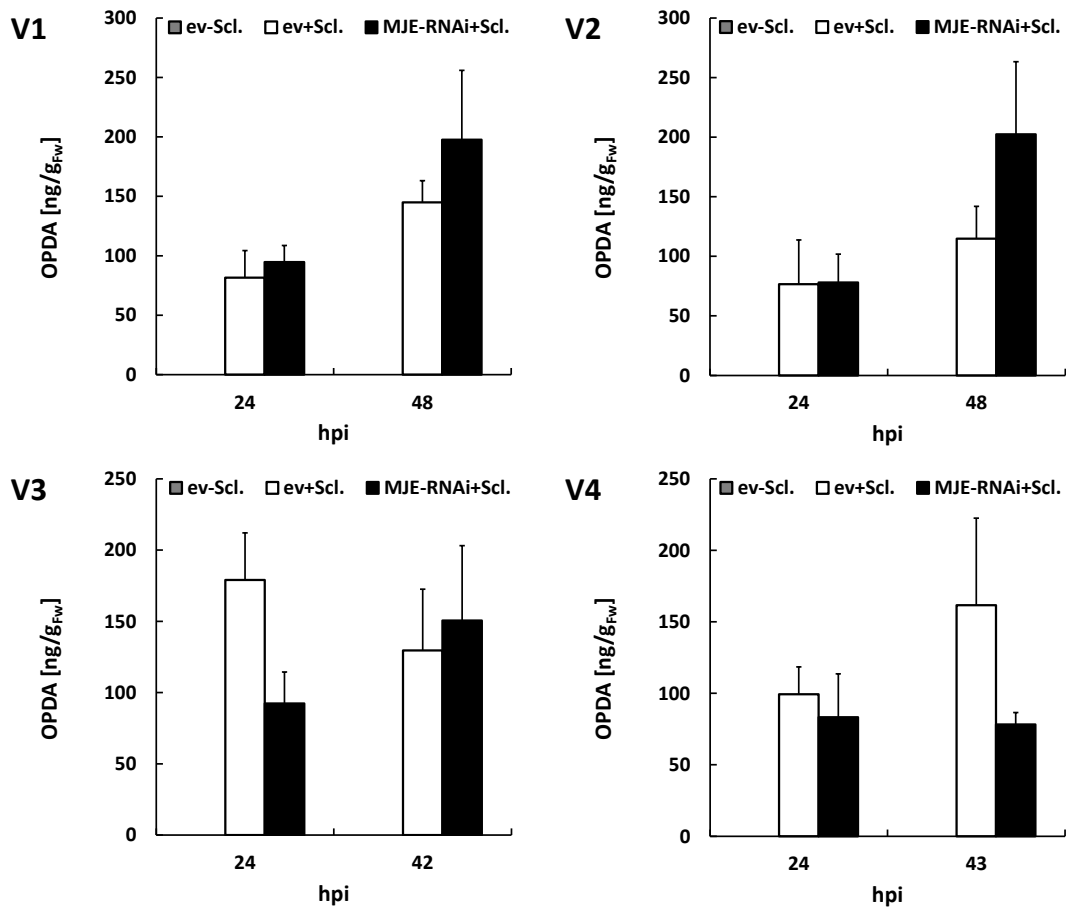


Abbildung 89: OPDA-Akkumulation in MJE-RNAi-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

OPDA [ng/g _{Fw}]	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>MJE-RNAi+Sclerotinia</i>	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V1	n.d.	n.d.	81,65	144,91	94,69	197,66
V2	n.d.	n.d.	76,63	114,73	78,05	202,43
V3	n.d.	n.d.2	178,98	129,56	92,39	150,53
V4	n.d.	n.d.	99,34	161,63	83,24	78,23

11.4.20 OPDA-Spiegel der JMT-OE-Linien

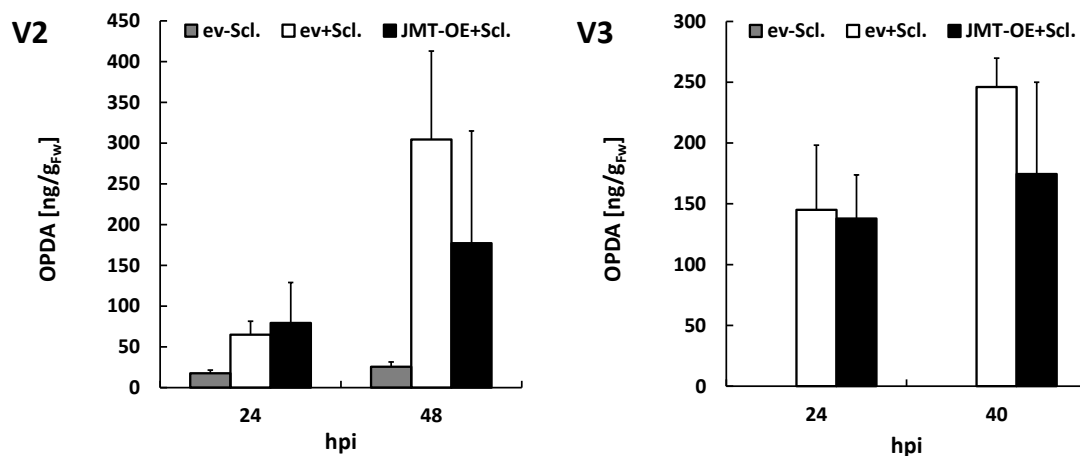


Abbildung 90: OPDA-Akkumulation in JMT-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

OPDA [ng/g _{FW}]	<i>ev-Sclerotinia</i>		<i>ev+Sclerotinia</i>		<i>JMT-OE+Sclerotinia</i>	
	24 h	48 h	24 h	40-48 h	24 h	40-48 h
V2	17,67	25,67	64,99	304,40	79,33	177,26
V3	n.d.	n.d.	145,08	246,09	137,87	174,54

11.4.21 SA-Akkumulation in MJE-OE-Linien

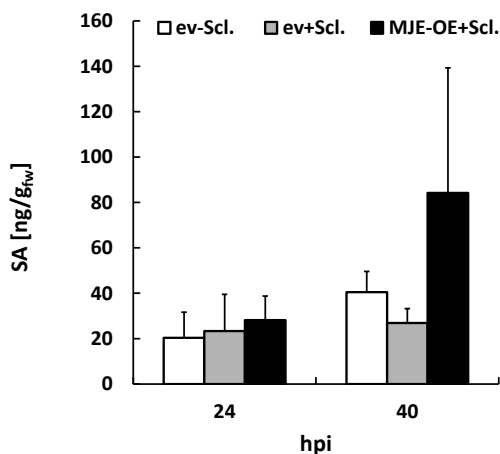


Abbildung 91: SA-Akkumulation in JMT-OE-Linien nach Pathogenbefall

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-5 biologischen Replikaten +STABW. Kontrolle vor Behandlung (0 h). ev = Kontrolllinie

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst habe und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner wurde diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Bislang habe ich noch keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg,

-Simone Findling-