

**Wirkmechanismen von Hefe-Elicitoren
sowie
die Rolle von Jasmonaten in
Pflanze-Pathogen-Interaktionen**

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

**vorgelegt von
Dipl.-Ing. agr. Ines Christine Raacke
aus Hamburg**

Würzburg 2007

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter:

Prof. Dr. M. J. Müller

2. Gutachter:

Prof. Dr. C. Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Promotionsurkunde ausgehändigt am:

.....

Für meine Familie

1. EINLEITUNG	1
1.1 PFLANZLICHE ABWEHRMECHANISMEN	1
1.2 PFLANZLICHE RESISTENZMECHANISMEN	7
1.3 SIGNALWEGE IN DER PFLANZLICHEN ABWEHR	12
1.4 ARABIDOPSIS THALIANA (L., HEYNHOLD)	20
1.5 PFLANZEN-PATHOGENE	20
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 MATERIAL	24
2.1.1 Allgemeines Material.....	24
2.1.2 Geräte	24
2.1.3 Kits	27
2.1.4 Chemikalien	27
2.1.5 Hefearten	28
2.1.6 Computerprogramme, Webseiten	28
2.2 METHODEN	30
2.2.1 Herstellung häufig verwendeter Medien, Puffer und Lösungen	30
2.2.2 Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
2.2.2 Verwendung von Hefe-Elicitoren.....	32
2.2.2.1 Behandlung der Pflanzen mit Hefesuspensionen	32
2.2.2.2 Herstellung eines Hefe-Zellwand-Elicitors.....	32
2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl.....	33
2.2.3 Anzucht von Pathogenen und Infektionen.....	33
2.2.3.1 <i>Botrytis cinerea</i>	33
2.2.3.2 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	35
2.2.3.3 <i>Fusarium graminearum</i>	36
2.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus <i>A. thaliana</i> -Blättern	38
2.2.4.2 RNA-Agarosegelelektrophorese.....	38
2.2.4.3 Northern-Blot-Analysen	38
2.2.4.3.1 Hybridisierung von Northern-Blots mit [³² P] markierten Sonden	39
2.2.4.4 Durchführung der Microarray-Analyse	40
2.2.4.5 Sondenherstellung	40
2.2.4.5.1 Präparation von <i>F. graminearum</i> DNA	40
2.2.4.5.2 Gradienten PCR	41
2.2.4.5.3 DNA-Agarosegelelektrophorese.....	42
2.2.4.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	42
2.2.4.5.5 Ligation in einen Vektor.....	43
2.2.4.5.6 Präparation von kompetenten Zellen	43
2.2.4.5.7 Bakterientransformation	44
2.2.4.5.8 Minipräparation.....	44
2.2.4.5.9 Restriktionsverdau.....	45
2.2.4.5.10 DNA-Sequenzierung	45
2.2.4.6 Herstellung eines Konstruktes zur Zerstörung des Lipoxigenase- Gens durch homologe Rekombination.....	45
2.2.4.6.1 Klonierung eines LOX-Fragmentes in den pGEM T-Easy Vektor ..	45

2.2.4.6.2 Midipräparation.....	47
2.2.4.6.3 Klonierung eines LOX-Fragmentes in den pAN7-1 Vektor.....	47
2.2.4.6.4 Strategie 1	48
2.2.4.6.5 Strategie 2	49
2.2.5 Analytische Methoden	49
2.2.5.1 Camalexin-Aufarbeitung	49
2.2.5.2 Bestimmung von JA, OPDA und SA in Blättern bzw. im Pilzmyzel	50
3. ERGEBNISSE.....	52
3.1 OPTIMIERUNG DER APPLIKATIONSART DES HEFE-ELICITORS	52
3.2 ABWEHRREAKTIONEN DER PFLANZEN NACH HEFEBEHANDLUNG	53
3.2.1 Camalexin-Akkumulation	53
3.3 VERGLEICH VERSCHIEDENER HEFE-HERKÜNFTE.....	55
3.4 AUSWIRKUNGEN DER HEFEBEHANDLUNG AUF INFESTIONEN MIT PATHOGENEN	55
3.4.1 Resistenz gegen <i>P. syringae</i>	56
3.4.1.2 Vergleich eines Hefe-Zellwand-Elicitors mit autoklavierter Bäckerhefe.....	59
3.4.2 Resistenz gegen <i>B. cinerea</i>	60
3.5 REGULATION DER GENEXPRESSION DURCH HEFEBEHANDLUNG	61
3.6 BETEILIGTE SIGNALWEGE AN DER SCHUTZWIRKUNG DURCH HEFEBEHANDLUNG	64
3.6.1 Schutzwirkung gegen <i>P. syringae</i>	65
3.6.1.1 Mutanten im Jasmonatweg	65
3.6.1.2 Mutanten im Salicylsäureweg.....	68
3.6.1.3 Mutanten in der Camalexin-Biosynthese.....	69
3.6.2 Schutzwirkung gegen <i>B. cinerea</i>	72
3.6.2.1 Mutanten im JA-, SA- und Camalexin-Weg.....	73
3.6.2.2 Untersuchung der Mechanismen gegen <i>B. cinerea</i>	77
3.7 DIE ROLLE VON OPDA UND JA IN DER RESISTENZ GEGENÜBER PATHOGENEN	80
3.7.1 Infektion der JA-Biosynthese-Mutanten mit <i>P. syringae</i>	80
3.7.2 Infektion der JA-Biosynthese-Mutanten mit <i>B. cinerea</i>	83
3.7.3 Genexpressions-Analysen nach <i>P. syringae</i> Infektion	85
3.8 JA-UNTERSUCHUNGEN VON <i>F. GRAMINEARUM</i>.....	86
3.8.1 JA-Analyse von <i>F. graminearum</i> mittels GC-MS.....	86
3.8.2 Herstellung eines <i>F. graminearum</i> Konstruktes	87
3.8.3 Infektion von <i>A. thaliana</i> mit <i>F. graminearum</i>	90
4. DISKUSSION.....	92
4.1 DIE ROLLE VON JASMONATEN IN PFLANZEN UND PILZEN IN DER PFLANZE-PATHOGEN- INTERAKTION.....	92
4.1.1 Jasmonate in Pflanzen.....	92
4.1.1.1 Die Rolle von JA und OPDA in der Resistenz gegen <i>P. syringae</i>	93
4.1.1.2 Die Rolle von JA und OPDA in der Resistenz gegen <i>B. cinerea</i>	95
4.1.2 Jasmonate in Pilzen	95
4.1.3 Weitere Abwehrmechanismen in <i>A. thaliana</i>	97
4.2 MECHANISMEN DER HEFE-VERMITTELTEN RESISTENZ.....	99

4.3 WEITERFÜHRENDE ARBEITEN.....	103
4.3.1 Hefe-Elicitor.....	103
4.3.2 Jasmonate in der Pflanze-Pathogen-Interaktion	104
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	106
6. SUMMARY	108
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	110
8. ANHANG.....	127

Abkürzungsverzeichnis

AOC	„allene oxide cyclase“
AOS	„allene oxide synthase“
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L., Heynhold)
<i>A. brassicicola</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
Bp	Basenpaare
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Rinderserumalbumin
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
cfu	„colony forming units“ bzw. Kolonie-bildende Einheit
DIEA	N,N-Diisopropylethylamine
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Deoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat
ET	Ethylen
FG	Frischgewicht
<i>F. graminearum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometer
Gst	Glutathion-S-Transferase
HPLC	„high performance liquid chromatography“ bzw. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	„hypersensitive response“ bzw. hypersensitive Reaktion
IR	„induced resistance“, bzw. induzierte Resistenz
ISR	„induced systemic resistance“ bzw. induzierte systemische Resistenz
JA	Jasmonsäure
K	Kontrolle
LOX	Lipoxygenase
MeJA	Methyljasmonat
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei der Wellenlänge 660 nm
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure
OPR	12-Oxo-Phytodiensäure-Reduktase
p.a.	pro Analysis-Qualität (analytischer Reinheitsgrad einer Substanz)
PAMPs	„pathogen associated molecular patterns“
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pdf</i>	„ <i>plant defensin</i> “
PFB	Pentalflourbenzylbromid
<i>Pr</i>	„ <i>pathogenesis related</i> “
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
ROS	„reactive oxygen species“ bzw. reaktive Sauerstoffspezies
SA	Salicylsäure
SAR	„systemic acquired resistance“ bzw. systemisch erworbene Resistenz
SD	Standardabweichung
SSC	Standard Natriumcitrat
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

Abkürzungsverzeichnis

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
WT	Wildtyp

Abkürzungen von verwendeten *Arabidopsis thaliana* Wildtypen und Mutanten

Col-0	<i>A. thaliana</i> Wildtyp Columbia
Colgl	<i>A. thaliana</i> Wildtyp Columbia <i>glabrous</i>
<i>cyp79B2/B3</i>	Camalexin-Biosynthese-Mutante (Mutante unterhalb der Tryptophan-Synthese)
<i>dde2-2</i>	JA-Biosynthese-Mutante " <i>delayed dehiscence 2-2</i> " mit Defekt in der Allenoxidesynthese
<i>jin1</i>	JA-Signaltransduktionsmutante "jasmonate-insensitive 1"
<i>nahG</i>	exprimiert ein bakterielles Gen, das für Salicylat-Hydroxylase kodiert ; degradiert SA in Catechol
<i>npr1</i>	SA-Signaltransduktions-Mutante " <i>nonexpresser of Pr1</i> "; akkumuliert normale Mengen SA; zeigt eine gestörte Expressionsregulation von <i>Pr1</i>
<i>opr3</i>	JA-Biosynthese-Mutante " <i>12-oxophytodienoic-acid-reductase3</i> " mit Defekt der OPDA-Reduktase
<i>pad3</i>	Camalexin-Biosynthese-Mutante " <i>phytoalexin-deficient 3</i> "
WS	<i>A. thaliana</i> Wildtyp Wassilewskija

1. Einleitung

In der Landwirtschaft kommt es jährlich sowohl durch biotische als auch durch abiotische Stressfaktoren zu großen Ertragseinbußen und damit zu wirtschaftlichen Schäden. Zu den biotischen Stressauslösern gehören Pathogene (Pilze, Bakterien, Viren), Herbivore, Symbionten und Konkurrenz zwischen benachbarten Pflanzen. Abiotischer Stress wird unterteilt in Licht (Qualität und Quantität), Strahlung (Röntgen, Gamma, UV), Wasser (Trockenheit, Überschwemmung), Temperatur (Kälte, Hitze), chemische- (pH-Wert, Salze, Schwermetalle) und mechanische Faktoren (Wind, Bodenbewegung, Verbiss, Druck). Diese Stressfaktoren, können einzeln oder im Zusammenspiel mehrerer Komponente unterschiedlich stark auf die Pflanzen einwirken.

In ihrer natürlichen Umwelt kommen Pflanzen mit einer Vielzahl von Pathogenen in Berührung. Auch mit dem Einsatz von Pflanzenschutzmitteln sind Krankheiten an Kulturpflanzen nicht vollständig zu unterbinden. Der Grauschimmel *Botrytis cinerea* ist z.B. in der Lage, Resistenzen gegen Fungizide auszubilden; daher sind sowohl im integrierten als auch im biologischen Anbau neue Strategien notwendig, die die Aktivierung von pflanzeigenen Abwehrmechanismen unterstützen.

1.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen

Pflanzliche Abwehrmechanismen werden in präformierte (passive) und induzierte (aktive) Abwehr unterteilt (Ebel und Scheel, 1997). Bei der konstitutiven präformierten Abwehr handelt es sich um einen primären unspezifischen Schutz der Pflanzen gegen das Eindringen von Pathogenen, die abhängig von der Pflanzenart auftritt. Mechanische Barrieren sind z.B. Kutikula und Epidermis, die durch Einlagerungen von Lignin, Suberin und Kutin verstärkt werden sowie Anzahl und Struktur der Stomata. Chemische Barrieren sind in der Zellwand gespeicherte antimikrobielle Substanzen (extrazellulär im Interzellularraum oder intrazellulär in Vakuolen). Zu den Mechanismen der induzierten Abwehr zählt die Papillenbildung am Eintrittsort des Pathogens, die Modifikation der pflanzlichen Zellwand (z.B. die Einlagerung von Kallose in die Zellwand sowie die verstärkte Quervernetzung durch Peroxidasen), die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies („oxidative burst“), die Bildung von Phytoalexinen und PR-Proteinen („pathogenesis-related proteins“) und eine hypersensitive Reaktion (HR) (Kombrink und Somssich, 1995; Otte und Barz, 2000).

Eine frühe Komponente der pflanzlichen Abwehr ist der „oxidative burst“, wobei es sich um eine schnelle Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies „reactive oxygen species“ (ROS) handelt, z.B. Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale und Superoxid-

anionen. Bei der tierischen Pathogenabwehr wird unter oxidativem Stress ein Ungleichgewicht zwischen Erzeugung und Entgiftung von ROS verstanden, das durch abiotische oder biotische Einflüsse entsteht. Nach der Erkennung des Pathogens durch die Pflanze werden verstärkt extrazelluläre ROS gebildet und akkumuliert. Die Detoxifikation von ROS erfolgt durch Antioxidantien, wie z.B. Ascorbinsäure, Glutathion und antioxidative Enzyme (z.B. SOD-Dismutase, Katalase). In *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) und Tabak ist eine membrangebundene NADPH Oxidase wichtig für die Bildung von ROS aus atmosphärischem Sauerstoff (Kombrink und Somssich, 1995). Bei optimalen Wachstumsbedingungen werden ROS hauptsächlich in Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen produziert.

Vor allem in der inkompatiblen Interaktion (siehe 1.2) kommt es nach Pathogeninfektion zu einer Abwehrreaktion, der sog. hypersensitiven Reaktion („hypersensitive response“) (HR), um eine Ausbreitung in das bisher nicht infizierte pflanzliche Gewebe zu verhindern. Stakman beschrieb 1915 einen schnellen und lokalen Zelltod nach Infektionen mit einem Rostpilz an Getreide und prägte den Begriff hypersensitive Reaktion. Die HR ist gekennzeichnet durch ein innerhalb weniger Stunden nach Pathogenangriff auftretendes lokal begrenztes Absterben von pflanzlichen Zellen in unmittelbar angrenzender Umgebung des Infektionsortes. Es handelt sich bei diesem aktiven Vorgang der Pflanzen um eine effiziente Abwehrreaktion und stellt eine Form des programmierten Zelltods (PCD = „programmed cell death“) dar (Heath, 2000). Auf zellbiologischer Ebene zeigt der programmierte Zelltod Ähnlichkeiten zum apoptotischen Zelltod tierischer Zellen (Lam et al., 2001). Die Nekrotisierung des befallenen Gewebes verhindert die Ausbreitung der eingedrungenen biotrophen Pathogene. Dagegen ist eine HR-Reaktion bei Infektionen von nekrotrophen Pathogenen, die sich nicht von lebendem Gewebe ernähren, für das Pathogen von Vorteil. Die HR ist wichtig für die lokale und systemische Resistenz. Nicht in jedem Fall kommt es bei Pathogeninfektionen zur Ausbildung von HR. Die *A. thaliana* Mutante *dnd1* („defense, no death“) ist unfähig, HR zu bilden, zeigt aber eine Resistenz gegenüber pathogenen Bakterien (Clough et al., 2000); im Gegensatz dazu sind die *eds* Mutanten („enhanced disease susceptibility“) trotz HR anfällig gegenüber Pathogenen (Rogers und Ausubel, 1997). Neben *A. thaliana* werden in der Literatur auch in anderen Pflanze-Pathogen-Interaktionsmodellen Beispiele diskutiert, die belegen, dass zwischen HR und der Pathogenvermehrung kein direkter Zusammenhang bestehen muss (Kombrink und Schmelzer, 2001). Beispiele für diese Interaktionen sind *Pseudomonas syringae* „*Hrp*-mutants“ an Bohnen (Jakobek und Lindgren, 1993) und *Cladosporium fulvum* an Tomatenpflanzen (Hammond-Kosach und Jones, 1994). Nach Infektionen von Kartoffeln mit *Phytophthora* konnte nachgewiesen werden, dass das

Pathogenwachstum nur verringert wird, es aber zu keinem Stillstand in der Vermehrung kommt (Kombriink und Schmelzer, 2001).

Die Voraussetzung für eine Auslösung der induzierten Abwehrmechanismen ist das Erkennen des Pathogens durch die Pflanze. Dabei spielen endogene und exogene Elicitoren eine Rolle. Endogene Elicitoren sind Zellwandbruchstücke der Pflanze, die durch hydrolytische Enzyme freigesetzt werden, während als exogene Elicitoren (PAMPs siehe unter 1.2.) Oberflächenstrukturen des Pathogens bezeichnet werden oder sekretierte Substanzen, wie Oligosaccharide, Glyko- oder Lipoproteine, Proteine, Peptide oder Fettsäuren. Keen et al. definierte 1975 Elicitoren (lat. elicitare = hervorrufen) noch als Verbindungen, die die Akkumulation von Phytoalexinen anregen. Heute werden Elicitoren z.B. von McDowell und Dangl (2000) allgemein für Substanzen bezeichnet, die in der Pflanze spezifische Abwehrreaktionen auslösen können, z.B. physikalische, chemische, abiotische (BTH, Metallionen, Oxalate) oder biotische Signale (Hefe, Pilz-Zellwände, Proteine und Kohlenhydrate) (Boller, 1995; Nürnberger, 1999) (siehe Tab. 1.1). Von den Elicitoren biotischer Herkunft sind Kohlenhydrate am häufigsten vertreten, bestehend z.B. aus Chitosan, Chitin, Laminarin, β -Glucan (Radman et al., 2003).

Nach einer Elicitorbehandlung werden in Pflanzen oder Zellkulturen verschiedene biochemische Vorgänge beobachtet, wie z.B. die Stimulierung von K^+ und Cl^- Efflux, die Produktion von ROS, eine Akkumulation von *PR*-Proteinen, eine HR-Reaktion, strukturelle Veränderungen der Zellwand (Kallus-Deposition oder Lignifikation), die Bildung von Phytoalexinen (Isoflavonoiden und Sesquiterpenoiden), eine Synthese von JA und SA sowie eine SAR (Radman et al., 2003). Pflanzenbehandlungen mit Elicitoren können aufgrund der reduzierten Reaktion die Resistenz der Pflanzen gegenüber Pathogenen lokal und systemisch erhöhen.

Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wird seit vielen Jahren als Elicitor eingesetzt, weil es für Pflanzen kein bekanntes Pathogen darstellt und bisher keine negativen Einflüsse z.B. auf Erträge, oder phytotoxische Effekte, wie Gelbfärbungen, Nekrosen oder Stauchung beobachtet werden konnten (Lyon und Newton, 1997). Es kann davon ausgegangen werden, dass Hefe verschiedene PAMPs enthält, weil für Zellwandpräparationen, Glykopeptide und Proteine eine Elicitorwirkung beschrieben wurde. Hefe wird in unterschiedlicher Form in Versuchen verwendet, z.B. als autoklavierte Hefe bzw. autoklavierte Hefezellwände oder als lebende Hefe. Erste Versuche mit Hefe wurden mit Hefezellwänden in verschiedenen pflanzlichen Zellkulturen durchgeführt. Die Behandlung von *Medicago sativa* und *Catharanthus roseus* Suspensionskulturen führte zu einer Synthese von ROS, zu einer Phytoalexinakkumulation und zu einer erhöhten Peroxidaseaktivität (Baier et al., 1999; Pauw et al., 2004). Ebenso konnten von Baier et al. (1999) und Meyer et al. (2001) in

Tabakzellkulturen sowohl eine Alkalinisierung als auch ROS-Produktion nachgewiesen werden. In *Catharanthus roseus* und *A. thaliana* Zellen kommt es zu einer Erhöhung von cytosolischem Calcium, das notwendig ist für eine Induktion der JA Akkumulation (Klüsener et al., 2002; Pauw et al., 2004). Eine direkte Erhöhung endogener JA und ihrer Methylester konnte von Gundlach et al. (1992) in Zellkulturen von *Rauvolfia canescens* und *Eschscholtzia californica* beobachtet werden. Das Gleiche konnte Menke et al. (1999) in *Catharanthus roseus* Zellkulturen, die mit autoklavierter Hefe behandelt wurden, nachweisen. Suzuki et al. (2005) zeigte in *Medicago truncatula* 1 bis 2 Stunden nach der Behandlung mit einem Hefezellwand-Elicitor eine über 30fach induzierte Expression von PAL („L-phenylalanine ammonia-lyase“). PAL ist ein wichtiges Enzym des Phenylpropanoidstoffwechsels. Generell ist PAL ein Stressenzym.

Elicitoren	Herkunft	Pflanze/Zellkulturen	Referenzen
Chitosan	Chitinfragmente von Pilzzellwänden	generell	Rabea et al., 2003
Lipopolysaccharide	Gram-negativ Bakterien	generell	Scheidle et al., 2005
<i>flg22</i>	22-Aminosäuren N-terminales Fragment von bakteriellem Flaggelin	generell	Zipfel et al., 2004
Hefezellwände	Zellwände von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Medicago sativa</i>	Edwards und Dixon, 1991
Hefe Extrakt	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Catharanthus roseus</i> Wein, Soja	Menke 1999 Reglinski et al., 1994; Repka et al., 2001
Hefe-Elicitor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	verschiedene Pflanzenarten	Gundlach et al., 1992
Brauereihefe	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Soja	Hahn und Albersheim, 1978
BABA	β -Aminobuttersäure	<i>A. thaliana</i>	Zimmerli et al., 2001
BTH	Benzo-Thiadiazol	Weizen, Reis <i>A. thaliana</i> Tabak, Bohne, Gurke	Morris et al., 1998; Siegrist et al., 1997 Lawton et al., 1996
Pen	trockenes Myzel von <i>Penicillium chrysogenum</i>	Wein, Tomate, Gurke, Zwiebel	Thuerig et al., 2006a

Tabelle 1.1: Ausgewählte Elicitoren dargestellt mit den am häufigsten untersuchten Pflanzenarten bzw. Zellkulturen (verändert nach Garcia-Brugger et al., 2006).

Auch in intakten Pflanzen konnte eine Induktion von Abwehrmechanismen durch Hefeanwendungen erzielt werden. Hahn und Albersheim (1978) setzten autoklavierte Brauereihefe als Elicitor in Sojabohnen ein und konnten die Akkumulation des Phytoalexins Glyceollin nachweisen. Von von Lyon et al. (1995) wird eine Hefeanwendung als Möglichkeit zur Reduzierung von Fungizideinsätzen in der Landwirtschaft betrachtet. Bei einem Vergleich zwischen Labor- und Feldversuchen konnte allerdings durch autoklavierte Hefe-Zellwände an Gerste im Feld Mehltauinfektionen weniger effektiv reduziert werden als in Labortests unter kontrollierten Bedingungen (Reglinski et al., 1994). Behandlungen von Salat im Gewächshaus mit Hefe führten zu einer Reduzierung der Infektionen mit *B. cinerea* und *Rhizoctonia solani* von 50-70 % (Reglinski et al., 1993).

In Versuchen mit lebender Hefe wurden *Saccharomyces cerevisiae* von Elad et al. (1994) bzw. saprophytische Hefeisolate (*Rhodotorula glutinis* und *Cryptococcus albidus*) als Elicitoren an Tomaten und Bohnen getestet. Die saprophytischen Hefeisolate reduzierten die Sporulation von *B. cinerea*. Zwischen der Hefe und den Pflanzenpathogenen entsteht eine Nahrungskonkurrenz als antagonistischer Wirkmechanismus.

Hefepreparate wie "Myco-Sin", "Blossom-Protect" und „Saccaropulvin 25 PU“, werden in der Praxis gegen Feuerbrand (*Erwinia amylovora*) an Apfel- und Birnenbäumen eingesetzt; bzw. Saccaropulvin 25 PU ebenso gegen *B. cinerea* (Sesan et al., 1999).

Zu den induzierten Abwehrmechanismen gehören auch die Phytoalexine (griech. phyton = Pflanze, alexin = Abwehr), die erstmals von Müller und Börger (1941) beschrieben wurden. Es handelt sich um niedermolekulare, antimikrobielle Komponenten von Pflanzen, die als Abwehr gegen Pathogeninfektionen z.B. als Reaktion auf eine Infektion mit dem virulentem und avirulentem Stamm von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Tsuji et al., 1992; Glazebrook und Ausubel, 1994) bzw. durch den Pilz *Cochliobolus carbonum* (Glazebrook et al., 1997) und Behandlungen mit abiotischen Elicitoren akkumuliert werden. Diese Akkumulation erfolgt oft in unmittelbarer Nähe zur Infektionsstelle (Dixon, 1986). Phytoalexine sind nicht oder nur in geringen Mengen in gesundem Gewebe vorhanden, werden aber nach Infektion schnell und in großen Mengen gebildet (Tsuji et al., 1992; Denby et al., 2004). Das erste entdeckte Phytoalexin ist das Rishitin, ein Sesquiterpen aus Kartoffeln (Müller und Borger, 1940). In *A. thaliana* ist Camalexin („3-thiazol-2'-yl-indole“) das hauptsächlich vorkommende Phytoalexin (Tsuji et al., 1992; Glazebrook und Ausubel, 1994; Rogers et al., 1996), das nach Infektionen mit Bakterien und Pilzen nachgewiesen wurde. Die Synthese von Camalexin (Abb. 1.1) erfolgt ausgehend von Tryptophan über Indole-3-Acetaldoxime (Glawischnig et al., 2004).

Um die Rolle von Camalexin in der Pathogenabwehr zu untersuchen, wurden Camalexin-defiziente Mutanten isoliert und im Vergleich zum Wildtyp (WT) getestet. Bisher wurden in *A. thaliana* die Phytoalexin-defizienten Mutanten *pad1* bis *pad5* (Glazebrook und Ausubel, 1994; Glazebrook et al., 1997) und *cyp79B2/B3* (Zhao et al., 2002) beschrieben. Keine Akkumulation von Camalexin ist in den Phytoalexin-defizienten Mutanten vorhanden; in der *pad3* Mutante (phytoalexin-deficient 3) (Abb. 1.1), die einen Defekt im Cytochrome P450 aufweist, ist eine Restakkumulation von Camalexin nachzuweisen (Kliebenstein et al., 2005). Diese Mutante weist ähnliche Empfindlichkeit gegenüber *P. syringae*, *Peronospora parasitica*, *Erysiphe orontii* und *B. cinerea* auf wie der WT Col-0. Empfindlicher als der WT ist *pad3* gegenüber *Alternaria brassicicola* (*A. brassicicola*) (Heath, 2000). Die Mutanten *pad1*, *pad2* und *pad4* zeigen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber *P. syringae*, im Gegensatz zu *pad3* und *pad5* (Glazebrook, 1997).

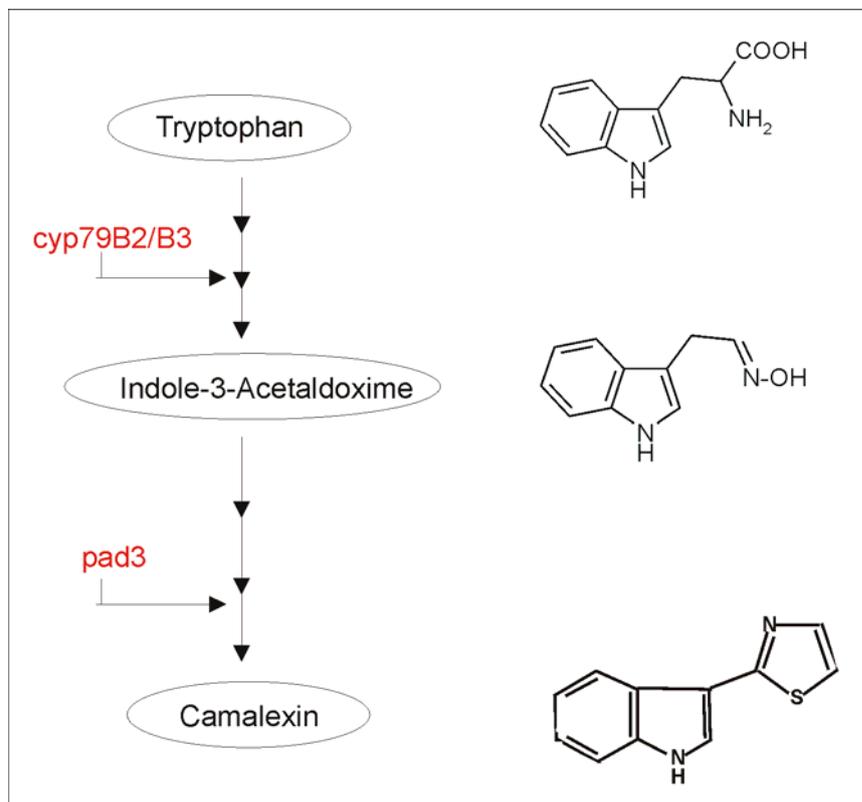


Abbildung 1.1: Camalexin-Biosynthese ausgehend von Tryptophan. Abbildung verändert nach Kliebenstein et al. (2005). Dargestellt ist die Lokalisation der Camalexin-Mutanten *cyp79B2/B3* und *pad3* in der Camalexin-Biosynthese.

Die Camalexin-defiziente Doppelmutante (Glawischnig et al., 2004) *cyp79B2/B3* (Abb. 1.1) zeigte bei Kliebenstein et al. (2005) eine größere Empfindlichkeit gegenüber *B. cinerea* Isolaten als *pad3*. Eine weitere Gruppe von allerdings konstitutiv vorhandenen Abwehrstoffen sind Glucosinolate, die von Aminosäuren hergeleitet werden und durch Cytochrome P450, die zur *CYP79* Familie gehören, umgewandelt werden. In *A.*

thaliana katalysieren *CYP79B2* und *CYP79B3* die Umwandlung von Tryptophan in Indol-3-Acetaldoxime (Hansen et al., 2001) und sind an der Synthese von Camalexin, Indolessigsäure (IAA) und Glucosinolaten beteiligt.

Neben niedermolekularen Abwehrstoffen spielt die Induktion von Pr-Proteinen („pathogenesis related“) in vielen Pflanzenarten nach Pathogenbefall, Elicitorbehandlung oder generell bei biotischem Stress eine Rolle (van Loon et al., 1994). Dabei handelt es sich um intra- und extrazelluläre Proteine, die sowohl lokal in infizierten Blättern als auch systemisch im pflanzlichen Gewebe gebildet werden. Bisher wurden 17 Familien von PR-Proteine gefunden (Christensen et al., 2002). Elf Familien wurden in Tomate und Tabak identifiziert (van Loon, 1997; van Loon and van Strien, 1999). Die *Pr-1* Familie hat bisher unbekannte biochemische Funktionen. Andere Familien enthalten Glucanasen (z.B. *Pr-2*, eine β -1.,3-Glucanase), Chitinasen (*Pr-3*, *Pr-4*, *Pr-8*, *Pr-11*), Thaumatin-ähnliche Proteine (*Pr-5*), Proteinaseinhibitoren (*Pr-6*), Endoproteasen (*Pr-7*), eine Peroxidase (*Pr-9*), Ribonuclease-ähnliche Proteine (*Pr-10*), Defensine (*Pr-12*), Thionine (*Pr-13*), Lipid-Transfer-Proteine (*Pr-14*), Oxalatoxidasen (*Pr-15*), Oxalatoxidase-ähnliche Proteine (*Pr-16*) und Proteasen (*Pr-17*).

Pr-1, *Pr-2* und *Pr-5* werden durch Salicylsäure (SA) induziert. *Pr-1* wird als Marker für die SA-abhängige Pathogenabwehr angesehen (Glazebrook, 2001). Die Bedeutung der *Pr*-Gene in der Pathogenabwehr kann durch *A. thaliana* Mutanten, die eine veränderte *Pr*-Genexpression zeigen, verdeutlicht werden. Die Mutante *npr1* („nonexpresser of *pr*-genes“) ist gestört in der SA-Signaltransduktion und zeigt in Versuchen eine erhöhte Sensitivität gegenüber diversen Pathogenen (Glazebrook, 1999). Eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen zeigen die *cpr* Mutanten („constitutive expresser of *pr*-genes“), die konstitutiv *Pr*-Gene exprimieren (Bowling et al., 1997; Clarke et al., 1998).

1.2 Pflanzliche Resistenzmechanismen

Durch Pathogenbefall ausgelöste pflanzliche Resistenzen werden in Nichtwirt- und Wirt-Resistenzen unterteilt.

Evolutionär älter ist die Nichtwirt-Resistenz. Sie beruht auf präformierter und induzierter Abwehr (der Erkennung verschiedener Mikroorganismen oder Elicitoren durch die Pflanze). Nichtwirt-Resistenz bedeutet, dass Pflanzen unter natürlichen Bedingungen gegenüber den meisten Mikroorganismen resistent sind. Zur Ausbildung von lokal induzierten Abwehrmechanismen kommt es durch den Kontakt zwischen Pathogen und Pflanze. Die Nichtwirt-Resistenz führt zu einer inkompatible Interaktion zwischen Pathogen und Pflanze, bei der die Pflanze in der Lage ist, durch strukturelle Barrieren bzw. toxische Komponente die Besiedlung durch Pathogene zu verhindern. Ist ein

Pathogen in der Lage, die pflanzlichen Abwehrmechanismen zu überwinden, ist die Interaktion kompatibel und die Pflanze erkrankt (Heath, 2000).

Pathogene werden durch bestimmte Strukturen, den sog. PAMPs („pathogen-associated molecular patterns“), die in Pflanzen nicht vorkommen, von der Pflanze erkannt. PAMPs sind für die Pathogenität und den bakteriellen Stoffwechsel wichtig. Der Begriff PAMPs ist abgeleitet von der angeborenen Immunreaktion („innate immunity“) bei Tieren, wobei die PAMPs typische Merkmale von Mikroorganismen sind. Beispiele für PAMPs sind Oligosaccharide, Lipopolysaccharide, Peptidoglucone und Proteine. Das am besten untersuchte Beispiel für PAMPs in Pflanzen ist das Flagellin. Flagellin ist die Hauptkomponente des bakteriellen Flagellums (Grundbaustein der Geißeln von *Pseudomonas* und anderen gramnegativen Bakterien) (Felix et al., 1999) und wird als Elicitor für *A. thaliana* (Gomez-Gomez et al., 1999) und für Zellkulturen verschiedener Pflanzenarten verwendet. Als Elicitor in *A. thaliana* und Tomate wirkt ein 15 bis 22 Aminosäuren langes Fragment (*flg15* und *flg22*) von Flagellin. *A. thaliana* besitzt einen speziellen Erkennungs-Protein-Komplex für *flg22*, das eine spezifische FLS2 (FLAGELLIN SENSITIVE2) „Leucine-rich repeat“ (LRR) Rezeptor Kinase enthält (Gomez-Gomez et al., 2001). Weiterhin bildet FLS2 einen „pattern-recognition“-Rezeptor, der die Spezifität der Flagellin-Wahrnehmung bestimmt (Chinchilla et al., 2006). Die Interaktion von *flg22* und FLS2 führt zu einer Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Alkalinisierung des Mediums, Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und einer Induktion von *Pr*-Proteinen (Felix et al., 1999; Gomez-Gomez et al., 1999). Als Folge kommt es zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Pilzen (*B. cinerea*) und Bakterien (*P. syringae*). Versuche mit der Mutante *fls2-17* (FLS2 „loss-of function mutation“) zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber *P. syringae* DC3000 (Zipfel et al., 2004) im Vergleich zum WT. Untersuchungen von Sun et al. (2006) weisen darauf hin, dass das pflanzliche Abwehrsystem nicht einheitlich alle Flagelline eines speziellen Pathogens (z.B. *Xanthomonas campestris pv campestris*) detektieren kann.

Bisher wurden Rezeptoren für Heptaglukan aus Oomyceten, pilzlichen Xylanasen und bakteriellem Flagellin identifiziert (Gomez-Gomez und Boller, 2000). Für ein bakterielles PAMP *EF-Tu* an *A. thaliana* und *Nicotiana benthamiana* wurde von Zipfel et al. (2006) eine neue Rezeptor-Kinase (EFR) beschrieben.

Bei der Wirt-Resistenz haben die Pflanzen die Möglichkeit, das Pathogen zu detektieren und eine effektive Abwehr zu aktivieren. Die Wirt-Resistenz ist häufig nur gegen eine oder wenige Rassen eines avirulenten Pflanzenpathogens gerichtet. Die Wirt-Resistenz lässt sich in horizontale und vertikale Resistenz unterteilen. Die horizontale Resistenz (bzw. Feldresistenz) ist rassenunspezifisch, wobei die Pflanzen resistent gegen alle Rassen eines Pathogens sind. Bei der vertikalen Resistenz hat ein

bestimmter Wirtsgenotyp eine vollständige Resistenz gegen eine bestimmte Pathogenrasse. Diese Form der Resistenz wurde modellhaft für bakterielle Pathogene in der Gen-für-Gen-Hypothese von Flor (1971) beschrieben. In der Wirt-Pathogen-Interaktion muss ein pflanzliches Resistenzgen und ein Avirulenzgen im Pathogen vorhanden sein. Die komplementären Genprodukte, das Resistenzgen (R-Gen) der Pflanze und das Avirulenzgen (Avr-Gen) des Pathogens, sind dominant vererbt. Die Wirtspflanze ist resistent und reagiert schnell mit spezifischen Resistenzreaktionen, wenn das Pathogen das komplementäre Avirulenzgen besitzt (inkompatible Interaktion). Bei Abwesenheit eines der beiden Gene liegt eine kompatible Interaktion vor und es kommt zur Infektion der Pflanze. Ein indirekter Mechanismus zwischen R- und Avr-Proteinen wird durch die Guard-Hypothese beschrieben (Dangl und Jones, 2001). Trotz der großen Anzahl von Pathogenen kodieren R-Gene lediglich für fünf Proteinklassen. Die größte Klasse der R-Gene kodiert NB-LRR-Proteine, die eine „nucleotide-binding site“ und „leucine-rich repeat“ (NB-LRR) Domäne besitzen. Die LRR-Domäne wurde in unterschiedlichen Proteinen mit Funktionen in Protein-Protein-Interaktionen, Peptid-Liganden Bindung und Protein-Kohlenhydrat-Interaktion entdeckt (Jones und Jones, 1996). Viele NB-LRR Klassen besitzen eine Domäne mit Homologie zu intrazellulären Domänen von *Drosophila melanogaster* Toll bzw. Interleukin-Rezeptoren aus Säugern (TIR-NB-LRR) oder verfügen über „coiled-coil“-Domänen (CC-NB-LRR), wobei der N-Terminus die Sekundärstruktur einer superspiralisierten α -Helix ausbildet.

Für eine Infektion der Wirtspflanzen besitzen viele Gram-negative bakterielle Pathogene ein Transportsystem, durch das proteinäre Virulenzfaktoren in die Pflanzenzelle transportiert werden; das sog. TTSS Typ III Sekretionssystem („type three secretion system“) (Preston, 2000; He et al., 2004). Die Abwehr der Wirtszelle wird unterbunden und das bakterielle Wachstum gefördert (Chrisolm et al., 2006). Pflanzen haben in einigen Interaktionen Mechanismen entwickelt, um die Aktivität der Resistenzfaktoren durch Resistenzproteine zu erkennen. Die Resistenzfaktoren werden dabei zu Avirulenzsignalen. Neben den pflanzlichen Pathogenen tritt TTSS auch in tierischen Pathogenen auf. TTSS ist in *Pseudomonas syringae* nach Hauck et al. (2003) für die Pathogenität und die Auslösung von HR wichtig. Zusätzlich zum Typ III Sekretionssystem existiert in *Pseudomonas syringae* ein weiterer nicht-wirtsspezifischer Virulenzfaktor, das Coronatin. Bei Coronatin handelt es sich um eine Polyketid-Aminosäurederivat-Verbindung, die an der Symptomausprägung und am Krankheitsverlauf beteiligt ist. Coronatin wurde vom Bakterium *Pseudomonas syringae* var. *atropurpurea* isoliert (Ishihara et al., 1977), wird aber auch von anderen Pathovaren von *Pseudomonas syringae* gebildet, z.B. *tomato*, *morsprunorum* und *glycinea*. Coronatin hat strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu Oxophytodiensäure (Weiler et al., 1994; Mithöfer et al., 2005), zeigt jedoch strukturelle

Unterschiede zu JA durch unterschiedliche Positionen der Carboxylgruppen zum Cyclopentylring. Coronatin spielt in *A. thaliana* im frühen Infektionsstadium eine wichtige Rolle, indem es die Induktion von SA-abhängigen Abwehrgenen verhindert (Kloek et al., 2001). Bisher sind keine pflanzlichen Rezeptoren für Coronatin bekannt.

Induzierte Resistenz (IR) wirkt gegen ein breites Spektrum an Pathogenen. Dabei handelt es sich um eine Erhöhung der pflanzlichen Widerstandskraft nach Induktion von exogen applizierten biologischen oder synthetischen Faktoren. IR beruht entweder auf einer direkten Induktion von Abwehrreaktionen oder erhöht die Abwehrbereitschaft der Pflanzen.

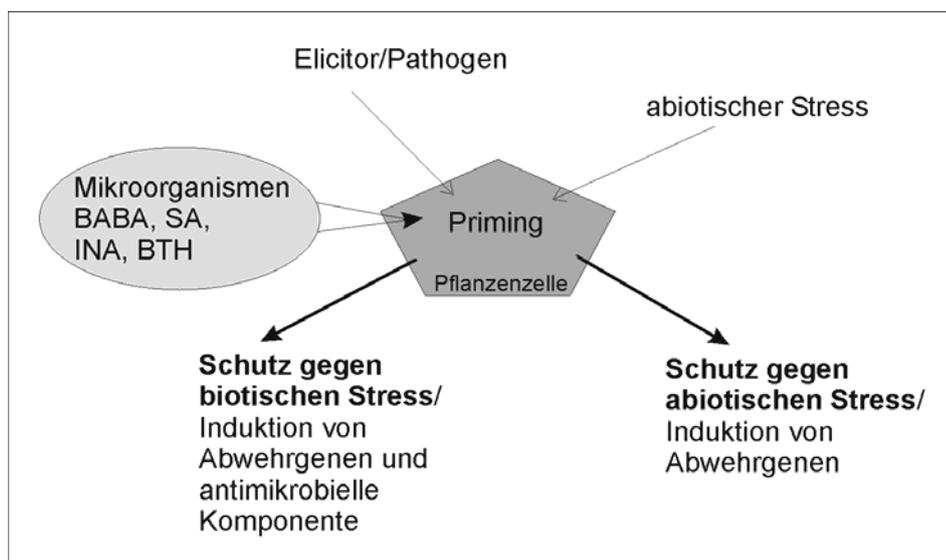


Abbildung 1.2: „Priming“ erfolgt durch Vorbehandlungen der Pflanze mit SA (Salicylsäure), BABA (β -Aminobuttersäure), INA (2,6-dichloroisonicotinic acid), BTH (Benzo-Thiadiazol) oder Mikroorganismen. Das Ziel des „Priming“ besteht darin, dass Pflanzen bei späterem Pathogenbefall, Elicitorbehandlung, biotischen oder abiotischen Stress, schneller und effektiver reagieren können (nach Conrath et al., 2002).

Diese erhöhte Abwehrbereitschaft der Pflanzen wird als Sensibilisierung oder „Priming“ (Abb. 1.2) bezeichnet (Heil und Kost, 2006; Conrath et al., 2001, 2002; van Hulten et al., 2006). Dabei handelt es sich um eine rassenunabhängige Abwehrbereitschaft der Pflanzen, die mehrere Tage, Wochen oder Monate anhalten kann, als kompletter Schutz gegen Pathogene aber nicht ausreicht (Hammerschmidt, 1993). „Priming“ wurde nicht nur in Pflanzen, sondern auch in Tieren beschrieben. An *A. thaliana* konnte „Priming“ nach BTH-Vorbehandlung durch erhöhte Aktivität von *PAL* nach Infektionen mit *P. syringae* nachgewiesen werden, ebenso eine erhöhte Kalloshedeposition nach mechanischer Verwundung. Vergleichbare Ergebnisse konnten an Petersilien-Zellkulturen erzielt werden. Behandlungen mit einer niedrigen Dosis *Phytophthora*

sojae oder SA führte zu keiner Induktion von *PAL*, während eine Vorbehandlung mit SA und einer nachfolgenden niedrigen Dosis von *Phytophthora sojae* eine extrem hohe Induktion von *PAL* zur Folge hatte (Thulke und Conrath, 1998). Die *A. thaliana* Mutanten *cpr1* und *cpr5* („*constitutive expresser of pr genes*“) wiesen ohne Vorbehandlung z.B. mit BTH eine konstitutive ISR („*induced systemic resistance*“) auf (Bowling et al., 1997). Durch den erhöhten endogenen SA-Gehalt sind diese beiden Mutanten ständig „geprimt“. Dagegen zeigt die *npr1* Mutante von *A. thaliana* keinen „Priming“-Effekt. „Priming“ schwächt die Pflanze weniger als eine direkte Abwehr hinsichtlich Samenentwicklung und Pflanzengröße (van Hulten et al., 2006). Bisher gibt es keine klaren genetischen, molekularen oder physiologischen Marker, um „Priming“-Effekte zu quantifizieren (Conrath et al., 2006).

Die systemisch erworbene Resistenz (SAR „*systemic acquired resistance*“) wurde erstmals 1933 von Chester erkannt. Pflanzen wiesen nach einer ersten Infektion eine erhöhte Resistenz gegenüber späteren Infektionen auf (Uknes et al., 1992). Der Begriff SAR wurde von Ross (1961) eingeführt, indem SAR von LAR („*local acquired resistance*“) unterschieden wurde. SAR wird ausgelöst durch eine Pathogeninfektion, die zu Nekrosen im Pflanzengewebe führt. Es handelt sich um eine pathogenunspezifische, systemische Resistenz der Pflanze, die durch eine anfängliche Infektion generell gegen weitere Infektionen von Pathogenen (Pilze, Bakterien, Viren) auch in entfernt vom Infektionsort liegenden Geweben, die keine Symptome zeigen, resistent wird. SAR ist korreliert mit der Bildung von *Pr*-Proteinen und SA. Versuche mit ¹⁸O-SA zeigten, dass über die Hälfte der nachgewiesenen SA in den systemischen Geweben im infizierten Blatt gebildet wird (Shulaev et al., 1995). Andererseits zeigten *nahG*-Pflanzen, auf denen ein WT gepfropft wurde, nach einer Infektion der *nahG*-Pflanzen eine SAR im WT, obwohl die *nahG*-Mutante nicht in der Lage ist, SA zu akkumulieren (Vernooij et al., 1994). Daraus kann geschlossen werden, dass SA zwar ein notwendiges Element für die Signaltransduktion ist aber kein Transportmolekül darstellt, das über weite Strecken im Phloem transportiert wird.

SAR wurde in vielen unterschiedlichen Pflanzen-Pathogen-Interaktionen beschrieben, wie z.B. an Tabak, Gurke, Kartoffel, Sojabohne, Tomate, Hirse, Luzerne, Reis, Weizen, Gerste, Kakao und *A. thaliana* (Lyon und Newton, 1997). SAR kann ebenso durch Elicitoren, wie INA (2,6-dichloroisonicotinic acid) hervorgerufen werden.

Induzierte systemische Resistenz (ISR) wird durch Rhizobakterien z.B. *Pseudomonas fluorescens* (Dong, 1998; Pieterse et al., 1998; Pieterse und van Loon, 1999) ausgelöst. Diese Art der Resistenz ist Salicylsäureunabhängig, während Ethylen (ET) und Jasmonsäure (JA) beteiligt sind (Ton et al., 2002). Durch ISR kommt es zu

Abwehrreaktionen gegenüber Pathogen-Infektionen in entfernten Geweben der Pflanze (Pieterse et al., 1998; van Wees et al., 2000).

Die systemische Resistenz von Pflanzen wird auch in die Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel mit einbezogen. Dabei handelt es sich um Pflanzenhilfsmittel („biocontrol agents“), die die natürliche Abwehr der Pflanzen gegen Pathogene stärken sollen (Durner et al., 1999). Ein Beispiel für Pflanzenhilfsmittel ist Bion[®], das den synthetischen Elicitor (benzo(1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester, BTH) enthält (Görlach et al., 1996). Bion[®] induziert in Weizen und Reis eine Resistenz gegen Pilze (Morris et al., 1998), in Bohnen und Gurken gegen Bakterien und Pilze (Siegrist et al., 1997) und in Tabak und *A. thaliana* gegen Pilze, Bakterien und Viren (Lawton et al., 1996). Die Wirkung ist ausgeprägter in Monokotyledonen als in Dikotyledonen. Die Behandlung von Weizen und Bohnen mit Bion[®] führt, in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Pflanzen, jedoch zu einer Verringerung des Ertrages (Hammerschmidt et al., 2001).

1.3 Signalwege in der pflanzlichen Abwehr

Als Abwehrsignale gegen biotischen und abiotischen Stress spielen die Phytohormone ET, SA und JA eine wichtige Rolle. Bei SA, JA und ET handelt es sich um endogene niedermolekulare Substanzen. Pflanzengenotypen, die in einem dieser Signale beeinträchtigt sind, zeigen eine erhöhte Krankheitsanfälligkeit gegen verschiedene virulente Pathogene oder Insekten (Staswick et al., 1998; Thomma et al., 1998; Ton et al., 2001).

Als Jasmonate sind Jasmonsäure (JA), Jasmonsäure-Metabolite und chemische Vorstufen zusammengefasst. Durch Jasmonate werden in der Pflanze viele physiologische Prozesse beeinflusst. Gefördert werden die Blüten- und Fruchtentwicklung, Fruchtreife, Seneszenz, Knollenbildung, Rankenwindung und Pollenbildung. Gehemmt wird das Keimlings- und Wurzelwachstum. Auf abiotischen Stress, Pathogene und Herbivore reagieren Pflanzen mit einem Anstieg von JA. JA ist ein Schlüsselsignal in SA-unabhängiger ISR (Pieterse et al., 1996). Neben Pflanzen ist die JA auch in Pilzen nachgewiesen worden, z.B. in *Fusarium oxysporum matthiolae*, *Gibberella fujikuroi* und *Botryodiplodia theobromae* (Miersch et al., 1991; Miersch et al., 1999).

Die Jasmonat-Biosynthese (Abb. 1.3) beginnt, katalysiert durch eine Phospholipase, mit der Freisetzung von Linolensäure (18:3) aus der Chloroplastenmembran. Im Anschluss wird die Linolensäure durch Lipoxygenasen (LOX) zu einem Hydroperoxyol oxygeniert. Es entsteht eine 13-Hydroperoxyoktadekatriensäure (HPOTE), die durch

Allenoxidsynthase (AOS) zu einer instabilen Allenoxid-Zwischenstufe dehydriert. Durch das Enzym Allenoxidcyclase (AOC) kann ein Cyclopentenon-Derivat, 9(S),13(S)-12-Oxophytodiensäure (OPDA) entstehen. OPDA kann reduziert werden durch eine NADPH-abhängige Reduktase, (OPDA Reduktase3, *OPR3*). Das Ergebnis ist eine Cyclopentanon Zwischenstufe, die 10,11-Dihydro-12-Oxophytodiensäure. Enzyme der β -Oxidation vervollständigen die Synthese von JA. Die ersten drei enzymatischen Schritte, katalysiert durch LOX, AOS und AOC, sind in Chloroplasten lokalisiert; *OPR3* und β -Oxidation dagegen in den Peroxisomen.

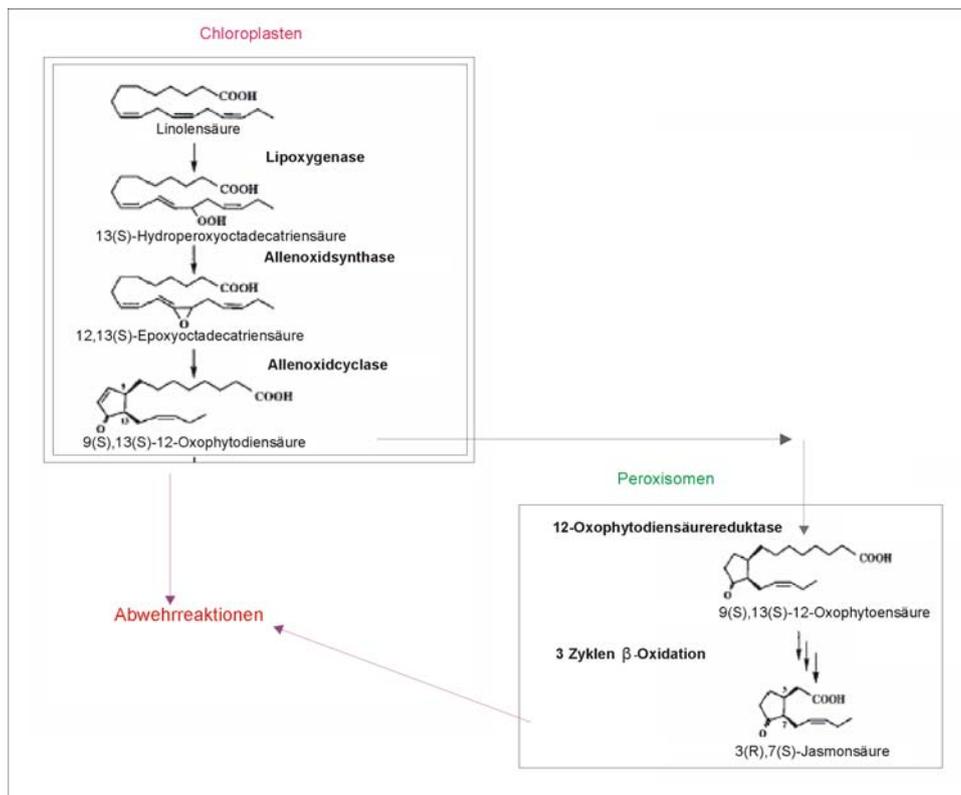


Abbildung 1.3: Jasmonsäure-Biosynthese ausgehend von Linolensäure, verändert nach Stintzi und Browse (2000).

Lipoxygenasen (*LOX*) wurden von Vick und Zimmerman (1984) in der JA-Biosynthese beschrieben (Abb. 1.3), sind weit verbreitet und kommen in Vertebraten, Algen und höheren Pflanzen vor. Bei den Lipoxygenasen handelt es sich um große einsträngige, eisenhaltige Proteine, die molekularen Sauerstoff zur Oxygenierung von Fettsäuren einsetzen. Pflanzliche *LOX* werden klassifiziert nach der Position des eingeführten Sauerstoffmoleküls an der Linolensäure bzw. Linolsäure. Wird das Substrat am Kohlenstoffatom 9 oxygeniert, erhält man 9-*LOX*, am Kohlenstoffatom 13 eine 13-*LOX* (Vick, 1993; Howe und Schillmiller, 2002; Delker et al., 2006; Liavonchanka und Feussner, 2006). Diese Art der Einteilung kann für Enzyme Schwierigkeiten bereiten, da es Abhängigkeiten von den Reaktionsbedingungen, z.B. dem pH-Wert, gibt. Daher

erfolgt eine weitere Klassifizierung aufgrund der Homologien in den cDNA-Sequenzen. Enzyme ohne eine N-terminale Transitpeptid-Sequenz und mit hoher Sequenzhomologie werden als Typ 1-LOX, mit chloroplastidärem Transitpeptid und geringer Sequenzhomologie als Typ 2-LOX bezeichnet (Liavonchanka und Feussner, 2006).

LOX können in Pflanzen löslich oder an Membranen gebunden vorkommen. Im Cytosol lokalisiert sind lösliche LOX, die in frühen Entwicklungsstadien der Pflanzen in Keimlingen oder reifenden Samen gebildet werden, in späteren Stadien in Valuolen, im Zellkern und in Chloroplasten der Blätter (Feussner et al., 1995; Royo et al., 1996). Partikuläre LOX werden in verschiedenen pflanzlichen Entwicklungsstadien in unterschiedlichen Organen (z.B. Blätter, Blüten, Früchte) gefunden.

In *A. thaliana* wurden 6 verschiedene LOX-Gene annotiert, wobei Typ 2 13-LOX *AtLox1* und *AtLox2* genauer charakterisiert wurden. Die höchste Expression von *AtLox1* erfolgt nicht in Blättern (Bell und Mullet, 1993), sondern hauptsächlich in Wurzeln und jungen Sämlingen. *AtLOX2* ist in den Chloroplasten lokalisiert (Bell et al., 1995) und wird durch Pathogene und Stress induziert. Die höchste Expression erfolgt in Blättern und Infloreszenzen.

JA-Biosynthese- und JA-Signaltransduktionsmutanten werden verwendet, um die Rolle von JA in der Pathogenabwehr, die Genaktivierung und Interaktionen zwischen SA-abhängigen und -unabhängigen Weg aufzuzeigen. JA-Biosynthese-Mutanten sind nicht in der Lage Jasmonate zu bilden, während Signaltransduktionsmutanten Jasmonate bilden, aber eine Störung in der Erkennung oder Weiterleitung des Signals aufzeigen.

JA-Biosynthese-Mutanten sind z. B. *fad3-2fad7-1fad8* („*fatty acid dehydrogenase*“) (McConn und Browse, 1996), *dde2-2* („*delayed-dehiscence*“) (von Malek et al., 2002; Park et al., 2002) und *opr3/dde1* („*12-oxophytodienoic-acid-reductase3*“/„*delayed-dehiscence 1*“) (Stintzi und Browse, 2000; Sanders et al., 2000). Mutanten der JA-Signaltransduktion sind z.B. *jin1* („*jasmonate-insensitive1*“) und *jin4* von Berger et al. (1996), *jar1* („*jasmonate-resistant*“) (Staswick et al., 1992) und *coi1* („*coronatine-insensitive1*“) (Feys et al., 1994) (Abb. 1.4).

Die *fad-triple* Mutante enthält keine dreifach ungesättigten (C₁₆ bzw. C₁₈) Fettsäuren. Eine JA-Synthese ist dadurch ausgeschlossen. Die männliche Sterilität kann durch JA-Applikation überwunden werden. Die Mutante ist anfälliger gegenüber *Pythium mastophorum* und *Pythium irregulare* (Staswick et al., 1998; Vijayan et al., 1998), ebenso gegen *Bradysia impatiens* (McConn et al., 1997) und Ozon.

Die Mutante *dde2-2* mit einem Defekt in der Allenoxidesynthese (AOS) ist nicht in der Lage, OPDA und JA zu synthetisieren. Die männliche Sterilität kann durch Sprühen mit Methyljasmonat (MeJA) behoben werden. Die Reaktion der *dde2* Mutante auf Pathogene wurde bisher noch nicht untersucht.

Die *opr3* Mutante wurde durch einen Defekt in der Entwicklung der männlichen Gametophyten identifiziert. Eine T-DNA Insertion in der Mutante unterbricht den *OPR3* Locus, der für einen der drei *OPR* Isozyme kodiert (Howe, 2001). Die anderen beiden *OPR* Isozyme können das peroxisomale Enzym *OPR3* in der Biosynthese von JA nicht ersetzen, weil *OPR1* und *OPR2* 9S,13S-OPDA nicht als Substrat verwenden. Verwundete Blätter von *opr3* akkumulieren deshalb 9S,13S-OPDA, weisen aber keine detektierbaren Gehalte von 3R,7S-JA auf. Die Enzyme *OPR1* und *OPR2* sind im Cytosol lokalisiert (Strassner et al., 2002). Die Sterilität kann durch Sprühen mit MeJA nicht aber mit OPDA überwunden werden. In der Sensitivität gegenüber Insekten (*Bradysia impatiens* Larven) und dem nekrotrophen Pathogen *A. brassicicola* unterscheidet sich *opr3* nicht vom korrespondierendem WT Wassilewskija (WS) (Stintzi et al., 2001). Nach Infektionen mit *A. brassicicola* kommt es in *opr3* zu einer starken Induktion von *Pdf1.2*, einem JA-abhängigen Gen (Weber, 2002).

Die Mutante *jar1* besitzt einen Defekt in einem Gen, das für eine Jasmonatadenylase kodiert (Staswick et al., 2002). Die Mutante *jin4* ist allel zu *jar1*. *Jin4* ist fertil und zeigt auf JA-haltigem Medium eine reduzierte Hemmung des Wurzelwachstums. *Jin4/jar1* zeigen keine erhöhte Resistenz gegenüber *P. syringae* im Vergleich zum korrespondierenden WT (Pieterse et al., 1998). Die jasmonat-insensitive Mutante *jin1* ist durch Bestrahlung des WT Colgl (*jin1*) mit Röntgenstrahlen entstanden. Die fertile Mutante *jin1* hat einen höheren SA-Gehalt nach *P. syringae* Infektion und ist resistenter gegenüber *B. cinerea* und *P. syringae*, zeigt aber die gleiche Sensitivität gegen Ozon, wie der WT. *Jin1* kodiert den bHLH-Leucin-Zipper („helix-loop-helix-leucine zipper“) Transkriptionsfaktor AtMYC2, der im Kern lokalisiert ist und *COI1*-abhängig durch JA und Abscisinsäure schnell hochreguliert wird (Lorenzo et al., 2004).

Die Selektion für die Mutante *coi1* erfolgte durch Testung auf Insensitivität gegenüber Coronatin aus *P. syringae* (Feys et al., 1994). Die Mutante *coi1* ist männlich steril und ist gegen nekrotrophe Pathogene (*A. brassicicola*, *B. cinerea* und *Pythium mastophorum*) und Ozon empfindlicher, gegen *P. syringae* resistenter. In der Empfindlichkeit gegenüber *Peronospora parasitica* unterscheidet sich *coi1* nicht vom WT. In *coi1* ist ein Gen defekt, das ein leucinreiches Protein mit einer F-Box Domäne kodiert (Xie et al., 1998).

JA sind nicht die einzigen Komponenten in der JA-Biosynthese, die aktiv an der pflanzlichen Abwehr beteiligt sind. OPDA ist nicht nur eine Zwischenstufe in der JA-Biosynthese (Abb. 1.3), sondern agiert selbständig als ein Abwehrsignal und kann ohne in JA umgewandelt zu werden, in der Pflanze Resistenz erzeugen (Stintzi et al., 2001). In mechanisch stimulierten Ranken von *Bryonia dioica* wurde ein mehrfach erhöhter cis-OPDA-Wert nachgewiesen (Stelmach et al., 1998). Die Expression von ORGs („OPDA-specific response genes“) wird durch OPDA induziert, nicht aber durch

JA und MeJA (Taki et al., 2005). Zur Bestätigung wurden Versuche mit der Mutante *opr3* durchgeführt. Im Microarray von Taki et al. (2005) wurden nach Applikation von OPDA, JA bzw. MeJA die hochregulierten Gene in 6 Gruppen von ORGs eingeteilt (Phosphatase, Transkriptionsfaktor, Stress, Sekundärmetabolite, Hormone, Transporter), die in 3 ORG Gruppen reprimierten (Protein Kinasen, Transkriptionsfaktor, Stress). Die Hälfte der OPDA induzierten Gene wurde auch durch Verwundung induziert.

COI1 ist ein wichtiges Signal in der JA-abhängigen Abwehr (Feys et al., 1994). OPDA reduziert die Expression sowohl von *COI1* abhängigen Genen, die ebenso durch JA induziert werden können, als auch von *COI1* unabhängigen Genen, die nicht durch JA induziert werden. Das belegt, dass OPDA und JA in der Genregulation unterschiedliche Funktionen haben und OPDA selber als Signalmolekül agiert. Ebenso spielt OPDA eine Rolle in der frühen und transienten Abwehr gegen oxidativen Stress (Reymond et al., 2000; Taki et al., 2005). Hauptunterschiede zwischen OPDA und JA ist eine Doppelbindung im Cyclopentenonring von OPDA, die eine α,β -ungesättigte Carbonyl-Struktur aufweist sowie die Länge der Carbonkette mit der Carboxylgruppe, die bei OPDA länger ist als bei JA. Diese Punkte scheinen entscheidend für die biologische Aktivität zu sein (Taki et al., 2005).

Salicylsäure (SA) oder „ortho-hydroxybenzoic acid“ ist eine wichtige Signalkomponente in Pflanzen, die mit SAR gekoppelt ist. Die SA-Biosynthese stellt einen Hauptkontrollpunkt in der Pflanzenabwehr dar. SA kann über zwei SA-Biosynthesewege gebildet werden. In Pflanzen erfolgt die Biosynthese von SA ausgehend von Phenylalanin über Zimt- und Benzoessäure durch das Enzym „benzoic acid 2-hydroxylase“ zu SA (Lee et al., 1995; Ryals et al., 1996; Verpoorte et al., 1999). Anschließend kann es zu einer Glykosylierungsreaktion kommen, in der nach Ryals et al. (1996) eine inaktive Speicherform, das Salicylsäure- β -Glycosid, gebildet wird. Eine weitere Möglichkeit, die von Weiss und Edwards (1980) für verschiedene Mikroorganismen beschrieben wurde, ist die Bildung von SA über Chorismat und einer Isochorismat-Synthase zu Isochorismat und durch Isochorismat-Pyruvatlyase zu SA. Die schnelle SA-Akkumulation in der Pflanze ist notwendig für eine effektive Abwehr gegen eine Reihe von Stressfaktoren, wie Pathogene, UV und osmotischer Stress. Die Akkumulation ist abhängig von der Anwesenheit von Resistenzgenen.

Die transgene Linie *nahG* (Abb. 1.4) exprimiert ein bakterielles Gen, das für Salicylat-Hydroxylase kodiert und SA in das physiologische unwirksame Catechol umwandelt, so dass keine Akkumulation von freier SA möglich ist und keine SAR ausgeprägt werden kann (You et al., 1991). Ohne eine SA-Akkumulation ist die *Pr*-Genexpression und die Resistenzbildung gegenüber Pathogenen unterdrückt (Gaffney et al., 1993;

Delaney et al., 1994). In *nahG*-Pflanzen ist eine R-Gen abhängige HR gegen Bakterien oder biotrophe Pathogene nicht vorhanden (Delaney et al., 1994).

Die SA-Signaltransduktions-Mutante *npr1* (Abb. 1.4) akkumuliert normale Mengen SA, zeigt jedoch eine gestörte Expressionsregulation von *Pr-1*. Gegen *Peronospora parasitica* oder *P. syringae* ist diese Mutante anfälliger (Cao et al., 1997; Glazebrook, 1999). Eine fehlende SA-Akkumulation wurde ebenfalls in den Mutanten *sid1* und *sid2* („*salicylic acid-induction deficient*“) aufgezeigt, die einen Defekt im Chorismatweg besitzen. Diese Mutanten sind verstärkt anfällig gegenüber Pathogenen (Nawrath und Métraux, 1999).

Auf den Ergebnissen von Delaney et al. (1994), das Mutanten im SA-Weg anfälliger sind gegen biotrophe Pathogene und von Staswick et al. (1998) und Thomma et al. (1998), das die Jasmonat-Mutanten *coi1*, *jar1* und *fad3-2fad7-2fad8* sensitiver sind gegen nekrotrophe Pathogene, beruht das Modell von Thomma et al. (2001), das eine Jasmonat-abhängige Abwehr entscheidend ist für eine Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene und eine SA-abhängige Abwehr für eine Resistenz gegen biotrophe Pathogene.

Ethylen (ET) reguliert eine Vielzahl von Entwicklungs- und Wachstumsvorgängen in der Pflanze, z.B. Samenkeimung, Zellelongation, Fruchtreife, Seneszenz von Blüten und Abszission von Blättern, ebenso die Abwehr bei Pathogenbefall und die Abwehr gegen mechanische Verwundung. Der ET-Gehalt steigt während der HR nach Pathogenbefall und Verwundung an (Chang und Shockey, 1999), dieses hat weitere Abwehrreaktionen zur Folge (z.B. Seneszenz, Induktion spezifischer Gene).

Die Pflanze-Pathogen-Interaktion kann nicht durch einen einzelnen Signaltransduktionsweg erklärt werden, sondern ist durch verschiedene Signalkomponente über Netzwerke reguliert (Genoud und Métraux, 1999), die eine synergistische oder antagonistische Wirkung („signalling crosstalk“) aufweisen (Glazebrook, 1999; Kunkel und David, 2002; Lorenzo und Solano, 2005).

Die Rolle von SA, JA und ET in der Abwehr wird durch die unterschiedlichen Mutanten bzw. transgenen Pflanzen in den jeweiligen Biosynthese- bzw. Signaltransduktionswegen nachgewiesen (Pieterse et al., 2001). Die Untersuchung der Pathogenese der Mutanten führte zu dem Modell in Abb. 1.4.

Für *A. thaliana* wurden 2 unterschiedliche Signaltransduktionswege beschrieben. Die SA-abhängige Aktivierung von *Pr-1*, *Pr-2* und *Pr-5* (Ryals et al., 1996) und der SA-unabhängige Signalweg, in dem die JA/ET-abhängige Aktivierung des pflanzlichen Defensins *Pdf1.2* involviert ist. Diese Signalwege agieren nicht unabhängig (Abb. 1.4); sie beeinflussen sich gegenseitig in einem komplexen Netzwerk von Interaktionen

(Kunkel und Brooks, 2002). In Microarray-Analysen wurde festgestellt, dass durch ET und MeJA gleiche Gene induziert wurden (Schenk et al., 2000). Beispielsweise führt eine Infektion mit *A. brassicicola* zu einer erhöhten Expression von *Pdf1.2*, das durch JA- und ET-abhängige Signalwege aktiviert wird, aber unabhängig von SA ist. Eine antagonistische Wirkung zwischen SA und JA wurde in Microarray-Analysen mit SA- und JA- Signaltransduktions-Mutanten nach Infektionen mit dem virulenten Bakterium *P. syringae* nachgewiesen. Dieser Antagonismus ist gegenseitig. Nach Niki et al. (1998) können Jasmonate ebenso die SA-induzierte *Pr*-Genexpression hemmen. Eine synergistische Wirkung zwischen JA und SA auf der Ebene der Genexpression wurde von Schenk et al. (2000) beschrieben. Thatcher et al. (2005) fanden in Microarray-Ergebnissen Hinweise, dass JA und ET synergistisch, SA und ET dagegen meist antagonistisch wirken.

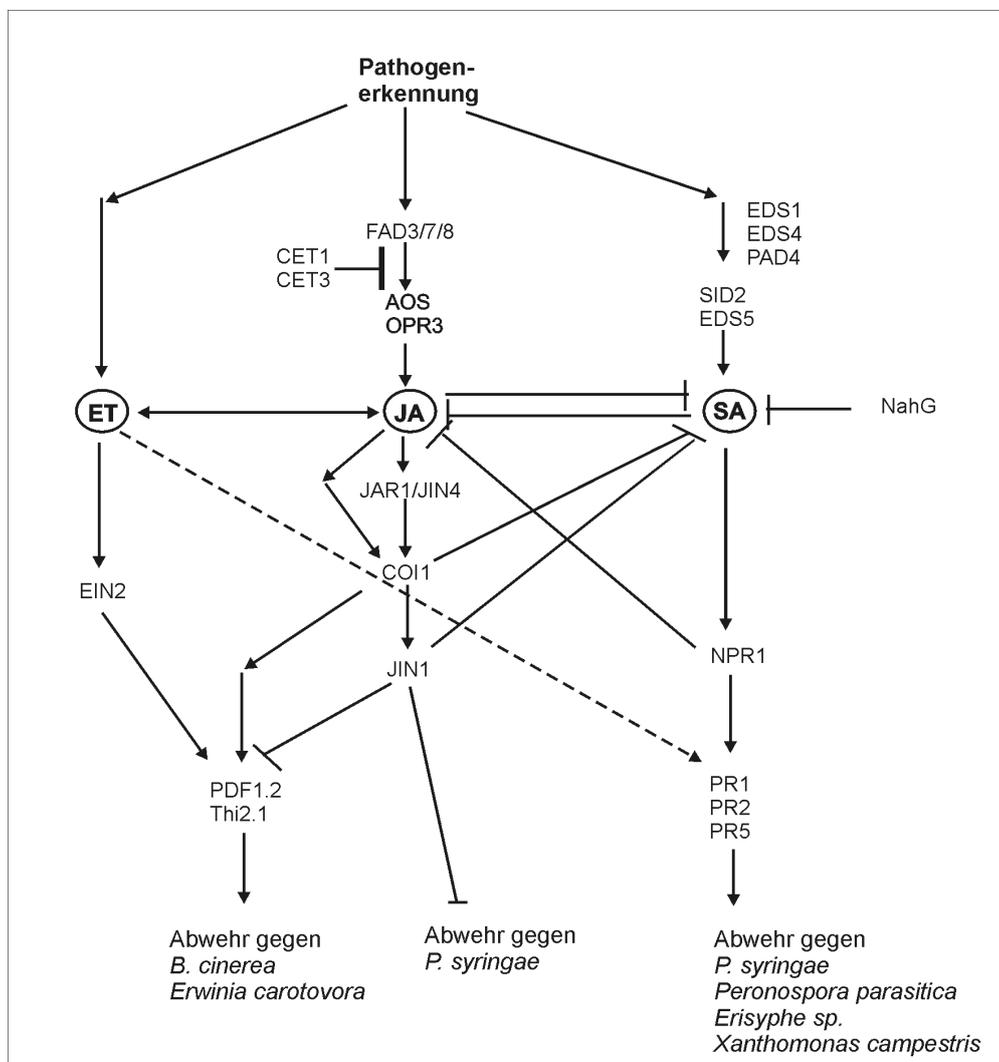


Abbildung 1.4: Modell der Interaktionen zwischen den Signalwegen von ET, JA und SA in *A. thaliana* (verändert nach Kunkel und Brooks, 2002; Laurie-Berry et al., 2006). Linien mit Pfeilen zeigen einen durchgehenden Signalweg; Linien mit Querbalken kennzeichnen einen blockierten Signalweg; die gestrichelte Linie zeigt eine mögliche positive Interaktion.

Die Gene SID1, SID2 und EDS5 agieren oberhalb der SA-Biosynthese und sind dort direkt involviert, während EDS1, EDS4 und PAD4 die SA-Synthese regulieren (Abb. 1.4). Die Platzierung von EDS5 unterhalb von EDS1, EDS4 und PAD4 zeigt die Abhängigkeit von diesen Genen (Kunkel und Brooks, 2002). In der *A. thaliana eds4* („enhanced disease susceptibility 4“) Mutante ist die SA-Biosynthese reduziert. *Pdf1.2* kann aber induziert werden durch eine geringe Konzentration von MeJA (Gupta et al., 2000). Dieser Antagonismus führt nach Doares et al. (1995) zu einer SA-abhängigen Unterdrückung der JA-Biosynthese. Die Mutanten *eds5* und *sid2* akkumulieren keine SA nach Infektion mit virulenten oder avirulenten Pathogenen oder nach abiotischem Stress (Wildermuth et al., 2001). *A. thaliana* Pflanzen, die beeinträchtigt sind in der Produktion von SA zeigen eine höhere Empfindlichkeit gegen ein breites Pathogenspektrum, wie z.B. *Peronospora parasitica*, *Erysiphe orantii*, *Pseudomonas syringae* und *Xanthomonas campestris raphani* (Nawrath und Métraux, 1999). *NahG* Pflanzen zeigen eine starke Reduktion der *Pr1*-, *Pr2*- und *Pr5*-Genexpression nach Pathogeninfektion. NPR1 führt zur Aktivierung der Genexpression, z.B. von *Pr1*, *Pr2* und *Pr5*. Nach Pathogeninfektion akkumuliert NPR1 SA, induziert aber keine SAR Marker-Gene und agiert daher unterhalb der SA.

Die Synthese von JA ist abhängig von *FAD3FAD7FAD8*. Die Mutanten *cet1* und *cet3* („constitutive expressor of thionin“) besitzen eine konstitutive JA-Abwehr und akkumulieren höhere JA-Gehalte. Hilpert et al. (2001) postulieren, dass diese Mutanten einen negativen Regulator der JA-Biosynthese darstellen. *JIN1* ist unterhalb von *COI1* platziert, weil die *jin1* Mutante nur in einem Teil der jasmonat-abhängigen Abwehr beeinträchtigt ist (Berger et al., 1996). Das Gen *JIN1* ist erforderlich für die Empfindlichkeit gegenüber *P. syringae* (Nickstadt et al., 2004). *A. thaliana* Pflanzen, die JA-Biosynthese-Gene überexprimieren, exprimieren *Pdf1.2* („plant defensine“) stärker und besitzen eine erhöhte Resistenz gegen *B. cinerea* (Seo et al., 2001). Die Abwehrgene *Pdf1.2* und *Thi2.1* („thionine“) werden JA und ET abhängig exprimiert. Nach Lorenzo et al. (2004) ist *Pdf1.2* negativ reguliert durch das Gen *JIN1* als Reaktion auf MeJA-Behandlungen.

Die gestrichelte Linie (Abb. 1.4) weist auf eine mögliche positive Interaktion zwischen dem ET- und dem SA-Weg hin. Mit Hilfe der Mutanten *ein2* („ethylene-insensitive2“) und *coi1* konnte mit den Pathogenen *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) (die Mutanten zeigten eine größere Empfindlichkeit) und *Peronospora parasitica* (die Mutanten waren nicht empfindlicher) nachgewiesen werden, dass zwei Signaltransduktionswege in *A. thaliana* angeschaltet werden, ein SA-abhängiger und ein JA/ET-abhängiger.

1.4 *Arabidopsis thaliana* (L., Heynhold)

Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) wurde vielfach für Untersuchungen der Pflanze-Pathogen-Interaktion verwendet. Die Acker-Schmalwand gehört zu den Brassicaceae und wurde 1943 von Friedrich Laibach als Modellpflanze beschrieben. Es handelt sich um eine einjährige krautige Pflanze mit einer Wuchshöhe von ca. 30 cm ohne landwirtschaftliche Bedeutung. An der Basis der Pflanzen kommt es zur Rosettenbildung. Die Stängelblätter sind ganzrandig, während die Blätter am Grund meist gezähnt sind. Die Blüte ist weiß mit einer Größe von 2-4 mm. Die Schoten erreichen eine Länge von 10-20 mm. Der Generationszyklus von *A. thaliana*, von der Keimung des Samens bis zur Samenreife, dauert in der Regel ca. 6 Wochen.

A. thaliana ist einfach auf Erde bzw. Medium auf relativ kleinem Raum zu kultivieren. Der schnelle Lebenszyklus, die große Anzahl Blüten pro Infloreszenz (ca. 200) und die Ausbildung von ca. 10.000 Samen pro Pflanze nach Selbstung, machen *A. thaliana* zu einer interessanten Versuchspflanze. Im Laufe der Jahre ist eine Vielzahl von Mutanten in den unterschiedlichen Biosynthesewegen generiert worden. Viele Wildtypen und Mutanten sind im *Arabidopsis* Stock-Center in Nottingham (<http://www.nasc.nott.ac.uk/>) erhältlich. Das Genom mit ca. 125 Megabasen ist vollständig sequenziert. Es ist auf 5 Chromosomen lokalisiert. *A. thaliana* ist mit einer Vielzahl von Pathogenen infizierbar.

Als Versuchspflanzen werden außer *A. thaliana* häufig Tomate, Tabak und Reis verwendet. Eine Übertragung der Ergebnisse von *A. thaliana* auf andere Kulturpflanzen wird kontrovers diskutiert und ist laut Anderson et al. (2005) allerdings nur begrenzt möglich.

1.5 Pflanzen-Pathogene

Die Gruppe der Pflanzen-Pathogene lässt sich in biotroph, hemibiotroph und nekrotroph unterscheiden.

Biotroph bedeutet, dass sich das Pathogen auf lebendem Gewebe vermehrt. Ein Beispiel für ein biotrophes Pathogen bei *A. thaliana* ist *Peronospora parasitica*. Dieser Pilz bildet spezielle Haustorien, zur Nahrungsaufnahme aus lebenden Zellen.

Die Gen-für-Gen-Resistenz ist wichtig für die Resistenz gegen biotrophe Pathogene und ist assoziiert mit SAR (siehe unter 1.2).

Hemi-biotrophe Pathogene ernähren sich im frühen Infektionsstadium von lebendem Gewebe (Glazebrook, 2005); abhängig vom Stadium des Entwicklungszyklus des Pathogens geht die Ernährung in nekrotroph über.

Pseudomonas syringae wurde bisher meist als biotroph charakterisiert (Butt et al., 1998). Nach Thaler et al. (2004) handelt es sich um ein hemi-biotrophes Pathogen. Erst im späteren Infektionsstadium kommt es im Wirtsgewebe zur Bildung von Chlorosen und Nekrosen. *Pseudomonas syringae* ist ein gram-negatives, obligat aerobes, stäbchenförmiges, polar begeißeltes Bakterium. *Pseudomonas* besitzt ein großes Wirtsspektrum mit ca. 50 Pathovarietäten, die bestimmte Wirtspflanzen befallen können. Das Bakterium gelangt über natürliche Öffnungen (z.B. Stomata) in die Interzellularräume (Apoplasten) verschiedener Pflanzenorgane. Die Infektionen führen zu Gewebenekrosen (Braunfärbung bzw. Dehydratisierung des pflanzlichen Gewebes sog. „water soaked lesions“), die häufig von Chlorosen umgeben sind.

Das verwendete Pathovar *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*P. syringae*) ist ein virulenter Stamm auf Tomate und Kreuzblütlern, wie z.B. *A. thaliana*, der das Phytotoxin Coronatin produziert. Zu Beginn einer Infektion unterdrückt Coronatin die Induktion der Pflanzenabwehr, und es kommt zur Ausbildung von Chlorosen.

Nekrotrophe Pathogene töten zu Beginn einer Infektion die Pflanzenzellen ab. Diese werden als Nahrungsquelle verwendet. Zu den nekrotrophen Pathogenen zählen viele Pilze (z.B. *A. brassicicola*, *B. cinerea* und *Fusarium graminearum*), die die Wirtszellen in einem sehr frühen Infektionsstadium abtöten, hauptsächlich durch toxische Moleküle und lytische Enzyme und das Pflanzengewebe für den eigenen Konsum aufschließen (van Kann, 2006; Glazebrook, 2005). Sie sind in der Lage Wirtszellen abzutöten, bevor die Pflanze Abwehrreaktionen anschalten kann.

Botrytis cinerea (*B. cinerea*) ist das Konidienstadium von *Sclerotinia fuckeliana*. Es handelt sich um ein unspezifisches nekrotrophes Pathogen, das über 200 Wirtspflanzen infizieren kann, einschließlich vieler landwirtschaftlich genutzter Kulturpflanzen (Prins et al., 2000), wo er als Erreger der Grauschimmelkrankheit zu hohen Ertragsverlusten führt. Für die Infektion sind Pflanzenalter, Ernährungszustand der Pflanze, Verwundung, Feuchtedauer und Temperatur entscheidend (Sosa-Alvarez et al., 1995). Der Pilz bildet auf den Blättern Nekrosen und Chlorosen aus. Bei ungünstigen Bedingungen für den Pilz kann er auf der Pflanze latent auftreten, z.B. als ungekeimte Konidie (Thompson et al., 1999). Die Keimung des Pilzes erfolgt über Konidien oder über das Myzel.

Fusarium graminearum (teleomorph *Gibberella zeae* [Schwein.]) (*F. graminearum*) gehört zu den filamentösen Ascomyceten. Der nekrotrophe Pilz zählt zu den wichtigsten Schadpilzen im Getreideanbau und führt dort zur Partiellen Taubährigkeit. Neben Weizen und Gerste befällt der Pilz auch Mais. Durch die Ausbildung von

Mycotoxinen, die toxisch für Menschen und Tiere sind, führt *F. graminearum* zu hohen Ertrags- und Qualitätseinbußen weltweit.

Infektionen können über die Narbe, die bei der Getreideblüte herausragt, erfolgen oder über Verletzungen. Ideale Bedingungen für die Infektion ist feucht-warmes Klima zur Blütezeit. Die am häufigsten vorkommenden Stadien von *F. graminearum* sind Makrokonidien, Chlamydosporen (Überwinterung) und Ascosporen.

F. graminearum infiziert bei *A. thaliana* sowohl Blüten als auch Blätter (Urban et al., 2002; Skadsen und Hohn, 2004; Chen et al., 2006). Neben der Infektion ist der Pilz in der Lage, auf *A. thaliana* zu sporulieren und den kompletten Lebenszyklus auf den Blättern durchzuführen. Verschiedene Wildtypen von *A. thaliana* sind unterschiedlich anfällig gegenüber *F. graminearum* (Chen et al., 2006).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Wirkung von Hefe auf div. Zellkulturen und Pflanzen ist bekannt. In Zellkulturen konnte eine Erhöhung der JA-Spiegel und Induktion von Abwehrreaktionen nachgewiesen werden. Noch unklar waren die Mechanismen, die bei exogener Hefeanwendung in der Pflanze die Wirkungen vermittelten. Diese Frage sollte mittels Untersuchung von *A. thaliana*, die nach Hefebehandlung mit unterschiedlichen Pathogenen (dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* und dem hemibiotrophen Bakterium *P. syringae*) infiziert wird, geklärt werden. Eine Analyse, ob es zu einer möglichen Akkumulation von Camalexin kommt und eine Induzierung bzw. Reprimierung von pathogenresponsiven Genen erfolgt, wurde als Marker für die Induktion der angeschalteten Abwehr nach Hefebehandlung verwendet. Eine mögliche Resistenz durch Hefebehandlungen wurde durch makroskopisch sichtbare Symptome auf den Blättern sowie die exakte Bestimmung des Bakterienwachstums und der Läsionsgrößen nach Pathogenbefall ermittelt.

Zur Detektion der Signalwege wurden verschiedene Mutanten aus den zu untersuchenden Signalwegen verwendet, für den SA-Weg die Mutanten *nahG* und *npr1*, für den JA-Weg *dde2*, *opr3* und *jin1* und für den Camalexinweg *pad3* und *cyp79B2/B3*. Durch den Vergleich der Hefewirkung zwischen Wildtyp und Mutante gegen das eingesetzte Pathogen konnte auf den jeweils beteiligten Signalweg geschlossen werden.

Eine weitere Fragestellung war die Rolle von OPDA versus JA in der Pathogenabwehr. Dazu wurden die Mutanten *dde2* und *opr3* mit *B. cinerea* bzw. *P. syringae* infiziert und auf Läsionsgrößen bzw. Bakterienwachstum untersucht. Zusätzlich werden relevante Abwehrgene nach der Infektion mit *P. syringae* analysiert.

Der nekrotrophe Pilz *F. graminearum* ist ein weiteres Modellpathogen, der neben Getreide auch *A. thaliana* befällt. In diesem Projektteil soll die Frage geklärt werden, ob JA im Pilz für die Pathogenität verantwortlich ist, ähnlich wie Coronatin in *Pseudomonas*. Aus diesem Grund erfolgt die Herstellung eines Konstruktes um die JA-Synthese durch Zerstörung des LOX-Gens zu unterbinden. Durch die Analyse der Oxylipinspiegel in diesen Mutanten sowie in komplementären Stämmen mit dem WT-Gen soll eine mögliche Veränderung in der Pflanze-Pathogen-Interaktion getestet werden, ebenso die Notwendigkeit von JA in der Pilzentwicklung.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeines Material

Sterile Pipettenspitzen, Duranflaschen, Lösungen, Kolben etc. wurden bei 120°C und 2×10^5 Pa autoklaviert.

Das Sterilfiltrieren verschiedener Lösungen erfolgte mit einer Porengröße von 0,2 µm.

2.1.2 Geräte

Analytische HPLC:

HPLC-Anlage Waters	(Milford, USA)
W600 Pump	
W717 Auto Sampler	
996 Diode Array Detector	
W474 Fluorescence Detector	
W600 Controller, Millennium32 Software	

Autoklave:

Autoklave Tuttnauer 5075 ELV	(Systec, Wettenberg)
------------------------------	----------------------

Fotometer:

GeneQuant RNA/DNA Calculator	(Pharmacia Biotech)
Ultraspec 100 pro visible Spectrophotometer	(Amersham, Freiburg)

GC-MS:

Varian 3400 Gaschromatograph	(Varian, Darmstadt)
SSQ 700 Quadrupol-Massenspektrometer	(Finnigan MAT, Bremen)

Homogenisieren:

Ultra-Turrax IKA T25 basic mit Dispergierwerkzeug S 25N-10G	(Jahke & Kunkel, Staufen)
Kugelmühle MM 301	(Retsch, Haan)
Homogenisierstäbchen Micropistille	(Eppendorf, Hamburg)

Hybridisierung:

Autoradiography Cassette RPN 1650 (10x12 in)	(Amersham, Freiburg)
Phosphor-Imager Fujix BAS 2000	(Fuji)
Fujifilm Imaging Plate BAS-MS 2025 (20:25cm)	(Japan)

Messen/Wiegen:

Analysenwaage AT 200	(Mettler, Gießen)
Eppendorf Reference Kolbenhubpipetten	(Eppendorf, Hamburg)

Mikroskopie:

Leitz HM-Lux	(Leitz Messtechnik, Wetzlar)
--------------	------------------------------

Mikrowelle:

KCR-63D7BL, C.R.S.	(Daewoo)
--------------------	----------

Northern-Transfer:

Chromatographiepapier	(Whatman 3 MM, Madison, USA)
-----------------------	------------------------------

PCR Maschine

Tpersonal	(Biometra, Göttingen)
-----------	-----------------------

pH-Meter:

Knick Digital pH-Meter G46	
pH Level 1 inoLab	(WTW, Weilheim)

Proteinbestimmung:

Dynex Technologie MRX ^{TC} Revelation	
Specord 200	(Analytik Jena)

Radioaktivitätsmessung:

LB1210B	(Berthold)
---------	------------

RNA-Gele:

GibcoBRL PS 305 Electrophoresis Power Supply	(Life Technologies)
--	---------------------

Rühren/Durchmischen:

Diverse Magnetrührer	
IKA-Combimag RCO	(Hartenstein, Würzburg)
Vortex Genie 2	(Scientific Industries)

Thermomixer Compact	(Eppendorf, Hamburg)
Gyrotory Water Bath Shaker Model G76	(New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA)
Ultraschallbad Sonorex TK52	(Bandelin)

Schalen:

Piki-Saat 80 (30x20x4,5cm)	(Wiesauplast, Wiesau)
----------------------------	-----------------------

Sterilbank:

Flow Laboratories, Gelaire Laminar Air Flow, Class 100	(CEAG Envirco, Dortmund)
--	--------------------------

Substrat:

Traysubstrat Typ1	(Klasmann-Deilmann GmbH Groß Hesepe)
-------------------	--------------------------------------

Hochmoor, kohlenaurer Kalk, wasserlöslicher Mehrnährstoffdünger

<u>Nährstoffgehalte:</u>	<u>chemische Eigenschaften:</u>
130-220 mg/l N	<u>Salzgehalt:</u>
160-260 mg/l P ₂ O ₅	1,3 g KCl
170-280 mg/l K ₂ O	
80-150 mg/l Mg	pH 5.5

Temperieren/Inkubieren:

Kühlschrank	(Privileg)
-20°C Gefrierschrank	(Liebherr, Privileg)
-85C Ultra low freezer C66085	(New Brunswick Scientific)
28°C Schrank Typ 3E 500	(Memmert)
Eismaschine Icematic D100	(Leupold)

Töpfe:

Teku-Terra TO7 8° Rundtöpfe	(Poppelmann, Lohne)
-----------------------------	---------------------

Trocknen:

Rotationsvakuumkonzentrator RVC 2-18	
Heraeus Typ T5050	(Heraeus-Christ, Osterode)

Tüten:

Pergamyn Zweinahtfaltenbeutel	
H 175 x B 250 x Lasche 40	(Hera Papierverarbeitung, Nidda)

Zentrifugen:

Kendro Jouan MR23i (Einsatz: AM 50C.13)

Eppendorf Tischzentrifuge 5217R (Eppendorf, Hamburg)

Sonstige Geräte:

Glasperlen (0,25 – 0,50 mm) (Roth, Karlsruhe)

Handstückzähler KM13 (Hartenstein, Würzburg)

Nadellose Spritze (Terumo, Leuven Belgien)

Zählkammer Jessen (Hartenstein, Würzburg)

(0,4 mm Tiefe, 0,0625 mm²)

2.1.3 Kits

NucleoBond PC100 AX (Macherey-Nagel, Düren)

NucleoSpin ExtractII (Macherey-Nagel, Düren)

pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA)

MBI-Hexalabel-DNA Labelling Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

MicroSpin S-200 HR Column (Amersham, Freiburg)

HexaLabel™ DNA Labeling Kit (Fermentas, St. Leon-Rot)

2.1.4 Chemikalien

Agarose Low Melt (Roth, Karlsruhe)

Agar-Agar Kobe I pulv. (Roth, Karlsruhe)

[alpha-P32] dATP (Hartmann Analytic, Baunschweig)

Ammoniumnitrat (AppliChem, Darmstadt)

Ampicillin-Natriumsalz (AppliChem, Darmstadt)

Bacto Proteose Peptone No.3 (Difco, Detroit, USA)

Carboxymethylcellulose Sodium salt (Fluka, Buchs, CH)

N,N-Diisopropylethylamine (DIEA) (Sigma, Deisendorf)

2,2-Dimethoxypropan (Merck, Darmstadt)

DMSO Dimethylsulfoxid getrocknet (Merck, Darmstadt)

dNTP (Segenetic, Borken)

EDTA-Diantriumsalsz-Dihydrat (AppliChem, Darmstadt)

Essigsäure 96% Rotipuran > 95,9% p.a. (Roth, Karlsruhe)

Ethanol Rotipuran > 99,8% p.a. (Roth, Karlsruhe)

Ethidiumbromid-Lösung 1% (AppliChem, Darmstadt)

6-Fluorindole-3-Carboxaldehyde (FICA) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Ficoll 400	(Sigma, Deisenhofen)
Formaldehyd-Lösung 37% zur Analyse	(AppliChem, Darmstadt)
Formamid ultrapure	(AppliChem, Darmstadt)
Glycerin p.a. (87%)	AppliChem, Darmstadt)
Hefeextrakt pulv. f.d. Bakteriologie	(Roth, Karlsruhe)
Isoamylalkohol zur Analyse	(AppliChem, Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	(AppliChem, Darmstadt)
Lithiumchlorid	(Roth, Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat p.a.	(Merck, Darmstadt)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	(Merck, Darmstadt)
Methanol	(Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid	(Roth, Karlsruhe)
Petrolether 40.60 p.a.	(Roth, Karlsruhe)
Phenol p.a.	(Roth, Karlsruhe)
Potato Dextrose Agar	(Difco, Detroit, USA)
Potato Dextrose Broth	(Difco, Detroit, USA)
2-Propanol p.a. (Rotipuran >99,7%)	(Roth, Karlsruhe)
Rifampicin	(AppliChem, Darmstadt)
Roti-Phenol	(Roth, Karlsruhe)
SDS (sodium dodecyl sulfate)	(Roth, Karlsruhe)
Silwet L-77	(Lehle Seeds, Round Rock, USA)
Taq-Polymerase	(Se genetic, Borken)
Trichlormethan/Chloroform Rotipuran > 99 % p.a.	(Roth, Karlsruhe)
Trypton aus Casein pankreatisch verdaut	(Roth, Karlsruhe)
Tween 20	(AppliChem, Darmstadt)

2.1.5 Hefearten

DHW Vital Gold	(Deutsche Hefewerke GmbH, Nürnberg)
Dr. Oetker Frische Hefe	(Dr. Oetker, Bielefeld)
Dr. Moormanns Frisch-Backhefe	(Uniferm GmbH & Co KG, Werne)

2.1.6 Computerprogramme, Webseiten

Statistica 7.1	
Surface	(Rostas et al., 2006)
Microsoft Office (Word 2003, Excel 2003, Power Point 2003)	
EndNote 9.0	

Vector NTI Suite 6.0
Adobe Photoshop 7.0
CorelDraw 11

<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>

<http://www.arabidopsis.org>

<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/geneform/geneform.pl>

http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium_graminearum/Home.html

<http://51protocol.com/bio/mic/F/20061107/1103.html>

Die genomische Sequenz von *F. graminearum* ist veröffentlicht unter:

<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fusarium/index.html>

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung häufig verwendeter Medien, Puffer und Lösungen

Medium	Inhaltsstoffe und Herstellung
PDA-Platten	39 g Potato Dextrose Agar
PDA-Flüssigmedium	12 g Potato Dextrose Broth
King's B	40 g Proteose Peptone 3; 20 g Glycerin (87 %); nach dem Autoklavieren Zugabe von 10 ml 10 % K ₂ HPO ₄ sterilfiltriert; 10 ml 10 % MgSO ₄ sterilfiltriert
LB	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; pH 7.0
CMC	1 g Ammoniumnitrat; 1 g Kaliumdihydrogenphosphat; 1 g Hefeextrakt; 0,5 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat; 15 g Carboxymethylcellulose Natriumsalz

Tabelle 2.1: Herstellung häufig verwendeter Nährmedien. Die Angaben beziehen sich auf 1 Liter Gesamtvolumen.

Für die Herstellung von LB- oder KB-Festmedien wurde 12 g/l Agar-Agar zugesetzt. Für Selektionsmedien wurde das entsprechende Antibiotikum nach dem Autoklavieren der Medien und nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C hinzugegeben, z.B. Rifampicin: 1 ml/l einer Stocklösung von 50 mg/ml MeOH oder Ampicillin: 100mg/l einer Stocklösung von 100 mg/ml Wasser.

Puffer	Inhaltsstoffe und Herstellung
5 x "Running Buffer"	41,86 g MOPS; 6,8 g NaAc; 7 Plättchen NaOH; 10 ml 0.5 M EDTA
RNA-Ladepuffer	76 µg 5 x "Running Buffer"; 126 µl Formaldehyd; 378 µl Formamid; 76 µl Agarosegel Loading Dye; 5 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml)
Lysis-Puffer	50 mM Tris pH 8.0; 50 mM EDTA; 3 % SDS; 1 % EtOH; 0.1 % Proteinase K
1 x TE	10 mM Tris pH 8.0; 1 mM EDTA
5 x TBE	53 g Tris-HCl; 27,5 g H ₃ BO ₄ ; 4,65 g EDTA
10 x DNA-Laufpuffer	0.25 % (w/v) Bromphenolblau; 0.25 % Xylencyanol; 60 % (v/v) Glycerin; 150 mM Tris-HCl pH 7.6

Tabelle 2.2: Herstellung häufig verwendeter Puffer. Die Angaben beziehen sich auf 1 Liter Gesamtvolumen.

2. Material und Methoden

Lösungen	Inhaltsstoffe und Herstellung
Bradford-Reagenz (Bradford, 1976)	10 mg Coomassie Brilliant Blue; 5 ml EtOH (95 %); 10 ml H ₃ PO ₄ (85 %); für 100 ml Endvolumen
physiologische Kochsalzlösung	0.9 % NaCl in sterilem H ₂ O; steril filtriert
DEPC-behandeltes H ₂ O	0.1 % (v/v) DEPC in H ₂ O ansetzen; 4 Stunden bis über Nacht unter dem Abzug gerührt; anschließend autoklaviert
Prähybridisierungs- Lösung	5 mM EDTA; 0,1 % SDS; 5 x SSC; 50 % Formamid; 100 µg/ml Heringssperma DNA; 5 x Denhardts-Lösung; steriles H ₂ O
50 x Denhardts- Lösung	1 % Polyvinylpyrolidon K30; 1 % BSA; 1 % Ficoll 400
20 x SSC	175,3 g NaCl; 88,2 g tri-Natrium-Citrat-Dihydrat; mit HCl auf pH 7.0 einstellen
Minipräparation Lösung I	1 M Tris pH 7.5; 0,5 M EDTA pH 8.0; für 100 ml Endvolumen
Minipräparation Lösung II	0,8 g NaOH; 1 g SDS; für 100 ml Endvolumen
Minipräparation Lösung III	40,8 g Natriumacetat x 3 H ₂ O; mit Eisessig auf pH 4.8 einstellen; für 100 ml Endvolumen
Midipräparation Lösung A	50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0
Midipräparation Lösung B	0.2 N NaOH; 1 % SDS; frisch ansetzen
Midipräparation Lösung C	5 M Kaliumacetat; 11,5 ml Eisessig; für 100 ml Endvolumen

Tabelle 2.3: Herstellung häufig verwendeter Lösungen.

2.2.2 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Als Standardwildtyp von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) wurde Col-0 (Columbia) verwendet. Mutanten im Col-0 Hintergrund waren in dieser Arbeit *nahG*, *npr1* und *pad3* (Susanne Berger, Universität Würzburg), *dde2-2* (Beate Keller, Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich) und *cyp79B2/B3* (Erich Glawischig, TU München). Der Wildtyp WS (Wassilewskija) war der entsprechende Hintergrund für *opr3* (Annick Stintzi, Institut für Pflanzenphysiologie und Biotechnologie, Universität Hohenheim); *Colgl* (Columbia ohne Trichome) für *jin1* (Susanne Berger, Universität Würzburg).

Das vegetative Wachstum der *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte in Klimakammern unter Kurztagsbedingungen (mit 9 Stunden Licht und 15 Stunden Dunkelheit) und einer Lichtintensität von 180 µmol quanta m⁻²s⁻¹. Die Temperatur betrug 22°C mit einer Nachtabsenkung auf 18°C. Die Luftfeuchtigkeit betrug im Durchschnitt 55-60 %. Die Samen wurden in TO7 Rundtöpfe (7 cm Durchmesser) ausgesät und nach 2 Wochen pikiert. Zur Aussaat und zum Pikieren wurde Traysubstrat Typ1 verwendet. Nach weiteren 3 bis 4 Wochen wurden die Pflanzen für die entsprechenden Versuche verwendet.

Für das generative Wachstum wurden die Pflanzen nach den Versuchen unter Langtagsbedingungen (16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit) und 22°C weiter kultiviert.

Zur Überwindung der männlichen Sterilität der Mutanten *dde2* und *opr3* wurden diese zum Zeitpunkt der Blüte täglich mit MeJA gesprüht:

dde2 mit 450 µM MeJA in 0.1 % Tween 20 (von Malek et al., 2002)

opr3 mit 0.03 % MeJA in 0.1 % Tween 20 (Annick Stintzi, persönliche Mitteilung 2005).

Nach dem Umfärben der ersten Schoten auf gelb, wurde der Blütenstiel in einen Pergamyn Zweinahtfaltbeutel gegeben. Die Pflanzen wurden noch weitere 2 Wochen gegossen. Nach dem Eintrocknen der Pflanzen wurden die Samen geerntet. Nach einer Kälteinduktion von 4-6 Wochen bei 4°C konnten die Samen ausgesät werden.

2.2.2 Verwendung von Hefe-Elicitoren

2.2.2.1 Behandlung der Pflanzen mit Hefesuspensionen

Für die Untersuchungen, welche Applikationsart sich für Hefesuspensionen auf *A. thaliana* eignet, wurde Giessen, Sprühen und Infiltrieren getestet. Das Gießen von *A. thaliana* wurde mit den Hefekonzentrationen 0.1 bis 0.3 g/ml durchgeführt. Mit gleichen Konzentrationen erfolgte das Sprühen der Pflanzen. Dazu wurden sie tropfnass (entspricht ca. 1 ml/Pflanze) gesprüht. Die Kontrollpflanzen wurden mit einer vergleichbaren Menge Wasser gesprüht. Das Infiltrieren erfolgte in Anlehnung an die Infiltrationsversuche mit *Pseudomonas syringae* mit gleichen Konzentrationen wie zuvor.

Zum Nachweis, ob mögliche Veränderungen in der Pflanzengröße nach Hefebehandlung messbar waren, wurden *A. thaliana* im Alter von 37 Tagen mit 0.3 g/ml Hefe gesprüht und nach 61 Tagen oberhalb der Erde abgeschnitten und gewogen. Für die Auswertung wurden 2 Versuche mit je 11 Pflanzen herangezogen.

2.2.2.2 Herstellung eines Hefe-Zellwand-Elicitors

100 g Bäckerhefe wurde 30 Minuten bei RT in 200 ml 100 mM Natriumcitrat (pH 7.5) gerührt und im Anschluss autoklaviert. Nach einem Zentrifugationsschritt (2 Stunden bei 8500 rpm und RT) wurde der Überstand abgefiltert, gleiches Volumen EtOH

zugegeben und über Nacht bei 4°C gerührt. Nach dem Zentrifugieren (2 Stunden bei 8500 rpm und RT) wurde das Pellet in 80 ml H₂O dest. bei 4°C gelöst und 1 Stunde bei 8500 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde gefriergetrocknet und bei -80°C gelagert (Baier et al., 1999).

Der Hefe-Zellwand-Elicitor wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zum Sprühen auf *A. thaliana* im Vergleich zur autoklavierten Bäckerhefe verwendet.

2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Erstellung der Kalibrierungsgeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA) als Standard verwendet. Die Proben wurden in unterschiedlichen Verdünnungsstufen getestet.

In 96 Lochplatten wurde zu 10 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe der Eichgrade bzw. der Proben jeweils 90 µl H₂O und 150 µl Bradford pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei RT wurden die Proben bei einer Absorption von 595 nm mit dem Programm Revelation gemessen.

2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Ausgehend von der normalen Sprühkonzentration 0,3 g/ml wurde eine 1:10000 Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung angesetzt und mittels der Zählkammer Jessen die Anzahl der Hefezellen in 2 unabhängigen Versuchen mit jeweils n = 32 ausgezählt.

2.2.3 Anzucht von Pathogenen und Infektionen

2.2.3.1 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Stamm: MUCL 30158 (*B. cinerea*) wurde von der Mycothèque Université Catholique de Louvain (Belgien) zur Verfügung gestellt.

Die Anzuchtbedingungen von *B. cinerea* wurden nach Thomma et al. (1999b) durchgeführt.

Ein Stück Myzel von einer vorhandenen Potato Dextrose Agar- (PDA-) Platte bzw. vom Glycerolstock (-80°C) wurde mittels einer Impföse auf eine neue PDA-Platte überführt. Das Wachstum erfolgte innerhalb von 3 Wochen im Dunkeln bei 22-24°C. Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4°C.

Für Infektionsversuche mit *B. cinerea* wurde die Sporensuspension in Potato Dextrose Broth (PD Broth) verdünnt.

Sporulierende Pilzhyphen wurden von einer PDA-Platte mit 5 ml PD Broth abgekratzt und durch 3 Lagen Mullbinde gefiltert. Nach dem Auszählen in einer Zählkammer wurde die Sporenlösung auf 9×10^5 Sporen/ml mit PD Broth eingestellt. Pro Pflanze wurden 5 bis 6 ältere Blätter am Blattstiel gekennzeichnet. Um das Eindringen der Pilzsporen zu erleichtern, wurde jedes Blatt 2 Mal mit einer Nadel durchstoßen. Auf diese Verletzung wurde jeweils ein Tropfen (5 μ l) der Sporensuspension gegeben. Anschließend wurden die Pflanzen zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit in eine Plastikschaale gestellt. Die Schalen standen in den Klimakammern im Halbdunkeln. Zum Antrocknen der Tropfen wurden nach ca. 18 Stunden die Plastikschaalen für etwa 4 Stunden leicht geöffnet. Das weitere Wachstum des Pilzes erfolgte in geschlossenen Schalen.

Für die Auswertung der Läsionengrößen auf *A. thaliana* wurden jeweils 12 der markierten Blätter nach 48 und 72 Stunden geerntet. Die Umriss der 24 Läsionen wurden auf Klarsichthüllen übertragen (getrennt nach Nekrosen und Chlorosen). Diese Läsionen wurden in den Computer eingescannt, mit dem Programm Adobe Photoshop rot eingefärbt und mit Hilfe des Programms Surface (Rostas et al., 2006) die jeweilige Fläche ermittelt.

Zum Anfärben der Pilzhyphen wurden infizierte Blätter in Petrischalen (ausgelegt mit Filterpapier) mit EtOH:Eisessig (3:1) gelegt. Nach einem Tag wurde die Entfärbelösung gewechselt. Nach 2 Tagen waren die Blätter transparent-weißlich und wurden gründlich mit Wasser gewaschen. Zum Anfärben von Pilzhyphen auf der Blattoberfläche wurde Tinte (blaue Pelikantinte) 1:10 in Wasser (steril) verdünnt (Glawischmig, persönliche Mitteilung, 2006). Dazu wurden die Blätter auf Objektträger überführt und 1 Minute angefärbt. Anschließend wurden die Blätter gründlich mit H₂O gespült und in H₂O auf einen Objektträger übertragen.

Mit einer auf dem Mikroskop aufgesetzten Kamera konnten die blau angefärbten Pilzhyphen bei Durchlichtmikroskopie (Programm: Visitron System, Spot Advanced) aufgenommen werden.

Für die Testung einer möglichen direkten Wirkung von Hefe auf das Wachstum von *B. cinerea* wurden die Blätter der besprühten Pflanzen 4 Tage nach Wasser- bzw. Hefebehandlung gründlich mit Wasser gespült. Nach einem weiteren Tag wurden 5 bis 6 Blätter dieser Pflanzen mit *B. cinerea* herkömmlich infiziert. Weiterhin wurde *B. cinerea* in der normalen Sprühkonzentration (9×10^5 Sporen/ml in PD Broth) mit je 2

Tropfen á 5 µl auf PDA-Platten, PDA-Platten, die mit 1 ml Hefe (0.3 g/ml) überschichtet wurden und auf reine Hefe-Platten (0.3 g/ml Hefe plus Agar) getropft. Die Platten mit *B. cinerea* wurden entweder im Dunkeln (ähnliche Bedingungen wie bei den infizierten Pflanzen) oder bei Licht aufgestellt. Nach 1 bis 5 Tagen wurde das Wachstum des Pilzes verglichen.

Zur Überprüfung einer möglichen systemischen Wirkung von Bäckerhefe auf *B. cinerea* oder *P. syringae* wurden von 5 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen 2 bis 3 jüngere Blätter markiert. Beim Besprühen mit Hefe bzw. mit H₂O als Kontrolle wurden diese Blätter mit einem einseitig geschlossenen Metallzylinder (2,4 cm Durchmesser) abgedeckt. Nach 5 Tagen erfolgte die Infektion mit dem entsprechenden Pathogen auf den nun gleichgroßen Blättern wie in den anderen Versuchen.

2.2.3.2 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

Der verwendete Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*P. syringae*) wurde von Brian Staskawicz (Department of Plant and Microbial Biology, Berkeley, USA) zur Verfügung gestellt.

Die Anzucht von *P. syringae* erfolgte auf Kings Medium B für Agar-Platten.

Mittels einer Impföse wurde etwas *P. syringae* vom Glycerolstock (Lagerung bei -80°C: 650 µl *P. syringae* in KB-Flüssig-Medium versetzt mit 150 µl 87 % Glycerol) auf einer KB-Platte ausgestrichen und 24 Stunden bei 28°C im Brutschrank inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Für die Übernachtskultur wurden 3 ml KB-Flüssig-Medium mit 3 µl Rifampicin (50 mg/ml MeOH) in ein Kulturröhrchen gegeben. Mittels einer Impföse wurde von einer KB-Platte der virulente Stamm *P. syringae* hinzugegeben. Die Bakterienkultur wurde in einem Wasserbad bei 28°C und 120 U/min über Nacht inkubiert. Zur Überprüfung des Bakterienwachstums wurde 1 ml der Übernachtskultur bei 3500 rpm und 4°C 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 mM MgCl₂ resuspendiert und im Photometer die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Idealerweise lag diese bei ≥ 0,9. Anschließend wurde 1 ml der Übernachtskultur in einen 300 ml sterilen Erlenmeyerkolben in 50 ml KB-Medium mit 50 µl Rifampicin überführt und im Wasserbad bei 28°C und 120 U/min inkubiert. Nach ca. 5 Stunden wurde der OD₆₀₀-Wert gemessen. Bei Erreichen der optischen Dichte von 0.2 wurde die 50 ml Bakteriensuspension bei 3500 rpm und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 mM MgCl₂ auf OD₆₀₀ = 0.2 eingestellt. Das

entspricht einer Bakteriendichte von 1×10^8 cfu/ml Lösung. Für die Infiltrationsversuche wurde diese Lösung mit 10 mM MgCl_2 auf 1×10^6 cfu/ml verdünnt bzw. für Tauchversuche bei 1×10^8 cfu/ml belassen.

Für Infektionsversuche mit *P. syringae* wurden *A. thaliana* Pflanzen etwa 1 Stunde vor Infiltration ausreichend gewässert, damit sich die Stomata öffnen und die Bakterien in die Blätter eindringen konnten. Blätter, die infiltriert werden sollten, wurden am Blattstiel gekennzeichnet, um die Beprobung nach 0 und 24 Stunden zu erleichtern (zu diesen Beprobungszeitpunkten sind keine Symptome zu erkennen). Pro Pflanze wurden 5 bis 6 ältere Blätter verwendet.

Die Infiltration erfolgte mittels einer 1 ml Insulinspritze ohne Spitze durch die Stomata in die Blattunterseite. Dazu wurden ca. 20 μl der Bakteriensuspension in entsprechender Konzentration in jeweils eine Blatthälfte infiltriert bzw. 10 mM MgCl_2 in die Kontrollpflanzen.

Für die Durchführung der Tauchversuche wurde die Bakteriensuspension (1×10^8 cfu/ml in 10 mM MgCl_2 , versetzt mit 0,02 % Silwett L-77) in eine Petrischale gegeben. Um auszuschließen, dass das Detergenz Silwet L-77 unter Umständen Blattschäden verursacht, wurden Pflanzen zur Kontrolle in 10mM MgCl_2 versetzt mit 0,02 % Silwet L-77 getaucht. Beim Tauchen wurden die Blätter der Pflanze komplett mit dieser Suspension benetzt. Zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit wurde über die Pflanzenschalen eine Plastikhaube gestellt.

Die Analyse des Bakterienwachstums von *P. syringae* in planta erfolgte nach Whalen et al. (1991).

Direkt nach dem Infiltrieren, sowie nach 24 und 48 Stunden wurden jeweils 4 Blattscheiben in 3facher Wiederholung mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 1,4 cm) aus den Infiltrationsstellen der markierten Blätter ausgestanzt und in 1 ml 10 mM MgCl_2 homogenisiert. Zwei unterschiedliche Verdünnungsstufen mit je 100 μl wurden auf LB-Platten ausplattiert. Nach dem Inkubieren der Platten für 48 Stunden bei 28°C wurden die Bakterienkolonien ausgezählt.

2.2.3.3 *Fusarium graminearum*

PH-1 (NRRL 31084) Linie 7 (vom Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, USA) bzw. von N. Keller (Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, USA) WT 3639, die LOX-KO-Mutanten GZT cp20, cp22, cp25 und cp27 und die komplementierten Stämme GZT cp30, cp31, cp32 und cp34 wurden verwendet.

Zur Stammhaltung wurde ein bewachsenes Myzelstück, alternativ aus dem Glycerolstock (in 10 % Glycerol bei -80°C gelagert) oder einer Sporensuspension ca. 5 bis 7 Tage bei 22 bis 24°C im Dunkeln auf PDA-Platten angezogen. Anschließend wurden die Platten bei 4°C gelagert.

Die Anzucht in Flüssigmedium von *F. graminearum* Linie 7 erfolgte nach Urban et al. (2002).

Sporen und ein Myzelstück wurde von einer PDA-Platte genommen und in 200 ml CMC Flüssig-Medium gegeben. Das Medium wurde für die Ausbildung von Sporen und Myzel bei 28°C 8 Tage bei 120 rpm im Dunkeln geschüttelt. Zur Ausbildung von Sporen war die exakte Einhaltung von Temperatur und Schüttelgeschwindigkeit massgeblich.

Für Infektionsversuche mit *F. graminearum* auf *A. thaliana* wurden die Sporen aus dem CMC Flüssig-Medium gewonnen. Nach einer Zentrifugation von 6 Minuten bei 3000 rpm und 4°C wurde das Pellet 2 Mal mit H₂O (steril) gewaschen. Durch Ausschütten des Myzel-Pellets wurde der verbliebene Rest mit etwas H₂O (steril) versetzt, die Konidienzahl mit einer Zählkammer bestimmt und für die Infektionsversuche auf *A. thaliana* auf eine Sporenzahl von 1×10^5 Sporen/ml mit Wasser eingestellt. Zur Sporenlösung wurde 0,01 % Silwet L-77 als Detergenz hinzugegeben.

Für die Infektion der Pflanzen durch Sprühen bzw. Tropfen wurden geöffnete Blüten und junge Schoten markiert.

Beim Tauchen wurde der blühende *A. thaliana* Stängel komplett in die Sporenlösung getaucht.

Beim Sprühen wurde der obere blühende Bereich des Stängels jeweils zweimal mittels einer 20 ml Sprühflasche besprüht.

Für Tropfversuche wurden Tropfen mit je 2 µl der Sporensuspension auf die geöffneten Blüten bzw. die jungen Schoten mittels Pipette gegeben.

Um für die Pilzsporen eine ausreichend hohe Luftfeuchtigkeit zu erreichen, wurden die infizierten Pflanzen in etwas Wasser unter einen Autoklavierbeutel gestellt. Am ersten Tag wurden die Pflanzen im Dunkeln gehalten, an den weiteren 5 Tagen standen sie im Licht bei einer Temperatur von ca. 22°C. Am dritten Tag wurden infizierte Blüten und Schoten getrennt für die RNA-Extraktion geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert. Zum Anfärben des Pilzmyzels wurden Blüten oder Schoten von *A. thaliana* am 6. Tag geerntet, entfärbt und das Myzel mittels Tintenfärbung sichtbar gemacht (siehe 2.2.3.1).

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *A. thaliana*-Blättern

Zur RNA-Isolierung wurden jeweils 2 gleichaltrige (nicht zu alte) Blätter von *A. thaliana* in 3facher Wiederholung geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die RNA-Aufarbeitung erfolgte nach den Herstellerangaben von AppliChem. Die gefrorenen Proben wurden in 1 ml Tritidy homogenisiert und intensiv gemischt. Die Suspension wurde 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben ca. 30 Sekunden geschüttelt. Nach der Inkubation von 5 Minuten bei RT erfolgte ein Zentrifugationsschritt (15 Minuten bei 4°C und 13000 rpm) zur Trennung der wässrigen und organischen Phase. 600 µl der oberen wässrigen Phase, die die RNA enthält, wurden mit 500 µl Isopropanol präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zum Entfernen der Kohlenhydrate mit 750 µl 3 M LiCl 10 Minuten bei RT unter max. Schütteln versetzt und im Anschluss zentrifugiert (10 Minuten bei RT und 13000 rpm). Das Pellet wurde durch Zugabe von 85 % EtOH gewaschen. Das Präzipitat wurde an der Luft getrocknet und in 20 µl DEPC-behandeltem H₂O resuspendiert. Dazu wurden die Proben ca. 30 Minuten auf Eis gestellt und im Anschluss 15 Minuten bei 65°C gelöst. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Die Konzentration der RNA-Proben wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Absorption von 1.0 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/µl.

2.2.4.2 RNA-Agarosegelelektrophorese

Für ein 1.2 %iges Gel wurden 1.2 g Agarose in 62,2 ml H₂O in der Mikrowelle erhitzt und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit 5 x „Running Buffer“ (20 ml) und 37% Formaldehyd (17,7 %) gemischt und in die Gelträger gegossen. Nach dem Erkalten wurden ca. 8 µg RNA mit Ladepuffer add. 20 µl in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1x „Running Buffer“ bei 100 V für ca. 1 Stunde. Zur Dokumentation wurden die Agarosegele unter UV-Licht fotografiert.

2.2.4.3 Northern-Blot-Analysen

Der Transfer von RNA auf eine Nylonmembran erfolgte mittels Kapillarblot. Die Northern-Blot-Analyse diente dazu, die Expression bestimmter Gene zu untersuchen.

Das Whatman Papier wurde vor der Verwendung kurz in 20 x SSC äquiliert, die Nylonmembran in H₂O. Der Schwamm wurde in 20 x SSC in eine Plastikschaale gelegt. Unter Vermeidung von Luftblasen wurde die Blot-Apparatur zusammengebaut. Der vollständige RNA Transfer war nach 18 bis 24 Stunden bei RT vollzogen. Zur Fixierung der Nukleinsäuren an die Membran wurde diese für 2 Stunden bei 80°C inkubiert.

2.2.4.3.1 Hybridisierung von Northern-Blots mit [³²P] markierten Sonden

Nach Ehness et al. (1997) wurde zu 100 ng Sonden-DNA 10 µl Hexanucleotide und 5x Reaktionspuffer zugegeben, auf 40 µl mit H₂O aufgefüllt und gut gemischt. Nach 10 Minuten bei 95°C wurden die Proben 3 Minuten auf Eis gestellt und zentrifugiert. Zum Gemisch wurde 3 µl Mix A (aus dem MBI-Hexalabel-DNA Labelling Kit), 1 µl Klenow-Enzym (zur Neusynthese des Komplementärstranges) und 5 µl [³²P] dATP zugegeben, kurz zentrifugiert und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 4 µl dNTP-Mix erfolgte eine erneute Inkubation 10 Minuten bei 37°C. Zur Überprüfung der in die DNA eingebauten Radioaktivität und der Entfernung nicht eingebauter Radioaktivität wurden die Proben auf Microspin Säulen gegeben und 2 Minuten zentrifugiert (720 g und RT). Um zu überprüfen, ob 50 % der Radioaktivität eingebaut wurde, wurde mit einem Gamma Zähler die Radioaktivität im Durchfluss und die auf den Säulen verbliebene Radioaktivität abgeschätzt.

Die Denaturierung der radioaktiven Sonde erfolgte durch Inkubation bei 95°C für 8 Minuten. Anschließend wurden die Proben mehrere Minuten auf Eis gestellt. Die Prähybridisierung erfolgte für 1 Stunde bei 42°C im Wasserbad-Schüttler. Im Anschluss wurde die radioaktiv markierte Gensonde hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Im Anschluss wurden die Filter gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen (1 x 5 Minuten, 1 x 10 Minuten mit vortemperierter Waschlösung 1 (2 x SSC; 0,1 % SDS), anschließend 2 x 5 bis 10 Minuten mit vortemperierter Waschlösung 2 (0,2 x SSC; 0,1 % SDS) jeweils bei 42°C). Die Membranen wurden in Folie für 24 bis 48 Stunden auf einen „Screen“ bei RT im Dunkeln für einen Tag aufgelegt und anschließend im PhosphorImager die Stärke der Signale ausgewertet.

Markierte Gensonden wurden bei 4°C gelagert. Bei erneuter Verwendung der Gensonde wurde diese in der Prähybridisierungslösung für 10 Minuten bei 95°C denaturiert, für 3 Minuten abgekühlt und auf bereits prähybridisierte Membranen gegeben. Nachfolgende Arbeitsschritte siehe oben.

2.2.4.4 Durchführung der Microarray-Analyse

Für die Microarray-Analyse wurden RNA-Proben von Col-0 2 Tage nach Hefe- bzw. nach H₂O-Behandlung aus 2 unterschiedlichen Versuchen gepoolt. Die RNA-Proben wurden nach (2.2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *A. thaliana*-Blättern) aufgearbeitet und im Anschluss zur besseren Haltbarkeit gefällt.

Für die Fällung wurden 60 µg RNA ad. 60 µl mit DEPC behandeltem H₂O mit 7 µl 2 M Natriumacetat und 114 µl EtOH (reinst) vermischt.

Die Aufarbeitung und Auswertung (Raacke et al., 2006) erfolgte im GSF-Forschungszentrum, Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie, Oberschleissheim von Frau Uta von Rad. Für die Mikroarray-Analyse wurden etwa 1400 Gene, die hauptsächlich mit der Pflanzenabwehr in Verbindung stehen, getestet.

2.2.4.5 Sondenherstellung

Folgende Sonden wurden verwendet: *Pr1* (At2g14610), *Pr2* (At3g57260), *Gst1* (At1g02930), *Gst2* (At4g02520), *Lox2* (At3g45140), *Aos* (At5g42650), *Pdf1.2* (At5g44420). Die Sonde *Tri5* (FG03537, gi33413586) wurde neu hergestellt. Die Durchführung wird nachfolgend beschrieben.

2.2.4.5.1 Präparation von *F. graminearum* DNA

Nach Du Teau und Leslie (<http://51protocol.com/bio/mic/F/20061107/1103.html>) wurde *F. graminearum*-Myzel von einer mindestens 5 Tage alten PDA Platte abgekratzt und in vorgekühlte Reaktionsgefäße gegeben. Zum Aufschließen der Zellen wurden die Gefäße 2 x mit flüssigem Stickstoff gefüllt, bzw. das Myzel aus einer CMC-Flüssigkultur wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Zum Myzel wurden 500 µl 65°C Lysis Puffer gegeben und 1 Stunde bei 65°C inkubiert (nach jeweils 30 Minuten wurden die Proben geschüttelt). Nach der Zugabe von 500 µl Roti-Phenol erfolgte ein Zentrifugationsschritt (5 Minuten bei 8000 rpm und RT). 450 µl der wässrigen Phase wurden abgenommen, die gleiche Menge Roti-Phenol zugegeben und erneut zentrifugiert. 400 µl der wässrigen Phase wurden abgenommen und die gleiche Menge Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Nach der Zentrifugation wurden 350 µl der wässrigen Phase abgenommen, 50 µl 4 M Ammoniumacetat und 880 µl 95 % EtOH zugegeben und gemischt. Die Proben wurden mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert und 20 Minuten zentrifugiert (13000 rpm und RT). Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets an der Luft wurde es in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Zum Entfernen der noch vorhandenen degradierten RNA in den Proben wurden 50 µl DNA-Probe mit 1 µl RNase (50 µg/ml) 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach der Zugabe der gleichen Menge Roti-Phenol erfolgte ein Zentrifugationsschritt (5 Minuten bei 8000 rpm und RT). Die wässrige Phase wurde abgenommen, die gleiche Menge Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und erneut zentrifugiert. Zur wässrigen Phase wurden 6 µl 4 M Ammoniumacetat und 100 µl 95 % EtOH zugeben, gemischt und mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach der Zentrifugation (20 Minuten bei 13000 rpm und RT) wurde das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 10 µl TE-Puffer aufgenommen. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der DNA Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm. Eine Absorption von 1.0 entsprach einer DNA-Konzentration von 50 µg/µl.

2.2.4.5.2 Gradienten PCR

Die PCR („Polymerase Chain Reaction“) dient zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. In drei Teilschritten, die bis zu 40 Mal wiederholt werden, erfolgt die Hitzedenaturierung der DNA, das Anlagern von spezifischen Primern und die DNA-Neusynthese. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge der Kopien.

Der PCR-Ansatz enthielt:

2 µl DNA (10 ng)
2 µl 10 x Puffer
0,2 µl MgCl₂ (0,5 mM)
1 µl dNTPs (2 nmol)
1 µl Taq (1U)
1 µl Primer F 100 pmol/µl (1:5)
1 µl Primer R 100 pmol/µl (1:5)
ad. H₂O 20 µl

Deckeltemperatur 99 °C

<u>3 min</u>	<u>94°C</u>	<u>Initiale Denaturierung</u>	
30 sec	94°C	Denaturierung	
45 sec	45-56°C	„Annealing“ (Primeranlagerung)	35 Zyklen
<u>1 min</u>	<u>72°C</u>	<u>Polymerisation (Primerverlängerung)</u>	
10 min	72°C	Komplettierung der DNA-Doppelstränge	
∞	10°C	Abbruch der Reaktion	

Dauer des Programms: 1 Stunde 55 Minuten.

2.2.4.5.3 DNA-Agarosegelelektrophorese

Linearisierte DNA-Moleküle wurden der Größe nach aufgetrennt und wanderten aufgrund der negativen Ladung ihres Phosphatrückrates im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Konzentration des Agarosegels und von der Größe der Fragmente.

Agarose wurde in einer Konzentration von 0.8 bis 1 % in 1 x TBE-Puffer verwendet. Für die Herstellung eines 1 %igen Gels wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden 7 µl Ethidiumbromid zugesetzt und in Gelträger gegossen. Ethidiumbromid ist in der Lage, sich in die DNA-Doppelhelix einzulagern. Dadurch wurde die DNA im UV-Licht sichtbar gemacht. Als Größenstandard diente ein *Hind*III und *Eco*RI verdauter λ-Marker (564 bis 21226 bp). Die Taschen des Gels wurden mit DNA-Proben (2 bis 4 µl DNA wurden mit 2 µl DNA-Laufpuffer add. 20 µl H₂O) beladen. Das Gel lief bei einer Spannung von 100 V für ca. 1 Stunde. Anhand der bekannten Bandengrößen des Markers wurden die Größe und Menge der eingesetzten DNA-Proben abgeschätzt.

Fragmentgrößen des *Hind*III und *Eco*RI verdauten λ -Markers:

21226 bp
5148 bp
4973 bp
2027 bp
1904 bp
1584 bp
1375 bp
947 bp
831 bp
564 bp

2.2.4.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Banden, die auf einem DNA-Gel für die Sondenherstellung verwendet werden sollten, wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Das Eluieren aus dem Gel erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel). Aufgenommen wurden die Proben in 20-25 µl NE Puffer.

2.2.4.5.5 Ligation in einen Vektor

Die T4-Ligase verknüpft freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden durch Bildung einer Phosphordiesterbindung. Es können sowohl „blunt“- als auch „sticky“-Enden von T4-Ligase verknüpft werden.

Die Ligation wurde entweder mit Hilfe des pGEM-T Easy Vector System I Kit nach Herstellerangaben durchgeführt (A) oder mit Hilfe des pAN7-1 Vektors (B).

Zusammensetzung des Standard-Ligations-Ansatzes (A):

2 x Ligations-Puffer (T4 DNA-Ligase)	10 μ l
pGEM T-Easy Vector	50 ng
T4 DNA-Ligase	1 U
PCR-Produkt	8 μ l
<hr/>	
dH ₂ O	ad. 10 μ l

Zusammensetzung des Standard-Ligations-Ansatzes (B):

10 x Ligations-Puffer	1 μ l
pAN7-1 Vektor	10-20 ng
T4 DNA-Ligase	1 U
LOX Fragment	5 μ l
<hr/>	
dH ₂ O	ad. 10 μ l

Das LOX Fragment wurde vor der Ligation entweder mit *PvuII* oder *BglII* geschnitten.

Die DNA-Fragmente wurden mit dem Vektor im molaren Verhältnis 3:1 mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Im Anschluss wurde der gesamte Ligationsansatz in *E. coli* DH5 α transformiert.

2.2.4.5.6 Präparation von kompetenten Zellen

DH5 α : Beschreibung nach Sambrook et al. (2001): F⁻ Φ 80d Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 end A1 rec A1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) deoR thi-1 supE44 λ - gyrA96 relA1 (Hanahan, 1983).

Kompetent bedeutet fähig Plasmid-DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Der *E.coli* Stamm DH5 α wurde in 3 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht kultiviert. Von der Übernachtskultur wurde 1 ml in 50 ml LB-Medium überimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0.35 wurden die Proben 10 Minuten auf Eis gestellt, danach 10 Minuten zentrifugiert (2500 rpm und 4°C). Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem 80 mM MgCl₂ und 20 mM CaCl₂ resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und 3 Stunden auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 70 μ l DMSO wurde die Lösung für 15 Minuten auf Eis

gestellt. Anschließend wurde erneut 70 µl DMSO zugegeben und gemischt. Nach der Zugabe von 200 µl Glycerin und einem vorsichtigen Mischen wurde der Ansatz in 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Kompetenz der Bakterien wurde mit dem Plasmid pUC19 getestet und in Kolonien pro eingesetzter DNA angegeben. Sie lag bei $3,2 \times 10^7$ Kolonien/µg verwendeter Plasmid-DNA (idealerweise zwischen 10^7 und 10^8).

2.2.4.5.7 Bakterientransformation

Die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien (Herstellung kompetenter Bakterien siehe 2.2.3.5) wird als Transformation bezeichnet. Zu den auf Eis aufgetauten DH5α Zellen wurde die gesamte Plasmid-DNA des Ligationsansatzes hinzugegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 1 Minute 30 Sekunden bei 42°C (zur Aufnahme der Plasmide) und 1 Minute 30 Sekunden auf Eis erfolgte das Wachstum in 900 µl LB-Medium für 1 Stunde bei 37°C und 400 rpm. Nach einem Zentrifugationsschritt (2 Minuten bei 5000 rpm und RT) wurden 850 µl Überstand verworfen, das Bakterien-Pellet mit der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und unter entsprechender Antibiotikum-Selektion ausplattiert. Das Wachstum der Transformanden erfolgte über Nacht bei 37°C.

Einzelne Kolonien aus der Mitte der Platte wurden markiert und jeweils mit einer Impföse in 3 ml LB-Medium versetzt mit 3 µl Ampicillin als Übernachtskultur bei 37°C in Kulturröhrchen geschüttelt. Im Anschluss wurde eine Minipräparation durchgeführt.

2.2.4.5.8 Minipräparation

Eine Minipräparation wurde für Plasmid-DNA Mengen ≤ 20 µg durchgeführt.

2 ml der Übernachtskultur (siehe 2.2.4.2.6) wurden zentrifugiert (5 Minuten bei 13000 rpm und RT) und die Pellets in 150 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurde 150 µl Lösung II zugeben und kurz gemischt. Die Proben inkubierten 5 Minuten bei RT, wobei die Bakterien lysierten. 150 µl Lösung III wurde hinzugegeben und kurz gemischt. Die nun klare Flüssigkeit wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C). Der klare Überstand wurde mit 600 µl Phenol und 100 µl Chloroform versetzt, gemischt und 2 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation (5 Minuten bei 13000 rpm und RT) wurden die Proben durch Zugabe von 600 µl Isopropanol zur wässrigen Phase gefällt. Die Proben inkubierten 30 Minuten bei -20°C. Nach einer erneuten Zentrifugation (15 Minuten bei 14000 rpm und 4°C) wurde das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen

der Pellets wurde diese in je 40 µl H₂O versetzt mit 1:100 RNaseA (10 mg/ml) gelöst. Die Proben lagerten bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

2.2.4.5.9 Restriktionsverdau

Verwendet wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen, die DNA-Sequenzen hydrolytisch spalten. Dabei entstehen entweder stumpfe (blunt-end) (z.B. durch *EheI*) oder überhängende (sticky-end) Enden (z.B. durch *ApaI*, *PstI* oder *BglII*). Der Verdau mit den Restriktionsenzymen *ApaI* und *PstI* für das *Tri5* enthaltene Plasmid erfolgte nach Herstellerangaben hinsichtlich des Reaktionspuffer und der optimalen Reaktions-Temperatur.

2	µl	10 x Reaktionspuffer
1	U	<i>ApaI</i>
1	U	<i>PstI</i>
4	µl	DNA (10 ng)
<u>1</u>	<u>µl</u>	<u>RNase (50 µg/ml)</u>
ad.	20	µl H ₂ O

Lt. Definition ist 1 U ist die Enzymmenge, die 1 µg doppelsträngige DNA in 1 Stunde bei 37°C spaltet. Im Anschluss erfolgte eine DNA-Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.2.1) zur Überprüfung der Bandengröße.

2.2.4.5.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977) und wurde am Lehrstuhl Botanik I an der Universität Würzburg durchgeführt. Zur Überprüfung der DNA-Sequenzen wurden bekannte Sequenzen mittels BLAST-Algorithmus verglichen.

2.2.4.6 Herstellung eines Konstruktes zur Zerstörung des Lipoxygenase- Gens durch homologe Rekombination

2.2.4.6.1 Klonierung eines LOX-Fragmentes in den pGEM T-Easy Vektor

Die Zielsequenz des LOX-Gens, in die durch homologe Rekombination die Insertionsmutagenese stattfinden sollte, wurde so gewählt, dass sie mindestens 800 Bp lang war. Außerdem besaß sie eine Schnittstelle für ein Enzym, das glatte Enden

herstellte. Diese glatten Enden befanden sich an einer Position, wo an beiden Seiten der Schnittstelle noch mindestens 400 Bp vorhanden waren. Von Maier et al. (2005) wurde beschrieben, dass eine Größe von mindestens 800 Bp und eine Linearisierung die Rate der homologen Rekombination erhöhen. An den Positionen 606 und 632 des LOX-Gens sind Restriktionsstellen für *EcoRV* vorhanden. Deshalb wurde ein 916 Bp-Fragment so gewählt, dass 358 Bp vom Beginn des Vorwärts-Primers bis zur ersten *EcoRV*-Stelle und 432 von der zweiten *EcoRV*-Schnittstelle bis zum Ende des Rückwärts-Primers vorhanden waren (Abb. 2.1). Die Primer verfügen außerdem noch über Schnittstellen für *PvuII* und *BglII* für die Klonierung in den Vektor pAN7-1.

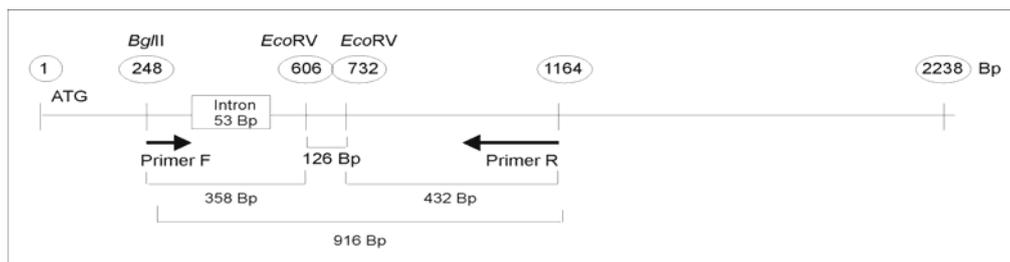


Abbildung 2.1: *F. graminearum* LOX (gi 46110668; FG02216)

Der Reaktionsansatz der Gradienten-PCR (siehe 2.2.4.5.2) erfolgte mit den Primern FgLOX F und FgLOX R (von Frau S. Berger zur Verfügung gestellt) ohne MgCl₂.

Primername	Sequenz
Fg LOX F	5'-CAGCAGCTGAGATCTACAGCATTCTGG-3'
Fg LOX R	5'-CAGCAGCTGAGATCTTCGGTTGAAGATG-3'

Die Schnittstelle für *PvuII* ist rot dargestellt, die Schnittstelle für *BglII* blau.

Die Bedingungen für das PCR-Protokoll wichen von 2.2.4.5.2 wie folgt ab:

<u>3 min</u>	<u>95°C</u>	<u>Initiale Denaturierung</u>	
30 sec	95°C	Denaturierung	
45 sec	41-49°C	„Annealing“ (Primeranlagerung)	35 Zyklen
<u>1,05 min</u>	<u>72°C</u>	<u>Polymerisation (Primerverlängerung)</u>	
10 min	72°C	Komplettierung der DNA-Doppelstränge	
∞	5°C	Abbruch der Reaktion	

Dauer des Programms: 1 Stunde 56 Minuten.

Bei einer Annealing Temperatur von 45°C wurde eine Bande im DNA-Gel nachgewiesen und wie unter 2.2.4.5.5 beschrieben, in den pGEM ligiert. Der komplette

Ligationsansatzes wurde, wie unter 2.2.4.5.6 beschrieben, in *E. coli* transformiert. Die Sequenzierung erfolgte am Lehrstuhl für Botanik I (siehe Anhang Abb. 8.1).

2.2.4.6.2 Midipräparation

Anstelle der Minipräparation wurde bei Plasmid-DNA Mengen von 20 bis 100 µg für die Transformation von *F. graminearum* eine Midipräparation durchgeführt.

Die Midipräparation erfolgte mit dem Nucleo Bond PC100 Kit von Macherey-Nagel. Der entsprechende Klon wurde in 2 x 75 ml LB + Amp (100 µg/ml) Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt und anschließend zentrifugiert (15 Minuten bei 4500 g und 4°C). Das Pellet wurde unter starkem Schütteln in 8 ml Lösung A resuspendiert. Im Anschluss wurde 8 ml Lösung B zugegeben und 6 bis 8 Mal über Kopf geschüttelt. Es folgte ein Inkubationsschritt für 2 bis 3 Minuten bei RT. Nach der Zugabe von 8 ml Lösung C und vorsichtigem Mischen wurden die Proben 5 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss filtriert. Das Filtrat wurde auf eine NucleoBond Säule gegeben und weiter nach dem Herstellerprotokoll (Macherey-Nagel) gearbeitet.

2.2.4.6.3 Klonierung eines LOX-Fragmentes in den pAN7-1 Vektor

Für das Einbringen der LOX-Sequenz in den Pilz-Transformationsvektor pAN7-1 wurden zwei Strategien verfolgt.

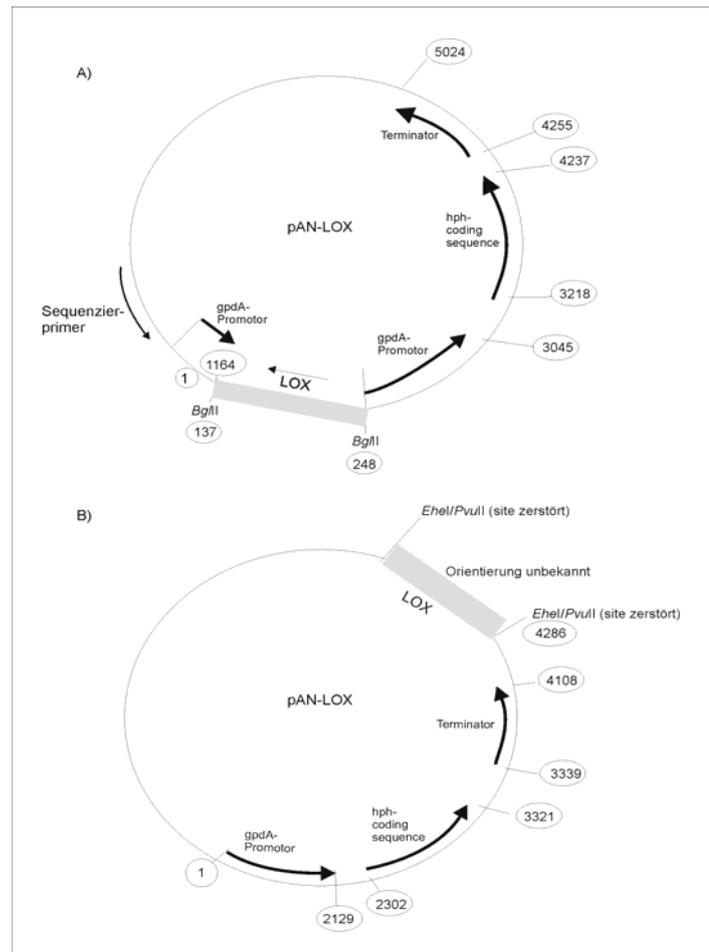


Abbildung 2.2: pAN7-1 mit LOX in *BglII*-site (A); pAN7-1 mit LOX in *Ehel*-site (B).

2.2.4.6.4 Strategie 1

Bei Strategie 1 wurde der pGEM-LOX mit *BglII* geschnitten, der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und das 916 Bp LOX-Fragment aus dem Gel eluiert. Der Vektor pAN7-1 wurde ebenfalls mit *BglII* geschnitten und dephosphoryliert.

Die Dephosphorylierung (cip = „calf intestinal alkaline phosphatase“) dient zur Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA. Beispielsweise wurde zu pAN7-1 geschnitten mit *BglII* im Anschluss an den Restriktionsverdau (15 µl Verdau), 2 µl CIAP 10 x Puffer und 1 µl CIP (10 U) add. 20 µl H₂O zugesetzt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei einer weiteren Inkubation von 15 Minuten bei 65°C wurde die Reaktion gestoppt. Zur Reinigung der dephosphorylierten DNA-Fragmente wurde der gesamte Ansatz auf ein DNA-Gel aufgetragen und eluiert.

Die Schnittstelle liegt im Vektor pAN7-1 im Promotorbereich des Gens für die Hygromycin-Resistenz. Das LOX-Fragment und der geschnittene Vektor wurden ligiert

und kompetente *E. coli* DH5 α mit dem gesamten Ansatz transformiert. Putative Transformanten wurden auf Ampicillin-haltigem Medium selektioniert.

Für den Nachweis, dass das LOX-Gen im pAN7-1 Vektor enthalten ist, wurde eine Restriktion mit *Bgl*I durchgeführt. Die anschließende Sequenzierung erfolgte am Lehrstuhl der Botanik I.

2.2.4.6.5 Strategie 2

Bei Strategie 2 wurde das LOX-Fragment mit *Pvu*II, einem Enzym, das glatte Enden herstellt, aus dem pGEM-LOX-Plasmid ausgeschnitten und in den mit *Ehe*I geschnittenen und dephosphorylierten pAN-Vektor ligiert. Bei der Restriktion mit *Ehe*I entstehen ebenfalls glatte Enden.

Durch den Nucleo Bond PC100 Kit von Macherey-Nagel wurde nach Herstellerangaben aus 150 ml LB-Medium ca. 500 ng DNA isoliert. Für die Linearisierung wurde 1 μ l DNA mit 1 U *Eco*RV verdaut.

Für den Nachweis, dass das LOX-Gen im Vektor vorhanden war, wurde eine Restriktion mit *Eco*RI durchgeführt. Die anschließende Sequenzierung erfolgte am Lehrstuhl der Botanik I.

2.2.5 Analytische Methoden

2.2.5.1 Camalexin-Aufarbeitung

Mindestens 200 mg Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Anschließend wurden 500 μ l 80 % MeOH (p.a.) und 50 μ l 6-FICA (1 mg/ml in MeOH p.a.) als Standard hinzu gegeben und 10 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Nach dem Zentrifugieren (5 Minuten bei 13000 rpm und RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Zum Blattmaterial wurde 250 μ l 80 % MeOH p.a. gegeben und erneut 10 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Der Überstand wurde mit dem ersten vereinigt. Zum Entfernen von Chlorophyll wurde 800 μ l Petroleumbenzin zugegeben, ca. 10 Sekunden gemischt und 1 Minute zentrifugiert bei 3500 rpm und RT. Die obere Phase wurde verworfen (Raacke et al., 2006). Nach dreifacher Wiederholung wurden die Proben bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie:

Die HPLC ist eine hochauflösende Methode, um Stoffgemische voneinander zu trennen. Die Methode wurde zur Camalexin-Messung herangezogen.

HPLC-Anlage: Analytische HPLC (Waters)

Trennsäule: Purospher STAR RP-18 ec (250 x 4.6 mm, Partikelgröße 5 µm; Merck, Darmstadt)

Laufmittel A: Wasser

Laufmittel B: Acetonitril

Gradient:	LM A [%]	LM B [%]	Zeit [Minuten]
	100	0	0
	90	10	1
	80	20	6
	80	20	16
	45	55	33,5
	45	55	34
	0	100	45

Flussrate: 1 ml Minute⁻¹

Fluoreszenz-Detektor: $\lambda_{\text{ex}} = 305 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{em}} = 364 \text{ nm}$

Injektionsvolumen: 50 µl

Retentionszeit: Camalexin 37.7 Minuten

Retentionszeit: 6-FICA 29.3 Minuten

2.2.5.2 Bestimmung von JA, OPDA und SA in Blättern bzw. im Pilzmyzel

Zu 500 mg Blattmaterial (bzw. Myzel und Sporen von 2 PDA-Platten) wurden 25 ml gesättigte NaCl-Lösung, 200 µl 1 M Citronensäure und 400 µl BHT gegeben und mit Ether auf 40 ml aufgefüllt. Zum Ansatz wurde 100 ng [DH]-JA (von Kathrin Karg zur Verfügung gestellt) als interner Standard zugegeben; mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und im Anschluss zentrifugiert (6 Minuten bei 3000 rpm und 4°C). Nach dem Abnehmen der Etherphase wurde zum Probengemisch erneut Ether gegeben und zentrifugiert. Nach dem Vereinigen der Etherphasen wurde diese unter Luftdruck bei 40°C getrocknet. Die trockenen Proben wurden in 500 µl Ether aufgenommen. Nach dem Auftragen der Probe auf eine Aminopropyl-Säule wurde diese mit 1 Säulenvolumen Chloroform/Isopropanol (2:1) gewaschen. Zwei Säulenvolumen Ether/Essigsäure (98:2) wurden auf die Säulen gegeben und das aufgefangene Eluat unter Druckluft bei 40°C getrocknet. Zum trockenen Eluat wurden 200 µl Chloroform, 10 µl DIEA und 10 µl PFB zugegeben. Die Derivatisierung erfolgte im Wasserbad 45 Minuten bei 40°C. Nach dem Trocknen der Proben wurden diese in 500 µl Hexan aufgenommen, auf Si(OH)₄-Säulen gegeben und mit 3 Säulenvolumen Hexan/Ether (2:1) eluiert. Nach dem Trocknen des Eluats wurden die Proben in 500 µl Chloroform bei -20°C gelagert.

Zum Silylieren der Proben wurden diese mit 200 µl Chloroform und 50 µl BSTFA 45 Minuten bei 40°C inkubiert, getrocknet, in 100 µl Hexan aufgenommen und im GC-MS im NICI-Modus („negative ion chemical ionisation“) gemessen.

Zur Stimulierung der JA-Bildung in *F. graminearum* wurde das Pilzmyzel von 2 PDA-Platten in 50 µM Linolensäure für 75 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das Myzel abzentrifugiert (10 Minuten bei 3500 rpm) und bei -80°C gelagert. Die Zerkleinerung des Pilzmyzels erfolgte mittels Ultra-Turrax (6 x für 10 Sekunden) und anschließendem intensiven Mischen mit Glaskugeln. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei den Blattproben.

3. Ergebnisse

Hefe wurde in der Literatur bereits als Elicitor für die Aktivierung der Sekundärstoffakkumulation in Zellkulturen (Basse und Boller, 1992; Blechert et al., 1995; Parchmann et al., 1997; Menke et al., 1999; Suzuki et al., 2005) und für die Induktion von Resistenzmechanismen in Gerste und Sojabohne (Hahn und Albersheim, 1978; Reglinski et al., 1994) beschrieben. Die Elicitierung führte zu Abwehrreaktionen bzw. zur Resistenzerhöhung in Pflanzen. Eine nachweisbare Wirkung war zumindest in Laborversuchen vorhanden.

Wie schnell sich ein Pathogen in einer Pflanze ausbreiten und vermehren kann, ist abhängig davon, wie schnell und stark die Pflanze Abwehrreaktionen anschaltet. Wird die Abwehr der Pflanze vor einer Infektion aktiviert, erhöht sich die pflanzliche Resistenz. Der exakte Zeitpunkt einer Applikation ist wichtig, damit sich die Resistenz der Pflanze zum Zeitpunkt einer Infektion bereits aufgebaut hat. Zur gezielten Resistenzerhöhung ist es daher notwendig, die Mechanismen dieser Abwehrreaktionen genauer zu kennen.

Bisher ist über diese Mechanismen noch wenig bekannt. Daher sollte in den folgenden Versuchen am Modellorganismus *A. thaliana* untersucht werden, welche Signalwege angeschaltet werden. In *A. thaliana* ist eine Vielzahl von Mutanten in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen und die Sequenz des gesamten Genoms bekannt, so dass Mechanismen, die zur Resistenz führen, geklärt werden können.

3.1 Optimierung der Applikationsart des Hefe-Elicitors

Behandlungen mit autoklavierter Bäckerhefe bzw. mit Hefe-Zellwand-Elicitoren wurden bisher nur in verschiedenen Zellkulturen, nicht aber auf *A. thaliana* beschrieben. Zu Beginn der Versuche wurde die Art der Applikation bei *A. thaliana*-Pflanzen untersucht, bei der die Pflanzen nicht geschädigt werden und die Wirkung am effektivsten war. Hefe (Deutsche Hefe Werke, DHW) wurde in den Konzentrationen 0.1, 0.2 und 0.3 g/ml auf die Erde gegossen, in die Blätter infiltriert bzw. auf die Pflanzen gesprüht.

Um eine Wirkung von Hefe auf behandelten Pflanzen feststellen zu können, wurde entweder die Akkumulation des Phytoalexins Camalexin oder des Oxylipins Jasmonsäure (JA) analysiert, beides Abwehrreaktionen auf Stress. Ein weiterer wichtiger Entscheidungsfaktor für die Konzentration des Hefe-Elicitors war die Pflanzenverträglichkeit.

Um mit Hilfe eines Hefe-Elicitors die Resistenz in landwirtschaftlichen Kulturen gezielt zu erhöhen, wäre Giessen oder Sprühen eine praxistaugliche Anwendungsmaßnahme.

Als erste Applikationsart wurde das Giessen der Pflanzen mit autoklavierter Hefe untersucht. Bei verwendeten Konzentrationen von 0.1 und 0.2 g/ml Hefe konnte kein Anstieg des Camalexin-Gehaltes nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei 0.2 g/ml blieben die Pflanzen im Wachstum zurück. Das Giessen mit 0.3 g/ml führte zum Absterben der Pflanzen, vermutlich weil sich die Hefe als Schicht auf die Erde legte, die Erde nicht abtrocknen konnte und damit die Zellatmung der Wurzeln durch Sauerstoffmangel verhinderte. Das Giessen wurde nicht für die Hauptversuche herangezogen.

Das Infiltrieren einzelner Blätter als zweite Applikationsart mit 0.1 g/ml Hefe, in Anlehnung an *Pseudomonas*-Behandlungen, erzielte keine nennenswerte Erhöhung im JA-Gehalt nach 2, 4 oder 6 Stunden (Daten nicht gezeigt). Die Camalexin-Gehalte lagen beim Infiltrieren von 0.1 und 0.2 g/ml Hefe auf dem Niveau der Wasserkontrollen (Daten nicht gezeigt). Infiltrieren mit 0.3 g/ml führte zwar zu einer Erhöhung der JA-Spiegel, aber auch zu starker Blattschädigung, so dass diese Art der Applikation nicht weiter verfolgt wurde.

Als dritte Applikationsart wurde das Sprühen des Hefe-Elicitors mit bis zu 0.3 g/ml untersucht. Das Sprühen von *A. thaliana* Wildtypen und Mutanten mit Trichomen zeigte bei 0.3 g/ml eine gute Pflanzenverträglichkeit und eine Induktion des Phytoalexins Camalexin (Abb. 3.2). Die Pflanzengröße verringerte sich bei den mit Hefe gesprühten Pflanzen lediglich um $7\% \pm 0.48\%$, bezogen auf das Frischgewicht oberirdischer Pflanzenteile. Die Hefekonzentration von 0.2 g/ml erwies sich als günstig bei *A. thaliana* ohne Trichome (*Colgl* und *jin1*), weil die Pflanzen weniger geschädigt wurden.

3.2 Abwehrreaktionen der Pflanzen nach Hefebehandlung

3.2.1 Camalexin-Akkumulation

Hohe Camalexin-Gehalte wurden von *A. thaliana* als Abwehrreaktion nach Pathogenbefall (Nawrath und Métraux, 1999) bzw. nach Behandlungen mit Elicitoren (Zhao et al., 1998) akkumuliert. Eine Erhöhung des Phytoalexingehaltes nach Hefebehandlung konnte ebenfalls in Sojabohnen nachgewiesen werden (Hahn und Albersheim, 1978). Für die Untersuchung, ob *A. thaliana* auf Hefebehandlungen mit Abwehrreaktionen bzw. mit der Akkumulation von Phytoalexinen reagiert, wurden Camalexin-Messungen in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

3. Ergebnisse

In Abbildung 3.1 ist exemplarisch ein HPLC Chromatogramm von *A. thaliana* Col-0-Blättern 5 Tage nach Hefe- bzw. nach Wasserbehandlung dargestellt.

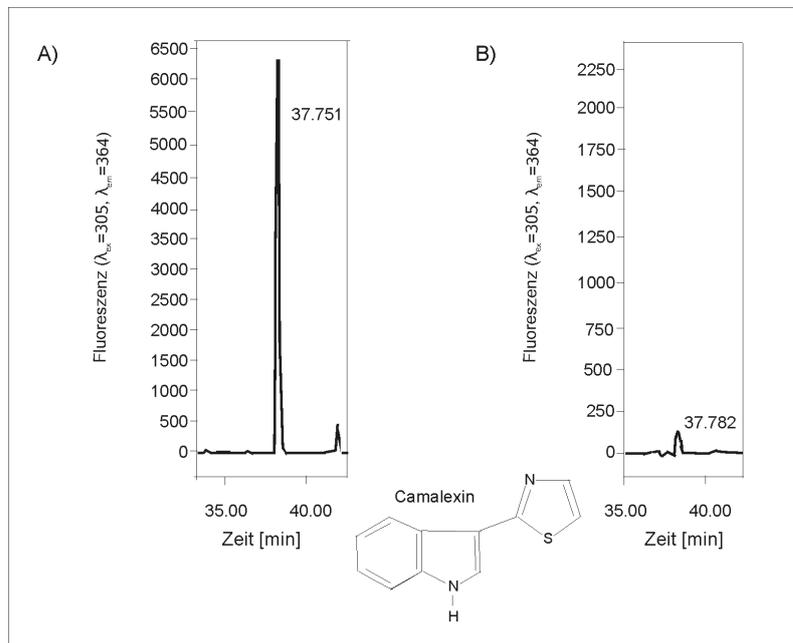


Abbildung 3.1: HPLC-Chromatogramm des Phytoalexins Camalexin. Exemplarisch dargestellt ist der Camalexin-Gehalt in Col-0 Blättern 5 Tage nach Hefe- (0.3 g/ml) (A) mit einer Retentionszeit von 37.751 Minuten, bzw. nach Kontrollbehandlung (Wasser) (B) mit einer Retentionszeit von 37.782 Minuten.

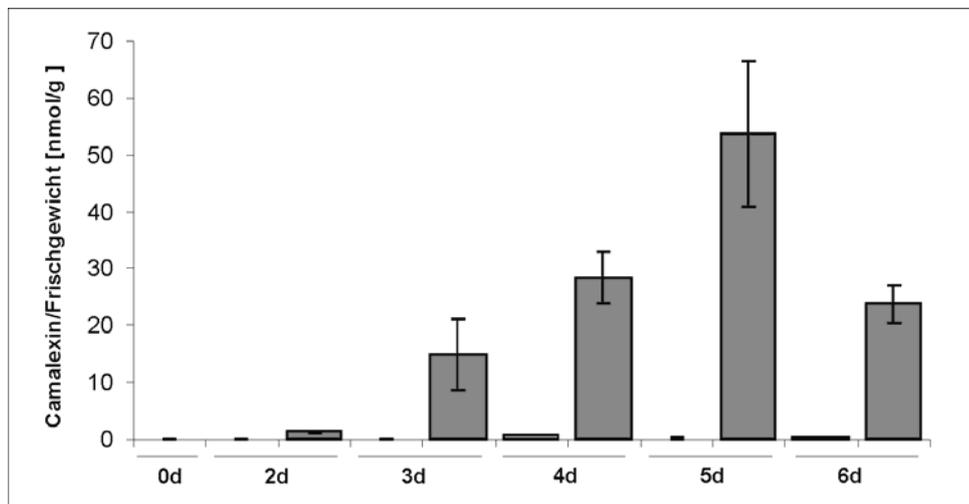


Abbildung 3.2: Camalexin-Akkumulation in *A. thaliana*-Pflanzen Col-0 nach Wasser- (hellgrau) Kontrolle bzw. Hefebehandlung (dunkelgrau) (0.3 g/ml). Die Werte wurden in 3 unabhängigen Experimenten ermittelt (Mittelwert \pm SD, n = 5).

Das Sprühen mit 0.3 g/ml Hefe bewirkte eine Akkumulation des Phytoalexins Camalexin (siehe 2.2.5.1) (Abb. 3.2). Am 5. Tag nach der Behandlung wurde das Maximum mit 54 nmol/g FG erreicht (entspricht 11 μ g/g FG). In der Literatur wurden

Camalexin-Werte von 8 (Tsuji et al., 1992) bzw. 280 µg/g FG (Tierens et al., 2002) nach Pathogenbefall beschrieben. Der Basalwert von Camalexin zum Zeitpunkt 0 Stunden lag bei 0.03 nmol/g FG. Am 5. Tag nach Hefebehandlung war ein Anstieg des Camalexin-Gehaltes um den Faktor 300 zu verzeichnen.

Das Sprühen mit niedrigeren Hefekonzentrationen (0.1 und 0.2 g/ml) führte zu einem Camalexin-Spiegel in Höhe der mit Wasser gesprühten Kontrolle.

Aufgrund der guten Pflanzenverträglichkeit und der Akkumulation von Camalexin wurden alle nachfolgenden Versuche mit Col-0 standardmäßig mit 0.3 g/ml Hefe gesprüht und Pathogenversuche 5 Tage nach dem Sprühen mit Hefe durchgeführt. Am 5. Tag lag das Maximum des Camalexin-Gehaltes, so dass die Pflanzen bereits Abwehrreaktionen aktiviert haben müssten, die eine Unterdrückung bzw. Verringerung der Pathogenausbreitung in *A. thaliana* zur Folge haben sollten.

3.3 Vergleich verschiedener Hefe-Herkünfte

Um zu überprüfen, ob die erzielten Ergebnisse auch mit anderen Hefe-Herkünften als mit der standardmäßig verwendeten Bäckerhefe (DHW) nachzuweisen sind, wurden die Hefen Dr. Moormann's (Hefe M) und Dr. Oetker (Hefe O) mit der standardmäßig eingesetzten Sprühkonzentration von 0.3 g/ml getestet.

Die Untersuchung einer möglichen Erhöhung des Camalexin-Gehaltes ergab 5 Tage nach dem Sprühen mit den unterschiedlichen Hefe-Herkünften einen Anstieg um den Faktor 20 oder mehr (Daten nicht gezeigt). Mit DHW-Hefe wurde die höchste Induktion aktiviert, daher wurde diese Hefeart für die nachfolgenden Versuche weiterverwendet.

Zum Vergleich der unterschiedlichen Hefe-Herkünfte wurden sowohl die Zelldichte (mittels Jessen-Zählkammer) als auch die Proteinkonzentration (nach Bradford ermittelt) bestimmt. Die Zelldichte der drei Hefesuspensionen (siehe 2.2.2.4) lag in vergleichbarer Größe zwischen 4×10^9 und 9×10^9 pro ml. Die Proteinkonzentration (siehe 2.2.2.3) der Hefe-Suspensionen unterschied sich nur geringfügig und lag zwischen 1.4 und 1.9 mg/ml.

3.4 Auswirkungen der Hefebehandlung auf Infektionen mit Pathogenen

Zur Überprüfung, ob durch das Sprühen mit Hefe eine Schutzwirkung in der Pflanze gegen Pathogene erreicht wird, wurden *A. thaliana*-Pflanzen 5 Tage nach der Wasser- bzw. Hefebehandlung mit dem virulenten Stamm des hemibiotrophen Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*P. syringae*) bzw. dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerera* (*B. cinerea*) infiziert.

3.4.1 Resistenz gegen *P. syringae*

Infiltrationen mit *P. syringae* mit einer Dichte von 1×10^6 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$ 5 Tage nach Wasser- bzw. Hefebehandlung führten auf *A. thaliana* Col-0 frühestens 3 Tage nach Infiltration zu ersten sichtbaren Blattsymptomen. Sowohl nach Wasser- als auch nach Hefevorbehandlung kam es zur Ausbildung von Läsionen, die von der Bildung erster Chlorosen relativ schnell in helle Nekrosen übergingen. Im Vergleich zur Wasservorbehandlung waren die makroskopisch sichtbaren Symptome bei der Hefevorbehandlung geringer (Abb. 3.3), so dass von einer Schutzwirkung durch Hefe ausgegangen werden konnte.



Abbildung 3.3: Symptome von Col-0 Pflanzen 4 Tage nach Infiltration mit *P. syringae* (Bakteriendichte: 1×10^6 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$). A) 5 Tage nach Wasser-, B) 5 Tage nach Hefevorbehandlung.

Zur Überprüfung, ob die Verringerung der Symptome auf den Blättern durch die Hefebehandlung mit einer Verlangsamung des Bakterienwachstum in den Blättern korreliert, wurde die Anzahl der Bakterien kurz nach der Infiltration (ca. 15 Minuten), nach 24 und nach 48 Stunden ermittelt. Dazu wurden 4 Blattscheiben in 3facher Wiederholung pro Zeitpunkt und Versuch geerntet (siehe 2.2.3.2).

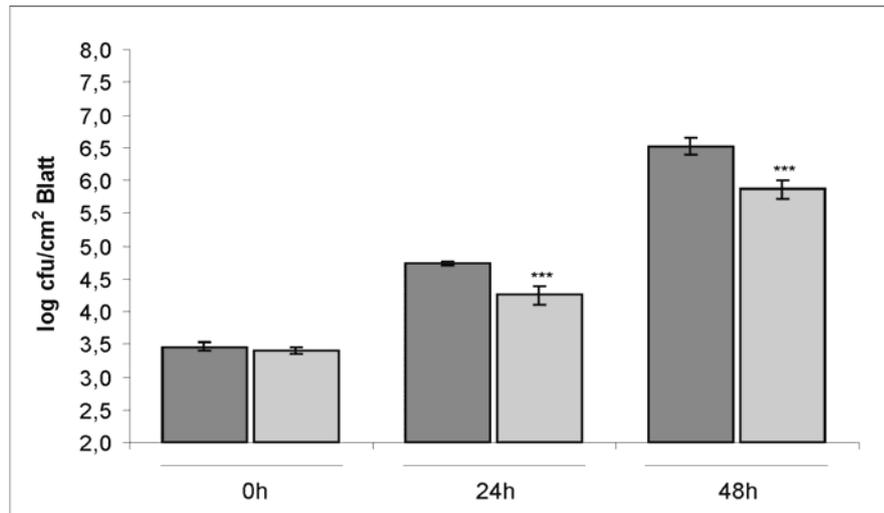


Abbildung 3.4: Effekt der Hefebehandlung auf den Wachstumsverlauf von *P. syringae*. Die Infiltration (Bakteriendichte: 1×10^6 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$) von Col-0 erfolgte 5 Tage nach Wasser- (dunkelgrau) bzw. Hefevorbehandlung (hellgrau). Die Ergebnisse wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt (Mittelwert \pm SD, n = 8). Die statistische Berechnung erfolgte mittels T-Test mit *** $p < 0.001$.

Nach gleicher Infiltrationsmenge der Bakterien zum Zeitpunkt 0 Stunden bei Wasser- und Hefebehandlung war das Bakterienwachstum signifikant reduziert, aber nicht vollständig gehemmt. Die Wachstumsrate der Bakterien verringerte sich in der Hefevorbehandlung um den Faktor 2,5 bis 8 im Vergleich zur Wasserbehandlung (Abb. 3.4). Der Unterschied konnte sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Infiltration nachgewiesen werden.

Diese Reduzierung im Bakterienwachstum stimmt mit der Reduktion der makroskopischen Symptomausprägung bei Col-0 überein (Abb. 3.3).

Für eine mögliche Anwendung in der Praxis ist es notwendig, die Dauer der Schutzwirkung einer Hefeanwendung zu kennen, um gegebenenfalls rechtzeitig vor erneuter Infektionsgefahr mit bestimmten Pathogenen die Kulturpflanzen durch eine wiederholte Hefebehandlung zu schützen. Daher wurden Infektionen mit *P. syringae* an verschiedenen Tagen (3 bis 15 Tage) nach dem Sprühen mit Wasser bzw. Hefe durchgeführt und anschließend nach 0, 24 und 48 Stunden die Anzahl der Bakterien im Blatt bestimmt.

3. Ergebnisse

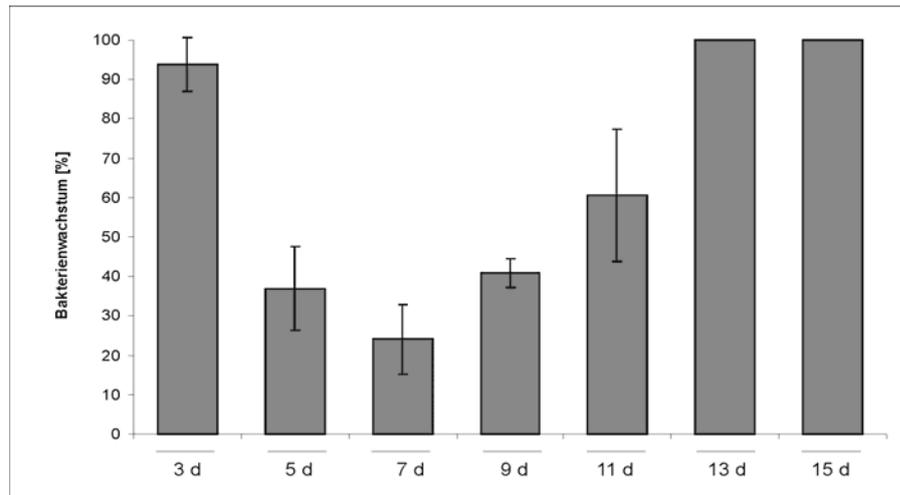


Abbildung 3.5: Dauer der Schutzwirkung gegen *P. syringae* (Bakteriendichte: 1×10^6 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$) bei Col-0 3 bis 15 Tage nach Hefebehandlung zum Beprobungszeitpunkt 24 Stunden. Dargestellt sind cfu/cm² Blatt der mit Hefe behandelten Pflanzen in Prozent der cfu/cm² Blatt der Kontrollpflanzen. Die Ergebnisse wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt (Mittelwert \pm SD, n = 6).

Die Schutzwirkung war zwischen 5 und 11 Tagen nach den Behandlungen deutlich zu detektieren, mit einem Maximum am 7. Tag. Am 13. und 15. Tag war kein Unterschied zwischen der Wasser- und Hefebehandlung mehr vorhanden (Abb. 3.5). Die Auswertung der Bakterienkolonien nach 24 und 48 Stunden zeigte vergleichbare Ergebnisse.

Stressreaktionen können zur Ausbildung von SAR führen, einer induzierten systemischen Abwehr in Pflanzen, die gebildet wird nach Infektionen mit avirulenten Pathogenen und die die Pflanze daraufhin vor virulenten Pathogenen schützt.

Zur Überprüfung des systemischen Schutzes nach einer Hefebehandlung wurden nur die älteren Blätter einer Pflanze mit Wasser bzw. mit Hefe gesprüht, während die jüngeren Blätter dieser Pflanze abgedeckt wurden (siehe 2.2.3.1).

5 Tage nach der Hefevorbehandlung erfolgte die Infiltration der jungen, nicht mit Hefe behandelten Blätter mit *P. syringae*.

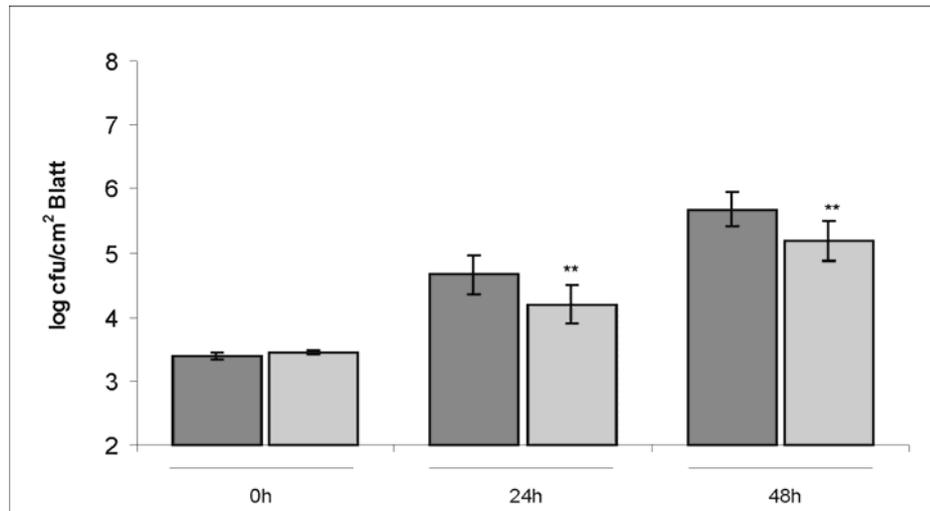


Abbildung 3.6: Systemischer Schutz bei Col-0 gegen *P. syringae* (Bakteriendichte: 1×10^6 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$). Wasservorbehandlung (Kontrolle) (dunkelgrau), Hefevorbehandlung (hellgrau). Die Werte wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, n = 9). Die Sterne kennzeichnen den signifikanten Unterschied zwischen Wasser- und Hefebehandlung mittels T-Test (** $p < 0.01$).

Nach gleicher Infiltrationsmenge war ein Anstieg der Bakterienpopulation sowohl nach der Wasser-, als auch nach der Hefebehandlung sichtbar (Abb. 3.6). In den hefebehandelten Pflanzen zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden war ein signifikanter Schutz mit einem Faktor von jeweils 2.9 zu detektieren. Dies deutet darauf hin, dass die Hefebehandlung auch eine systemische Abwehr induzierte, die zu einem Schutz der nicht mit Hefe behandelten Blätter führte.

3.4.1.2 Vergleich eines Hefe-Zellwand-Elicitors mit autoklavierter Bäckerhefe

Es sollte überprüft werden, welche Hefebestandteile für den Schutzeffekt in der Pflanze verantwortlich sind. Dazu wurde Bäckerhefe nach Baier et al. (1999) aufgearbeitet (siehe 2.2.2.2). In der Literatur führte die Behandlung von Sojabohne mit einem Hefe-Zellwand-Elicitor zu einer Resistenzhöhung gegenüber Mehltau (Reglinski et al., 1994).

Bisher wurde die Verwendung von Zellwand-Elicitoren hauptsächlich in Zellkulturen von *N. tabacum* (Meyer et al., 2001), *Medicago truncatula* (Suzuki et al., 2005) bzw. *Rauvolfia canescens* und *Eschscholtzia californica* (Gundlach et al., 1992) beschrieben, mit Aufwandmengen von ca. 100 μ g/ml.

In höheren Konzentrationen als für Zellkulturen wurde *A. thaliana* mit 300 μ g/ml bzw. 600 μ g/ml des Hefe-Zellwand-Elicitor besprüht und eine mögliche Wirkung auf das Bakterienwachstum von *P. syringae* untersucht. Eine Schutzwirkung war in 4

durchgeführten Versuchen mit dem hergestellten Hefe-Zellwand-Elicitor nicht zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

3.4.2 Resistenz gegen *B. cinerea*

Zur Überprüfung, ob die mit Hefe vorbehandelten Pflanzen eine veränderte Empfindlichkeit gegenüber *B. cinerea* aufwiesen, wurde Col-0 5 Tage nach Wasser- bzw. Hefevorbehandlung mit dem nekrotrophen Pilz infiziert. Die Auswertung erfolgte 48 und 72 Stunden nach Infektion, indem die Läsionengrößen getrennt nach Nekrosen und Chlorosen bestimmt wurden (siehe 2.2.3.1). Die quantitative Auswertung der Läsionen erfolgte mit dem Programm Surface (Rostas et al., 2006).

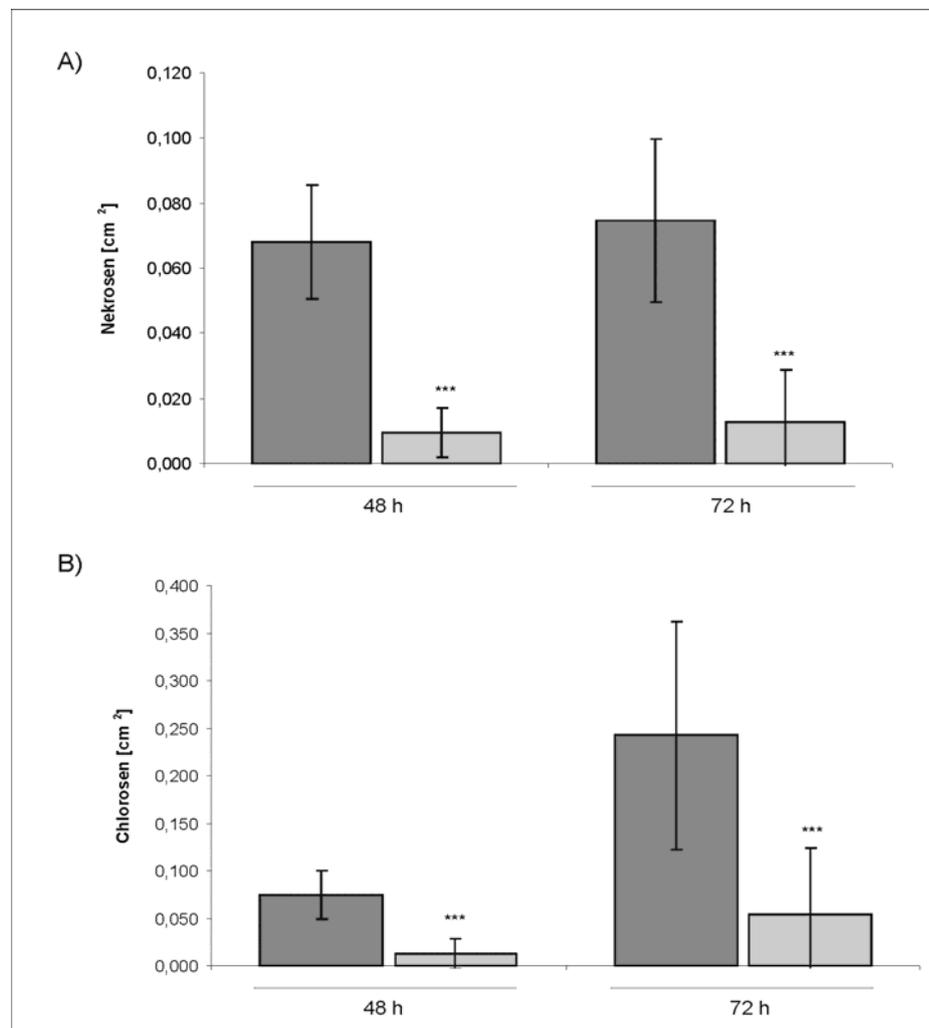


Abbildung 3.7: Nekrosen- und Chlorosengrößen von Col-0 infiziert mit *B. cinerea* (9×10^5 Sporen/ml in PD Broth) 5 Tage nach Wasser- (dunkelgrau) bzw. Hefevorbehandlung (hellgrau). Die Nekrosen- (A) und Chlorosengrößen (B) wurden 48 und 72 Stunden nach Infektion ermittelt. Die Ergebnisse wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, ***).

n = 52 bei den Nekrosen; n = 48 bei den Chlorosen). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt (**p < 0.001).

Behandlungen mit autoklavierter Bäckerhefe minderten die *B. cinerea*-Infektionen und damit die Läsionengrößen auf *A. thaliana* Col-0 Blättern. Die Nekrosen verringerten sich in den mit Hefe vorbehandelten Blättern nach 72 Stunden um den Faktor 6 (um 17 %) (Abb. 3.7 A), die Chlorosen um den Faktor 4 (um 9 %) (Abb. 3.7 B).

Nachdem die geringeren Sprühkonzentrationen des Hefe-Zellwand-Elicitors (siehe 3.4.1.2) bei der Schutzwirkung gegen *P. syringae* keine Verringerung des Bakterienwachstums zur Folge hatten, wurde die Konzentration für nachfolgende Infektionen mit *B. cinerea* deutlich heraufgesetzt. Der Einsatz des Hefe-Zellwand-Elicitors mit 5 und 10 mg/ml vor der Infektion mit *B. cinerea* zeigte 72 Stunden nach Infektion bei der Nekrosen- und Chlorosengröße einen 3fachen Schutz (Daten nicht gezeigt), während der Schutz, der durch autoklavierte Bäckerhefe erzielt wurde, zwischen 5 und 9fach lag.

3.5 Regulation der Genexpression durch Hefebehandlung

Pflanzen reagieren auf Stress oder Behandlungen mit Elicitoren mit einer verstärkten Expression von Genen, während andere Gene reprimiert werden. Um die Genregulation durch Hefebehandlung zu untersuchen, wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt.

Für den Microarray wurde Col-0 mit Wasser bzw. mit Hefe besprüht (siehe 2.2.4.4) nach 48 Stunden beprobt und RNA isoliert (siehe 2.2.4.1). Im cDNA Array (durchgeführt von Frau Uta von Rad) wurden besonders Gene untersucht, die an Stressreaktionen beteiligt sind. Dazu zählen Gene der systemisch erworbenen Resistenz (SAR „systemic acquired resistance“), der Detoxifikation und des JA/ET-Weges. Insgesamt wurden 1400 Stressgene untersucht. Das Ergebnis des Microarrays ist im Anhang der Veröffentlichung Raacke et al. (2006) abgebildet.

In Tabelle 3.1 sind die Gene dargestellt, deren Expression durch Hefebehandlung verändert wurde. Die Expression von 6 Genen wurde induziert. Am stärksten induziert ist die SA-abhängige Expression von *Pr1*, *Pr2* und *Pr5*. Induziert wurden ebenfalls Gene der Detoxifizierung. Dabei handelte es sich um zwei Gluthation-S-Transferasen (*Gst2* und *Gst11*) und eine *UDP* Glucosyltransferase. 11 Gene aus dem JA- und ET-Weg wurden mit aufgeführt, da eine Induktion erwartet worden war. Die Expression dieser Gene wurde nicht induziert. Ein Gen im JA/ET-Weg wurde im Microarray sogar signifikant reprimiert. Dabei handelt es sich um *Asa1*, welches für eine JA-induzierte Antranilatsynthase kodiert.

3. Ergebnisse

Genlocus	biologischer Prozess	Gen-Beschreibung	Verhältnis (log)	Standardabweichung
At2g14610	SAR	<i>Pr1</i>	3.30	1.00
At3g57160	SAR	<i>Pr2</i> , 1,3-β-glucanase	2.60	0.78
At1g75040	SAR	<i>Pr5</i>	1.96	0.52
At4g02520	Detox	<i>Gst2</i> , glutathione-S- transferase	1.90	0.62
At2g36800	Detox	<i>UGT73C5</i> , UDP-glucosyl- transferase	1.37	0.64
At1g02920	Detox	<i>Gst11</i> , glutathione-S- transferase	1.31*	0.29
At3g15210	JA/ET	<i>Erf4</i> , ethylene-responsive element-binding factor 4	0.42	0.46
At1g05010	JA/ET	<i>Acc</i> , oxidase	0.35	0.26
At5g44420	JA/ET	<i>Pdf1.2</i> , defensin	0.22	1.22
At5g20700	JA/ET	senescence-associated protein	0.20*	0.62
At3g45140	JA/ET	<i>Lox2</i> , lipoxygenase	- 0.22	0.26
At4g11280	JA/ET	<i>Acs6</i> , aminocyclopropane carboxylate synthase	- 0.42*	0.46
At5g42650	JA/ET	<i>Aos</i> , allene oxide synthase	- 0.46	0.46
At1g66340	JA/ET	<i>Etr1</i> , ethylene receptor, putative	- 0.54*	0.45
At3g23150	JA/ET	<i>Etr2</i> , ethylene receptor, putative	- 0.82*	0.95
At5g24780	JA/ET	<i>Vsp1</i> , vegetative storage protein	- 2.15*	1.49
At5g05730	JA/ET	<i>Asa1</i> , antranilate synthase	- 1.78	0.18

Tabelle 3.1: Ergebnis der Microarray-Analyse. Regulation der Gene, die in der systemisch erworbenen Resistenz (SAR), in der Detoxifizierung (Detox) und im Jasmonsäure- und Ethylenweg (JA/ET) involviert sind. Dargestellt ist der Logarithmus des Verhältnisses (log) der Expression zwischen Hefe- und Wasserbehandlung 48 Stunden nach Behandlung des WT Col-0. Grün

3. Ergebnisse

dargestellt sind durch Hefebehandlung induzierte Gene, schwarz dargestellt sind nicht-induzierte Stressgene (JA/ET) und rot dargestellt ist ein reprimiertes Gen. Mit einem Stern sind die Gene gekennzeichnet, die nur ein schwaches Signal zeigten. Die Microarray-Analyse wurde in 3 unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Proben für Wasser- und Hefevorbehandlung waren jeweils aus 2 unabhängigen Versuchen gepoolt.

Zur Klärung der Frage, ob zu früheren Zeitpunkten auch die Induktion von Genen im JA/ET-Weg nachzuweisen war, bzw. ob Gene im JA/ET-Weg transient induziert sind, wurde die Beprobung zu mehreren Zeitpunkten (3, 6 und 24 Stunden) und zur Belegung der Daten der Microarray-Analyse nach 48 Stunden durchgeführt.

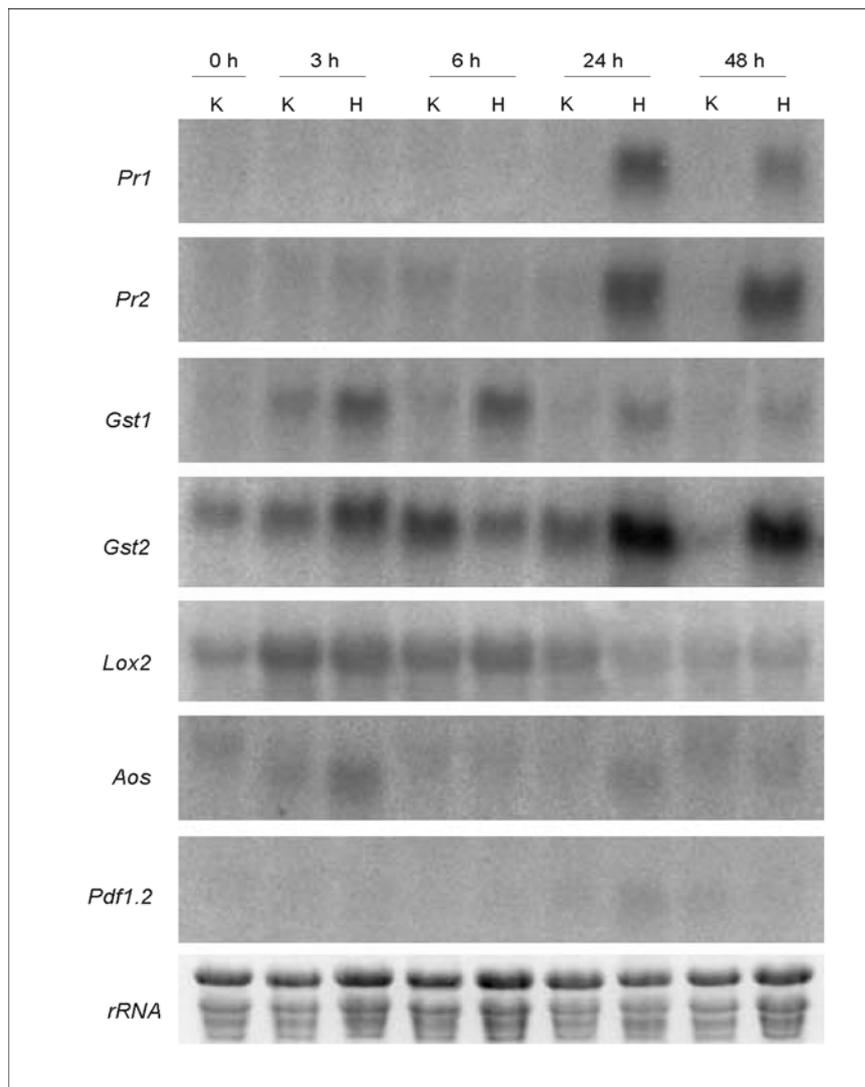


Abbildung 3.8: Genexpression in Col-0 nach Wasser- (K) bzw. Hefebehandlung (H). Gezeigt werden repräsentative Northern-Blot Analysen aus 4 unabhängigen Versuchen. Pro Spur wurden 8 µg RNA aufgetragen und mittels Ethidiumbromid-Färbung detektiert. Um die Beladung des Gels abschätzen zu können, wurde die rRNA (unterste Spur) mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Farben invertiert.

Die Expression der SA-responsiven Gene *Pr1* und *Pr2* war 24 und 48 Stunden nach der Hefebehandlung stark induziert (Abb. 3.8). Dieses Ergebnis bestätigte das Ergebnis der Microarray-Analyse, in der nach 48 Stunden ebenfalls eine Induktion dieser Gene nachgewiesen wurde. Als Beispiel für Gene in der Detoxifizierung (Schutz vor oxidativem Stress) wurden *Gst1* und *Gst2* getestet. *Gst1* wurde nach Hefebehandlung zu allen getesteten Zeitpunkten induziert, besonders nach 3 und 6 Stunden. *Gst2* zeigte nach 24 und 48 Stunden eine erhöhte Expression. Keinen Unterschied zwischen Hefe- und Wasserbehandlung zeigte die Expression der getesteten jasmonat-responsiven Gene *Lox2*, *Aos* und *Pdf1.2*.

Die Ergebnisse der Northernblot-Analyse bestätigen das Ergebnis der Microarray-Analyse. Die Erhöhung der Gene *Pr1* und *Pr2* deutet auf eine Aktivierung des SA-Weges durch Hefebehandlung hin.

3.6 Beteiligte Signalwege an der Schutzwirkung durch Hefebehandlung

Der Vorteil der Modellpflanze *A. thaliana* ist die Verfügbarkeit von Mutanten in den unterschiedlichen Signaltransduktionswegen. Für die JA-Biosynthese wurden die Mutanten *dde2* (bildet weder OPDA noch JA) und *opr3* (bildet OPDA aber keine JA) verwendet, für die JA-Signaltransduktion *jin1* (defekt im Gen *AtMYC2*, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert). Die *nahG*-Mutante (wandelt die SA in das physiologisch unwirksame Catechol um; daher ist *nahG* nicht in der Lage, SA zu akkumulieren) und *npr1* (akkumuliert normale Mengen SA; zeigt jedoch eine gestörte *Pr1* Expressionsregulation) wurden für den SA-Weg getestet und die Mutanten *pad3* und *cyp79B2/B3* für die Camalexin-Biosynthese. Alle Versuche wurden zum Vergleich mit den entsprechenden Wildtypen durchgeführt.

Alle verwendeten Mutanten und korrespondierende Wildtypen wurden auf eine mögliche Schutzwirkung durch Hefevorbereitung getestet. Dazu wurden der Anstieg des Bakterienwachstums von *P. syringae* und die Ausbreitung der Symptome von *B. cinerea* in *A. thaliana* Blättern untersucht.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von 0.2 g/ml, wurde der Camalexin-Gehalt bei *Colgl* und *jin1* bestimmt. Am 5. Tag nach Hefebehandlung zeigte sich eine Erhöhung des Camalexin-Gehaltes bei *Colgl* auf ca. 50 nmol/g FG. Bei *jin1* wurde dieser Wert am 6. Tag erzielt. Die Höhe der Camalexin-Gehalte entsprach dem von Col-0 (Abb. 3.2).

3.6.1 Schutzwirkung gegen *P. syringae*

Nach Infiltration mit *P. syringae* wurde getestet, ob in den verschiedenen Mutanten eine Schutzwirkung durch Hefevorbehandlung, wie bereits bei Col-0 nachgewiesen (Abb. 3.4), erreicht wurde.

3.6.1.1 Mutanten im Jasmonatweg

Zur Überprüfung, ob der JA-Weg für die Schutzwirkung notwendig ist, wurden die Mutanten *dde2* (WT Col-0), *opr3* (WT WS) und *jin1* (WT ColgI) verwendet.

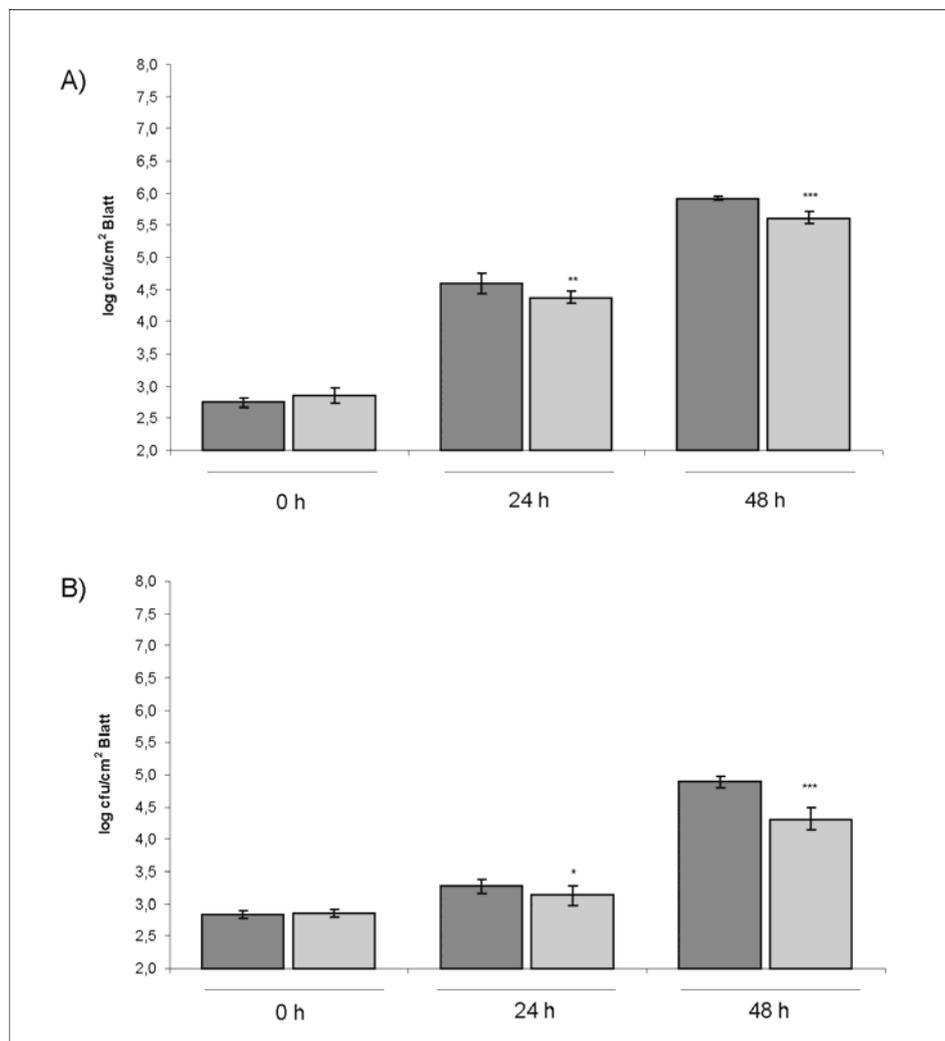


Abbildung 3.9: Bakterienwachstum von *P. syringae* (Bakteriendichte: 1×10^6 cfu/ml in 10 mM MgCl₂) in Col-0 (A) und *dde2* (B). Wasser- (dunkelgrau), Hefevorbehandlung (hellgrau). Die Werte wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, n = 8). Die statistische Berechnung erfolgte mittels T-Test mit ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05.

3. Ergebnisse

Eine Schutzwirkung durch Hefe war bei *dde2* nach 24 und nach 48 Stunden durch die signifikant geringere Anzahl Bakterien in den mit Hefe vorbehandelten Pflanzen zu detektieren (Abb. 3.9 B). Ermittelt wurde ein ähnlicher Schutz wie im WT Col-0 (Abb. 3.9 A). Die Anzahl Bakterien lag bei *dde2* niedriger als im Wildtyp Col-0.

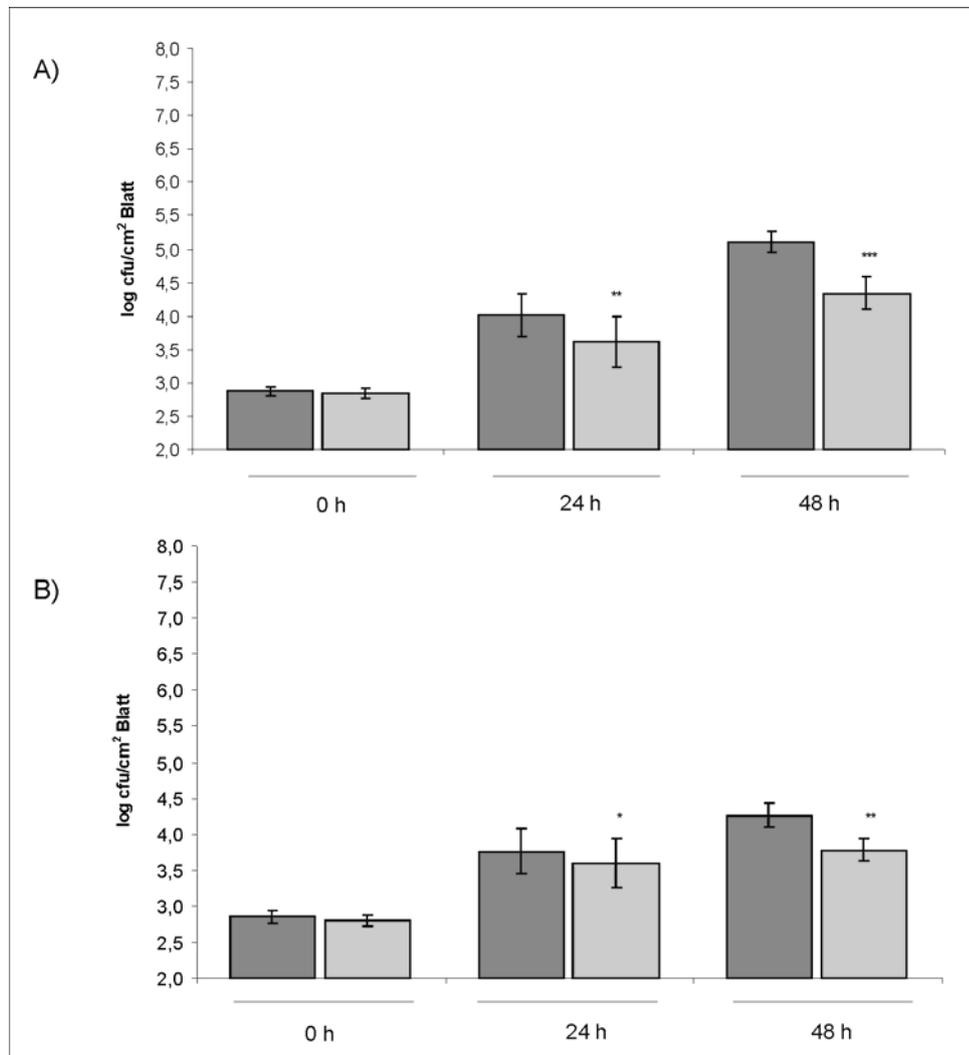


Abbildung 3.10: Bakterienwachstum von *P. syringae* (Bakteriendichte: 1×10^6 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$) in WS (A) und *opr3* (B). Wasser- (dunkelgrau), Hefevorbehandlung (hellgrau). Die Werte wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, n = 11). Die statistische Berechnung erfolgte mittels T-Test mit *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Nach einer vergleichbaren Infiltrationsmenge von *P. syringae* zum Zeitpunkt 0 Stunden war eine Schutzwirkung nach Hefevorbehandlung bei der Mutante *opr3* (Abb. 3.10 B) nach 24 und 48 Stunden signifikant im Vergleich zur Wasserbehandlung. Die Anzahl der Bakterien erhöhte sich von 24 auf 48 Stunden nicht mehr so stark wie von 0 auf 24 Stunden. Das Bakterienwachstum war bei *opr3* geringer als im korrespondierenden WT (Abb. 3.10 A).

3. Ergebnisse

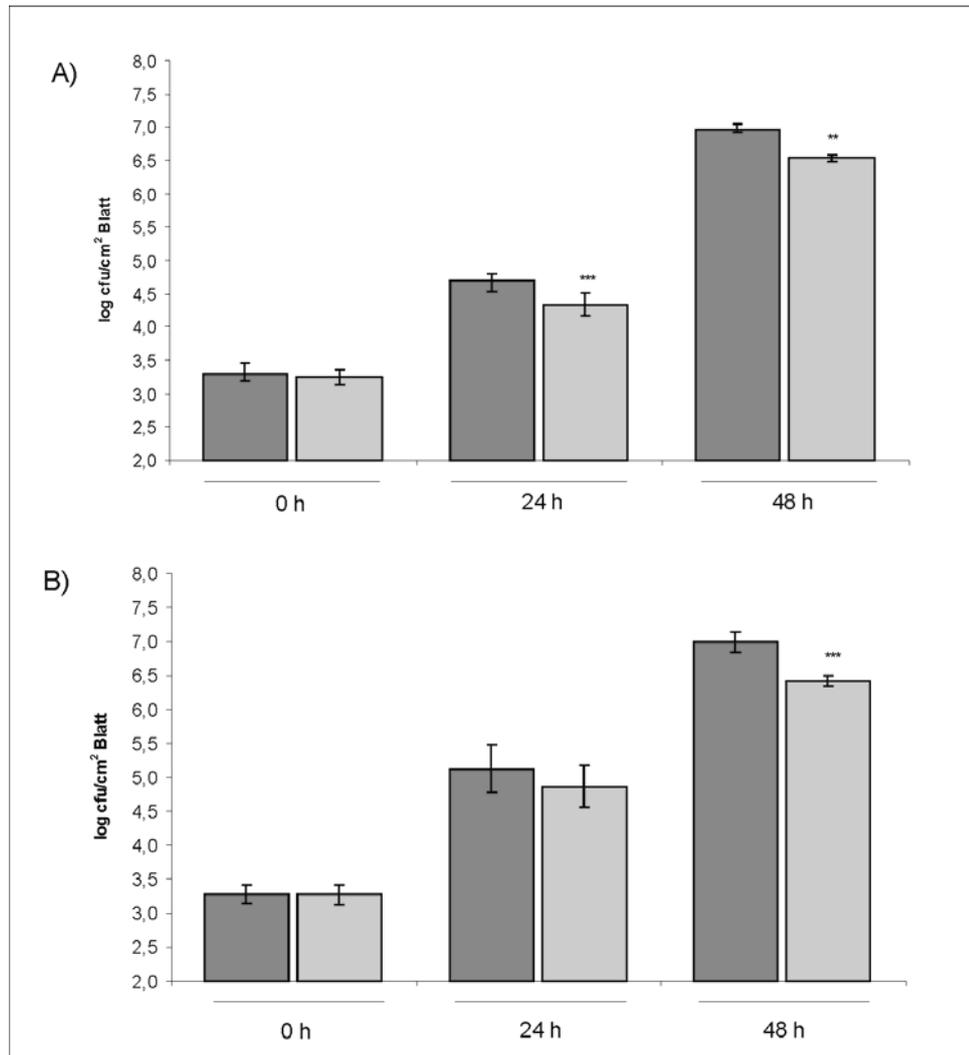


Abbildung 3.11: Bakterienwachstum von *P. syringae* (Bakteriendichte: 1×10^6 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$) bei Colgl (A) und *jin1* (B). Wasser- (dunkelgrau), Hefevorbehandlung (hellgrau). Die Werte wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, n = 6). Die statistische Berechnung erfolgte mittels T-Test mit *** p < 0.001 und **p < 0.01.

In der Mutante *jin1* war nach 48 Stunden ein signifikanter Unterschied zwischen Hefe- und Wasservorbehandlung vorhanden (Abb. 3.11 B). Die Höhe der Bakterienzahlen entsprach denen des Wildtyps (Abb. 3.11.A).

Bei allen getesteten JA-Mutanten konnte ein Schutzeffekt durch die Hefevorbehandlung gezeigt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass JA für die Schutzwirkung gegen *P. syringae* nicht notwendig ist.

3.6.1.2 Mutanten im Salicylsäureweg

Für den SA-Weg wurden die Mutanten *nahG* und *npr1* getestet. Für beide Mutanten ist beschrieben worden, dass sie sensitiver gegenüber *P. syringae* (Delaney et al., 1994; Lawton et al., 1995) sind.

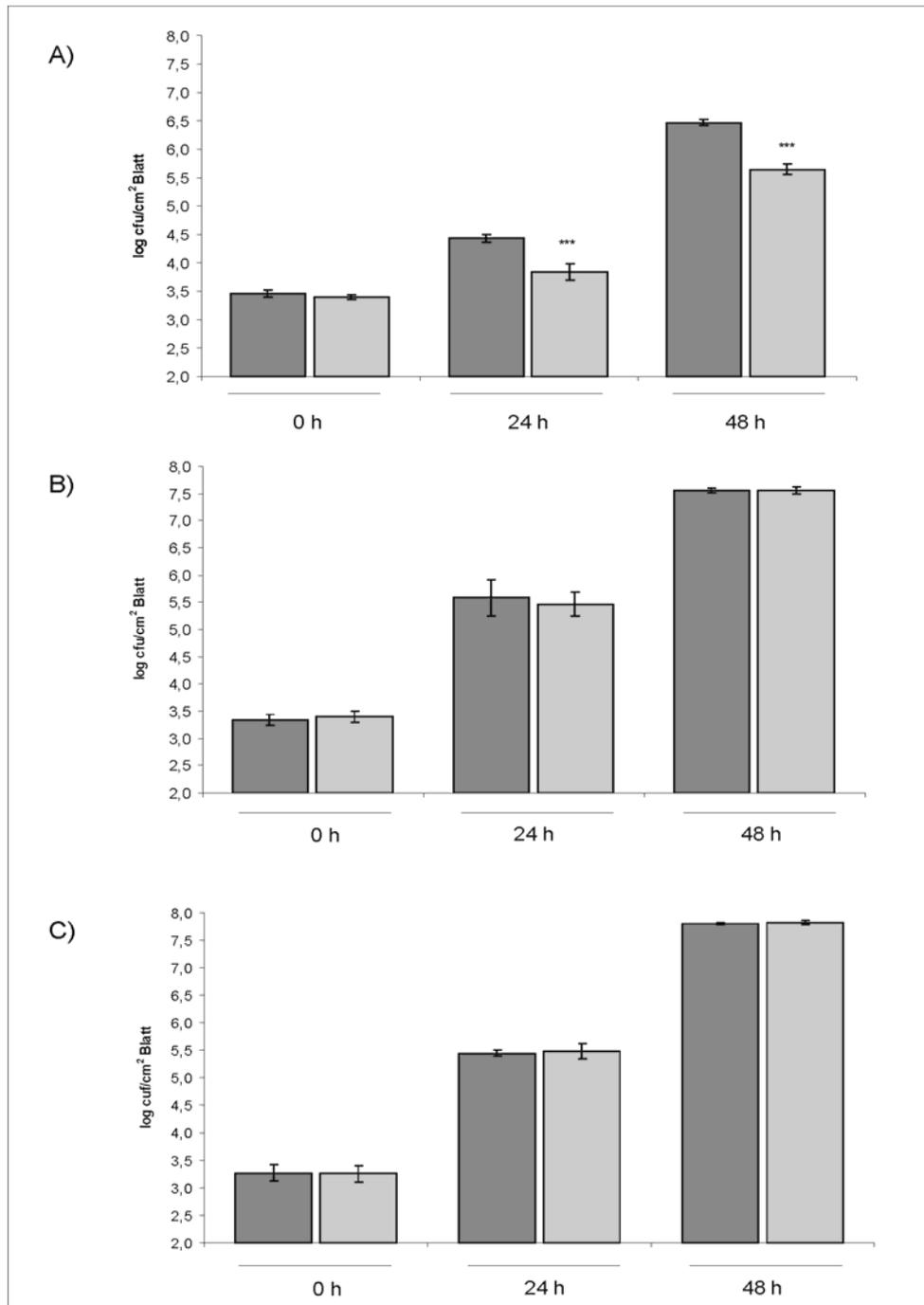


Abbildung 3.12: Bakterienwachstum von *P. syringae* (Bakteriendichte: 1×10^6 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$) in Col-0 (A) im Vergleich zu den SA-Mutanten *nahG* (B) und *npr1* (C). Wasser- (dunkelgrau), Hefevorbehandlung (hellgrau). Die Werte wurden in 3 unabhängigen

3. Ergebnisse

Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, n = 6). Die statistische Berechnung erfolgte mittels T-Test mit *** p< 0.001.

Übereinstimmend zeigten beide SA-Mutanten stärkere Symptome und ein höheres Bakterienwachstum (Abb. 3.1.2 B und C) und waren sensitiver als der korrespondierende WT Col-0 (Abb. 3.12 A) gegenüber *P. syringae*. Das Bakterienwachstum von *P. syringae* in *nahG* und *npr1* zeigte keine Veränderung zwischen Wasser- und Hefevorbehandlung.

Die Schutzwirkung war in Mutanten des SA-Weges nicht vorhanden, d.h. SA ist für den Schutzeffekt durch Hefevorbehandlung notwendig.

3.6.1.3 Mutanten in der Camalexin-Biosynthese

Die Mutanten *pad3* und *cyp79B2/B3* haben einen Defekt in der Camalexin-Biosynthese. Eine Überprüfung des Camalexin-Gehaltes mittels HPLC ergab, dass *pad3* nach Hefebehandlung Camalexin akkumulierte. Die Höhe entsprach der Wasserbehandlung des Wildtyps, während in *cyp79B2/B3* kein Camalexin sowohl nach Wasser- als auch nach Hefebehandlung nachweisbar war.

3. Ergebnisse

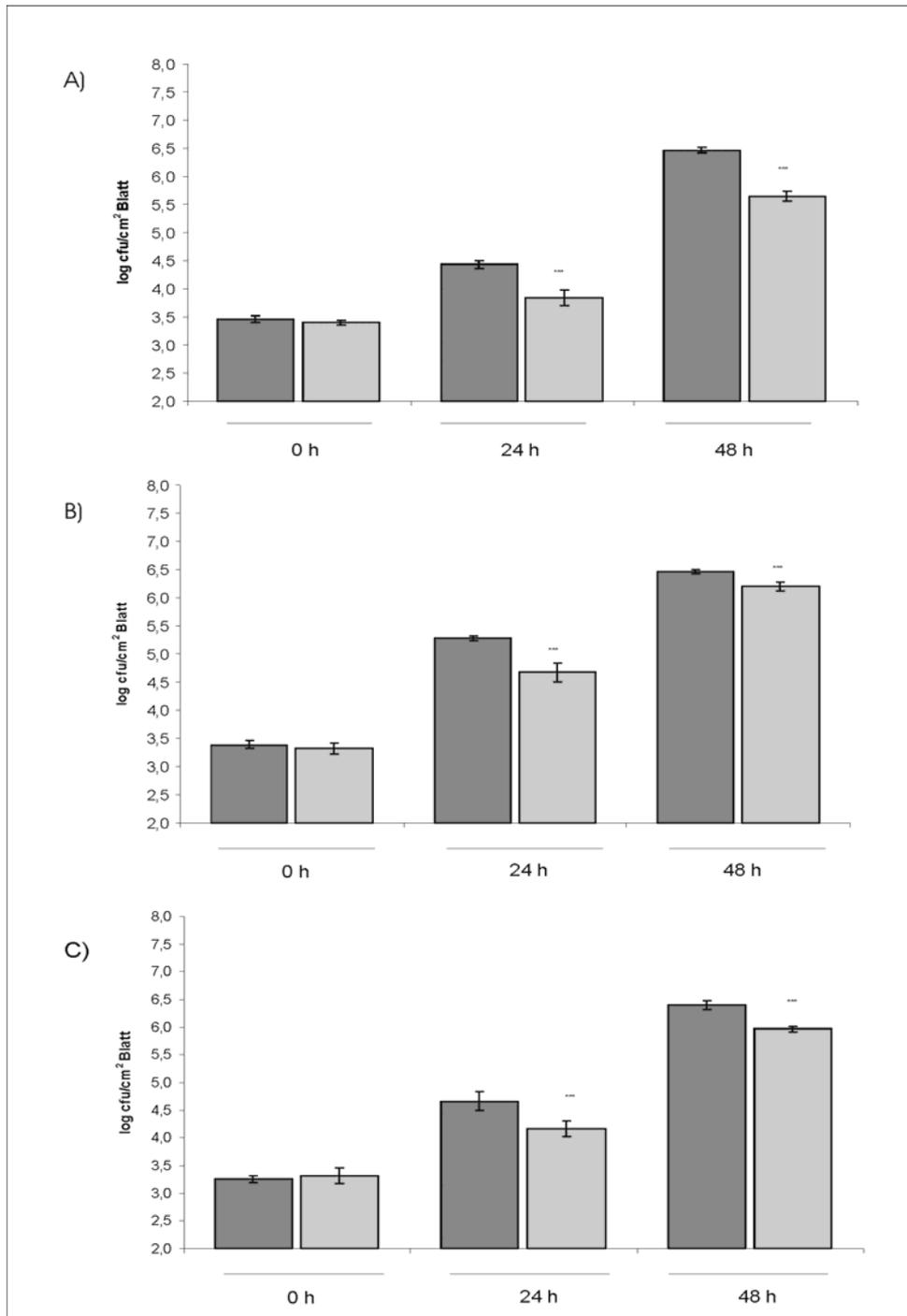


Abbildung 3.13: Bakterienwachstum von *P. syringae* (Bakteriendichte: 1×10^6 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$) in Col-0 (A) im Vergleich zu den Camalexin-Mutanten *pad3* (B) und *cyp79B2/B3* (C). Wasser- (dunkelgrau), Hefevorbehandlung (hellgrau). Die Werte wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, n = 5). Die statistische Berechnung erfolgte mittels T-Test mit *** p < 0.001.

In der Mutante *pad3* war das Bakterienwachstum nach 24 Stunden sowohl in den mit Wasser- als auch in den mit Hefe vorbehandelten Pflanzen höher als beim korrespondierenden WT, d.h. *pad3* war sensitiver gegenüber *P. syringae* als Col-0.

Nach 48 Stunden war die Anzahl der Bakterien vergleichbar mit Col-0 (Abb. 3.13 B). Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden war ein signifikanter Unterschied zwischen der Wasser- und Hefebehandlung bei der Camalexin-Mutante *pad3* vorhanden. Die Mutante *cyp79B2/B3* zeigte nach 24 und 48 Stunden (Abb. 3.13 C) ein Bakterienwachstum in nahezu gleicher Höhe wie Col-0 mit gleich hoher Signifikanz des Unterschiedes zwischen Hefe- und Wasservorbehandlung.

In den getesteten Camalexin-Mutanten war jeweils ein Schutz in mit Hefe vorbehandelten Pflanzen aufgetreten, d.h. auch Camalexin ist für den Schutzeffekt von Hefe nicht erforderlich.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Schutzfaktoren in einer Tabelle zusammengefasst.

Wildtyp/Mutante	Schutzfaktoren	
	24 h ± SD	48 h ± SD
Col-0	2,7 ± 0,50	4,4 ± 1,59
<i>nahG</i>	kein Schutz	kein Schutz
<i>npr1</i>	kein Schutz	kein Schutz
<i>pad3</i>	3,7 ± 1,07	1,9 ± 0,51
<i>cyp79B2/B3</i>	3,2 ± 1,07	2,7 ± 0,74
<i>dde2</i>	1,4 ± 0,99	3,2 ± 0,13
<i>Colgl</i>	2,3 ± 0,30	2,8 ± 0,90
<i>jin1</i>	3,0 ± 1,13	4,6 ± 1,70
WS	1,3 ± 0,38	4,9 ± 0,27
<i>opr3</i>	2,0 ± 0,95	2,9 ± 0,08

Tabelle 3.2: Schutzfaktoren durch Hefevorbehandlung bei *A. thaliana* Wildtypen und Mutanten 24 und 48 Stunden nach *P. syringae* Infiltration (5 Tage nach Wasser- bzw. Hefevorbehandlung).

Bei den SA-Mutanten *nahG* und *npr1* konnte keine Schutzwirkung verzeichnet werden (Tab. 3.2). Die Camalexin-Biosynthese-Mutanten *pad3* und *cyp79B2/B3* zeigten eine vergleichbar hohe Schutzwirkung nach 24 Stunden, während nach 48 Stunden eine verringerte Schutzwirkung im Vergleich zum korrespondierenden WT Col-0 deutlich wurde. In der JA-Signaltransduktions-Mutante *jin1* war der erzielte Schutzfaktor durch Hefevorbehandlung sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden höher als im WT *Colgl*. Ein deutlicher Schutzfaktor war in der JA-Biosynthese-Mutante *dde2* erst nach 48 Stunden zu verzeichnen, der Wert war niedriger als beim korrespondierenden WT Col-0. Gleiches gilt für *opr3*.

3.6.2 Schutzwirkung gegen *B. cinerea*

Um zu überprüfen, ob die gleichen Signalwege bzw. Mechanismen durch Hefevorbehandlung, die für den Schutz gegen *P. syringae* wichtig sind, auch an dem Schutz gegen *B. cinerea*-Infektionen beteiligt sind, wurden die gleichen Mutanten der entsprechenden Biosynthese- und Signaltransduktionswege auf einen möglichen Schutz mit Hilfe der Quantifizierung der Läsionengrößen untersucht.

Für *B. cinerea* ist beschrieben worden, dass Camalexin die Ausbreitung hemmt (Denby et al., 2004) bzw. das Camalexin nur für die Abwehr von einigen *Botrytis*-Stämmen notwendig ist (Kliebenstein et al., 2005). Ebenso sollte der JA-Weg an der Abwehr gegen nekrotrophe Pilze beteiligt sein (Thomma et al., 1999a; Ferrari et al., 2003).

3.6.2.1 Mutanten im JA-, SA- und Camalexin-Weg

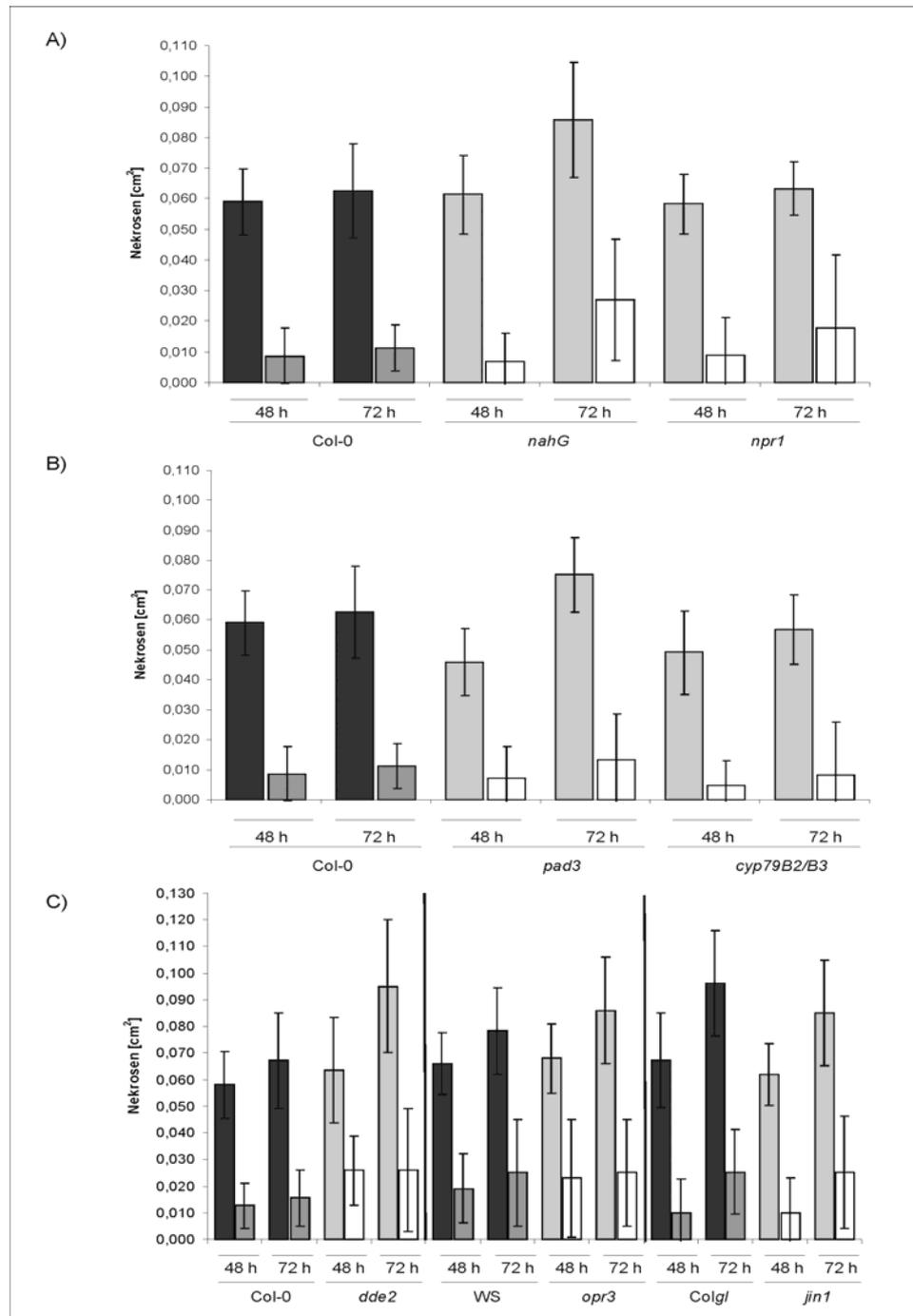


Abbildung 3.14: Nekrosengrößen 48 und 72 Stunden nach Infektion mit *B. cinerea* (9×10^5 Sporen/ml in PD Broth) 5 Tage nach Wasser- bzw. Hefebehandlung. WT nach Wasserbehandlung (dunkelgrau), WT nach Hefebehandlung (mittelgrau), Mutante nach Wasserbehandlung (hellgrau), Mutante nach Hefebehandlung (weiß). A) Mutanten aus dem SA-Weg mit entsprechendem WT. B) Mutanten aus dem Camalexin-Weg mit entsprechendem WT. C) Mutanten aus dem JA-Weg mit entsprechenden Wildtypen. Die Werte wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, $n \geq 46$ nach 48 Stunden; $n \geq 53$ nach 72 Stunden). Die statistische Berechnung erfolgte mittels T-Test mit *** $p < 0.001$.

Beide SA-Mutanten *nahG* und *npr1* zeigten einen deutlichen Schutzeffekt nach 48 und 72 Stunden bei den Nekrosengrößen zwischen Wasser- und Hefevorbehandlung (Abb. 3.14 A). Nach 72 Stunden zeigte *nahG* größere Nekrosen als der WT.

Ein Schutzeffekt war bei der Auswertung der Nekrosen auch bei den Camalexin-Mutanten *pad3* und *cyp79B2/B3* sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden festzustellen (Abb. 3.14 B). Die Nekrosen waren im Vergleich zu Col-0 kleiner, bis auf *pad3* 72 Stunden. Die Mutanten im JA-Weg zeigten alle einen deutlichen Schutzeffekt sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden (Abb. 3.14 C). Bis auf *dde2*, nach 72 Stunden lagen die Nekrosengrößen im WT-Bereich.

Die Schutzfaktoren, die durch Nekrosengrößen nachgewiesen wurden, sind für die bessere Übersichtlichkeit für alle verwendeten Mutanten und entsprechenden Wildtypen in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Nekrosen Wildtyp/Mutante	Schutzfaktoren	
	48 h ± SD	72 h ± SD
Col-0	6,5 ± 1,49	5,6 ± 1,06
<i>nahG</i>	8,7 ± 4,64	3,2 ± 1,70
<i>npr1</i>	6,4 ± 4,65	3,5 ± 1,48
<i>pad3</i>	6,6 ± 1,35	5,8 ± 1,42
<i>cyp79B2/B3</i>	9,8 ± 2,12	7,1 ± 0,72
<i>dde2</i>	2,4 ± 1,20	3,7 ± 1,73
WS	3,5 ± 0,14	3,1 ± 1,54
<i>opr3</i>	3,0 ± 1,28	3,4 ± 1,97
Colgl	6,7 ± 1,76	3,8 ± 0,64
<i>jin1</i>	6,2 ± 1,98	3,4 ± 1,73

Tabelle 3.3: Schutzfaktoren von Wildtypen und Mutanten nach Nekrosengrößen zwischen Wasser- und Hefevorbehandlung ± SD.

Die Schutzfaktoren, bezogen auf die Nekrosengrößen 48 bzw. 72 Stunden nach *B. cinerea* Infektion (5 Tage nach Wasser- bzw. Hefebehandlung), zeigten bei den SA-Biosynthese-Mutanten *nahG* und *npr1* nach 48 Stunden ein vergleichbares bzw. etwas erhöhtes Ergebnis im Vergleich zum WT Col-0, während nach 72 Stunden Col-0 einen höheren Schutzfaktor aufwies. Die Camalexin-Mutante *pad3* wies den gleichen Schutzfaktor auf wie Col-0, während *cyp79B2/B3* sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden einen höheren Schutzfaktor aufzeigt. Bei den JA-Mutanten war der Schutzfaktor bei *jin1* vergleichbar mit Colgl, ebenso bei *opr3* im Vergleich zu WS. Die JA-Mutante *dde2* zeigte nach 48 und 72 Stunden einen geringeren Schutz als Col-0.

3. Ergebnisse

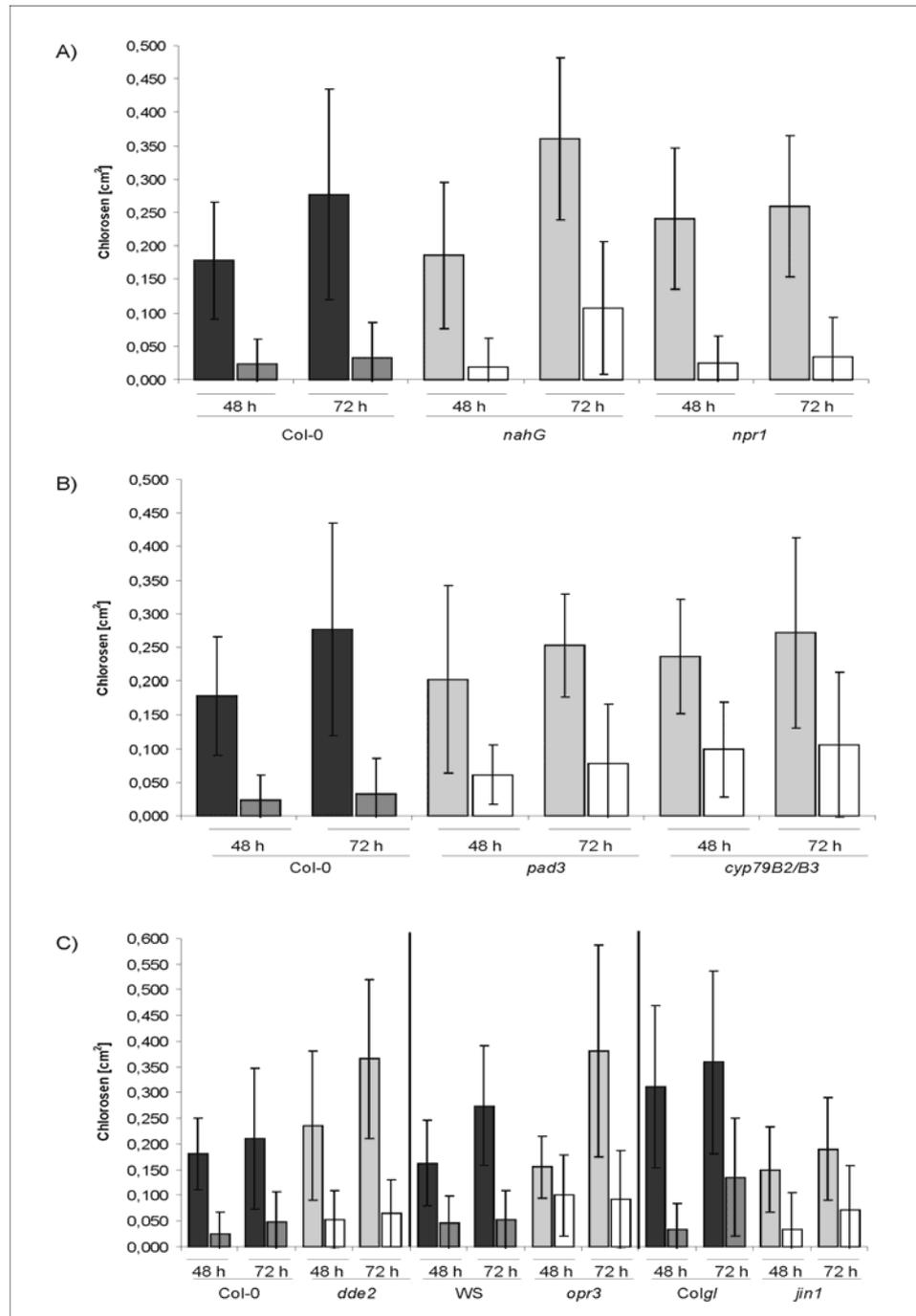


Abbildung 3.15: Chlorosengrößen nach Infektion mit *B. cinerea* (9×10^5 Sporen/ml in PD Broth) 5 Tage nach Wasser- bzw. Hefebehandlung. WT nach Wasserbehandlung (dunkelgrau), WT nach Hefebehandlung (mittelgrau), Mutante nach Wasserbehandlung (hellgrau), Mutante nach Hefebehandlung (weiß). A) Mutanten aus dem SA-Weg mit WT, B) Mutanten aus dem Camalexin-Weg mit WT und C) Mutanten aus dem JA-Weg mit entsprechenden Wildtypen. Die Werte wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, $n \geq 47$ nach 48 und 72 Stunden). Die statistische Berechnung erfolgte mittels T-Test mit *** $p < 0.001$.

Nach 48 Stunden zeigte *npr1* eine höhere Empfindlichkeit in der Wasserbehandlung und damit größere Chlorosen als Col-0 (Abb. 3.15 A). 72 Stunden nach Infektion war

kaum eine Zunahme der Chlorosen zu verzeichnen, die Chlorosengröße war vergleichbar mit dem WT. In *nahG* und Col-0 war nach 48 Stunden die Chlorosengröße vergleichbar, während nach 72 Stunden eine deutliche Zunahme zu detektieren war.

Nach der Wasserbehandlung lag die Chlorosengröße der Camalexin-Mutanten (Abb. 3.15 B) im Bereich von Col-0. Nach Hefebehandlung waren die Chlorosen bei den Camalexin-Mutanten deutlich höher als beim WT.

Die JA-Mutante *dde2* zeigte im Vergleich zu Col-0 größere Chlorosen nach der Wasser-, vergleichbar große Chlorosen nach Hefebehandlung (Abb. 3.15 C). Nach der Wasservorbereitung zeigte *opr3* 72 Stunden nach Infektion größere Chlorosen als WS und nach Hefevorbereitung nach 48 und 72 Stunden. Die Chlorosengröße bei *jln1* zeigt nach 48 und 72 Stunden eine Verringerung im Vergleich zu Col-0. Nach Hefevorbereitung war der Zuwachs der Chlorosen bei *jln1* geringer als beim WT und nach 72 Stunden deutlich kleiner als bei Col-0. Ebenso wie bei den Nekrosen war bei der Auswertung der Chlorosen ein Schutzeffekt bei allen Mutanten zwischen Wasser- und Hefevorbereitung vorhanden.

Die Schutzfaktoren, die durch Chlorosengrößen nachgewiesen wurden, sind für die bessere Übersichtlichkeit für alle verwendeten Mutanten und entsprechenden Wildtypen in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Chlorosen Wildtyp/Mutante	Schutzfaktoren	
	48 h ± SD	72 h ± SD
Col-0	7,4 ± 1,49	8,4 ± 1,22
<i>nahG</i>	10,3 ± 1,31	3,4 ± 0,86
<i>npr1</i>	9,3 ± 2,36	7,7 ± 1,08
<i>pad3</i>	3,3 ± 0,20	3,3 ± 0,97
<i>cyp79B2/B3</i>	2,4 ± 0,75	2,6 ± 0,96
<i>dde2</i>	4,5 ± 1,20	5,6 ± 2,21
WS	3,5 ± 0,14	5,3 ± 1,02
<i>opr3</i>	1,6 ± 1,28	4,1 ± 1,83
Col-0	9,5 ± 2,30	2,7 ± 0,86
<i>jln1</i>	7,5 ± 2,27	4,1 ± 1,68

Tabelle 3.4: Schutzfaktoren zwischen Wasser- und Hefebehandlung in Wildtypen und Mutanten nach Infektion mit *B. cinerea* 5 Tage nach Wasser- bzw. nach Hefevorbereitung ± SD.

Die SA-Mutanten wiesen 48 Stunden nach *B. cinerea* Infektion höhere Schutzfaktoren auf als der WT Col-0; nach 72 Stunden waren die Schutzfaktoren bei diesen Mutanten kleiner als bei Col-0.

Entgegen den Veröffentlichungen, dass sowohl Camalexin, als auch JA an der Abwehr gegen *B. cinerea* beteiligt sind, wurde gezeigt, dass weder Camalexin noch SA noch JA an der Hefe-vermittelten Schutzwirkung gegen den nekrotrophen Pilz *B. cinerea*

mitwirken. Daraus lässt sich schließen, dass andere Faktoren oder Wege für den Schutz durch Hefe vorhanden sein müssen.

3.6.2.2 Untersuchung der Mechanismen gegen *B. cinerea*

Um der Frage nachzugehen, ob ein Schutz gegen *B. cinerea* in der Pflanze bereits vorhanden war, bevor die Camalexin-Werte nach 5 Tagen den höchsten Wert in den Blättern erreicht hatten, wurden Infektionen 6 Stunden bzw. 1 Tag nach Hefebehandlung durchgeführt. Der 6 Stunden-Wert konnte aufgrund des starken Verlaufens der Infektionstropfen auf den Blättern nicht ausgewertet werden. Nach 1 Tag war die gesprühte Hefe bereits so weit angetrocknet, dass die Infektionstropfen als Ganzes auf der Infektionsstelle anhafteten.

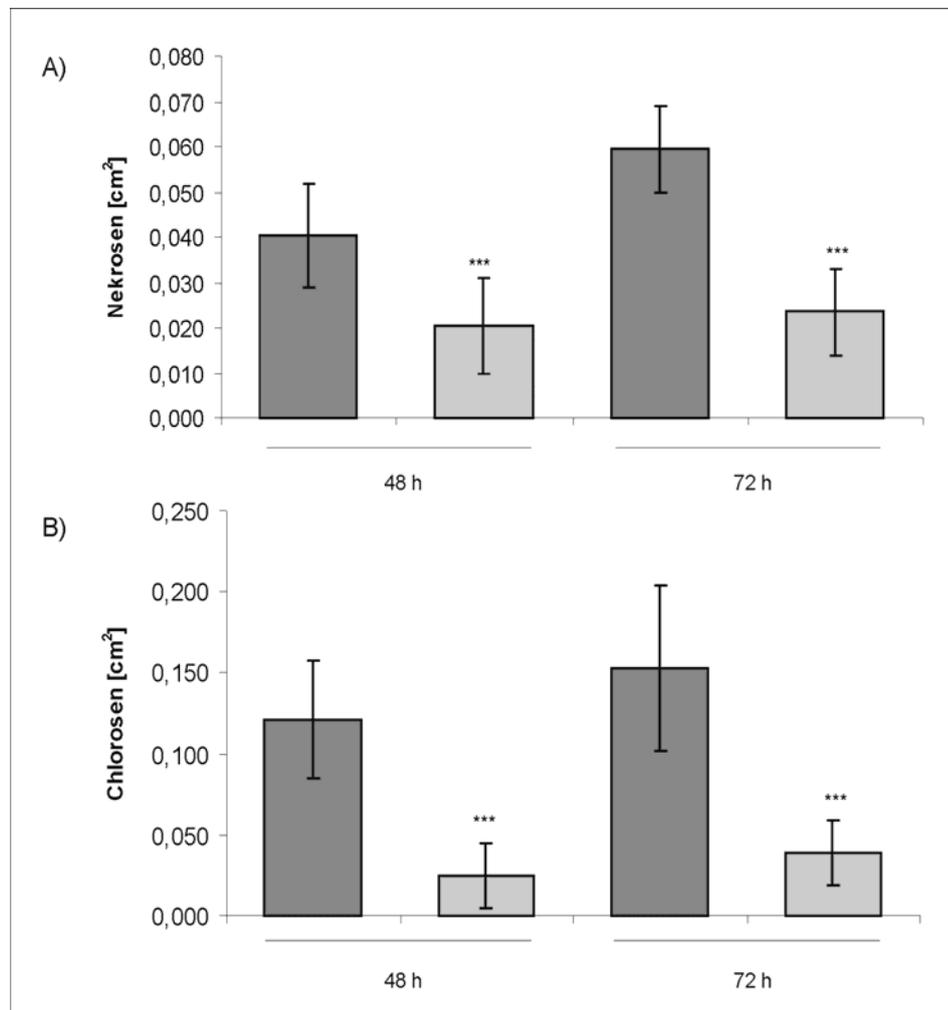


Abbildung 3.16: *B. cinerea* Infektion (9×10^5 Sporen/ml in PD Broth) bei Col-0 1 Tag nach Wasser- (dunkelgrau) bzw. Hefevorbehandlung (hellgrau). Die Auswertung der Nekrosen- (A) und Chlorosengrößen (B) erfolgte 48 und 72 Stunden nach der Infektion. Die Ergebnisse

3. Ergebnisse

wurden in 4 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, $n \geq 46$ bei Nekrosen und Chlorosen). Der signifikante Unterschied wurde mittels T-Test *** $p < 0.001$ ermittelt.

Ein signifikanter Schutz war sowohl bei den Nekrosen als auch bei den Chlorosen 48 und 72 Stunden nach Infektion vorhanden. Nekrosen (Abb. 3.16 A) bei Col-0 zeigten einen Tag nach der Hefebehandlung einen um den Faktor 2 bis 3fach niedrigeren Wert als nach der Wasserbehandlung; die Chlorosengrößen (Abb. 3.16 B) waren um den Faktor 4fach niedriger. Dagegen zeigten die herkömmlichen *B. cinerea*-Versuche (Infektion 5 Tage nach Wasser- oder Hefevorbehandlung) Faktoren, die jeweils etwa doppelt so hoch waren.

Ein Schutz vor dem nekrotrophen Pilz war bereits 4 Tage vor Erreichen des Maximums der Camalexin-Bildung im Blatt vorhanden (Abb. 3.16). Dieses Resultat könnte auf einen direkten Effekt der Hefe auf das Wachstum von *B. cinerea* zurückzuführen sein. Für die Überprüfung des systemischen Effektes auf die Ausbreitung von *B. cinerea* wurden die jüngeren Blätter einer Pflanze bei dem Besprühen mit Wasser oder Hefe abgedeckt und nach 5 Tagen die jüngeren Blätter infiziert.

Der Versuch wurde 4 Mal durchgeführt, wobei 2 Mal ein Schutz zu verzeichnen war, bei einem Versuch eine Förderung, und beim 4. Versuch gleich große Läsionen sichtbar wurden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu der Wirkung gegen *P. syringae* konnte keine klare systemische Schutzwirkung gegen *B. cinerea* nachgewiesen werden.

Ein möglicher direkter Effekt durch die Hefe auf das Wachstum des Pilzes sollte durch das Abspülen der Hefe 4 Tage nach dem Sprühen und der einen Tag späteren Infektion mit *B. cinerea* unterbunden werden. Die Auswertung ergab einen nicht signifikanten Schutz bei den Nekrosen, aber eine signifikante Verringerung der Chlorosen nach 48 und 72 Stunden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von Hefe bei der Ausprägung der Chlorosen eine entscheidende Rolle spielt.

Die Hefe selber könnte sich hemmend auf das Wachstum von *B. cinerea* auswirken. Daher sollte getestet werden, ob der Pilz auf Hefe ein anderes Wachstumsverhalten zeigt als auf PDA (für die Infektionen wurde *B. cinerea* gelöst in PD Broth auf die Blätter gegeben).

Um zu überprüfen, ob die Anwesenheit von Hefe auf den Blättern von *A. thaliana* das Pilzwachstum hemmt, wurde das Wachstum von *B. cinerea* auf unterschiedlichen Medien indirekt getestet. Je 2 Tropfen mit jeweils 5 μ l *B. cinerea* (9×10^5 Sporen/ml in PD Broth) wurden auf reinem PDA, PDA mit Hefe überschichtet bzw. auf reine Hefe

3. Ergebnisse

pipettiert und entweder im Dunkeln (infizierte *A. thaliana* Pflanzen wurden im Halbdunkeln weiterkultiviert) oder unter Licht kultiviert. Nach 3 Tagen konnte in der Ausbreitung des Pilzes auf den verschiedenen Platten kein Unterschied im Wachstum festgestellt werden.

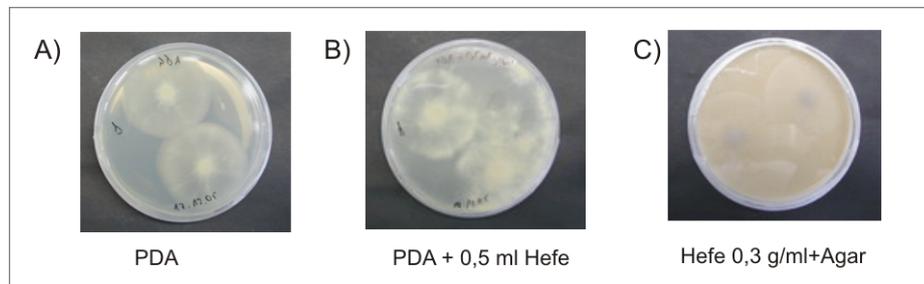


Abbildung 3.17: *B. cinerea* Wachstum nach 3 Tagen auf unterschiedlichen Medien (A) auf reinem PDA, (B) auf PDA überschichtet mit 0.5 ml Hefe (Konzentration: 0.3 g/ml), (C) Hefe 0.3 g/ml mit Agar.

Das Ergebnis, das auf den unterschiedlichen Medien erzielt wurde (Abb. 3.17 A bis D) deutet darauf hin, dass eine Vorbehandlung der Pflanzen mit Hefe das Wachstum von *B. cinerea* weder fördert noch hemmt.

Mögliche Unterschiede im Wachstum von *B. cinerea* auf Pflanzen, die mit Wasser oder mit Hefe vorbehandelt wurden, sollte eine Anfärbung von Pilzhypen und Sporen mit Tinte zeigen.

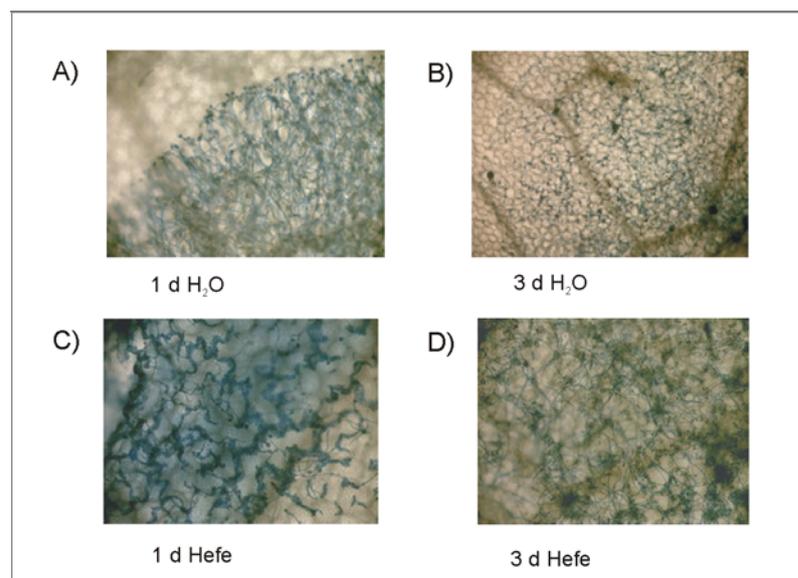


Abbildung 3.18: Mikroskopisches Bild (20fache Vergrößerung) von *B. cinerea* Sporen und Hyphen auf Blättern von *A. thaliana* Col-0 angefärbt mit verdünnter Tinte. A) 1 Tag und B) 3 Tage nach Wasservorbehandlung; C) 1 Tag und D) 3 Tage nach Hefevorbehandlung.

Bei den mit Wasser vorbehandelten Blättern waren nach einem Tag viele Sporen und Myzel im Bereich des Infektionstropfens zu erkennen (Abb. 3.18 A). Nach 3 Tagen war eine Ausbreitung des Myzels zu beobachten. Die Aufnahme (Abb. 3.18 B) wurde im Randbereich des Infektionstropfens durchgeführt, weil in der Mitte der Applikationsstelle keine Unterschiede zu verzeichnen waren.

Während bei der Wasservorbehandlung das Wachstum des Pilzes von einem bis 3 Tage gut zu erkennen ist, sind auf den hefevorbehandelten Blättern weniger Hyphen zu erkennen (Abb. 3.18 C und 3.18 D). Allerdings wurden angefärbte Artefakte sichtbar, die bisher nicht erklärt werden konnten. Diese Artefakte traten nicht auf, wenn PD Broth alleine auf die Blätter getropft wurde. Nur eine Hefeschicht auf den Blättern vermochte diese angefärbten Artefakte zu bilden.

3.7 Die Rolle von OPDA und JA in der Resistenz gegenüber Pathogenen

Unterschiede in den Symptomen, Bakterienzahlen (Abb. 9 und 10) und Läsionen (Abb. 14 C und 15 C) zwischen *dde2* und Col-0 bzw. zwischen *opr3* und WS führte zu weiterführenden Untersuchungen, in welchem Umfang die beiden Oxylipine OPDA und/oder JA an der Schutzwirkung gegen die Pathogene *P. syringae* und *B. cinerea* beteiligt sind. Der Gehalt an JA steigt nach Stress, Verwundung, Ozon und Pathogeninfektionen in den Pflanzen an. OPDA wird ebenfalls nach Verwundung und Pathogeninfektion verstärkt gebildet. Eine Analyse der Genexpression von Taki et al. (2005) zeigte sowohl eine Überlappung zwischen OPDA und JA als auch Unterschiede.

3.7.1 Infektion der JA-Biosynthese-Mutanten mit *P. syringae*

Wie erwähnt (3.6.1.1), zeigten sich bei den Versuchen zur Hefewirkung zwischen den JA-Biosynthese-Mutanten und den entsprechenden Wildtypen Unterschiede im Bakterienwachstum. Dies deutet auf eine Funktion der Oxylipine in der Pathogenabwehr hin. Um die Rolle von OPDA und JA in der Pathogenabwehr genauer zu untersuchen, wurde das Bakterienwachstum von *P. syringae* in diesen Mutanten mit den korrespondierenden Wildtypen verglichen.

3. Ergebnisse

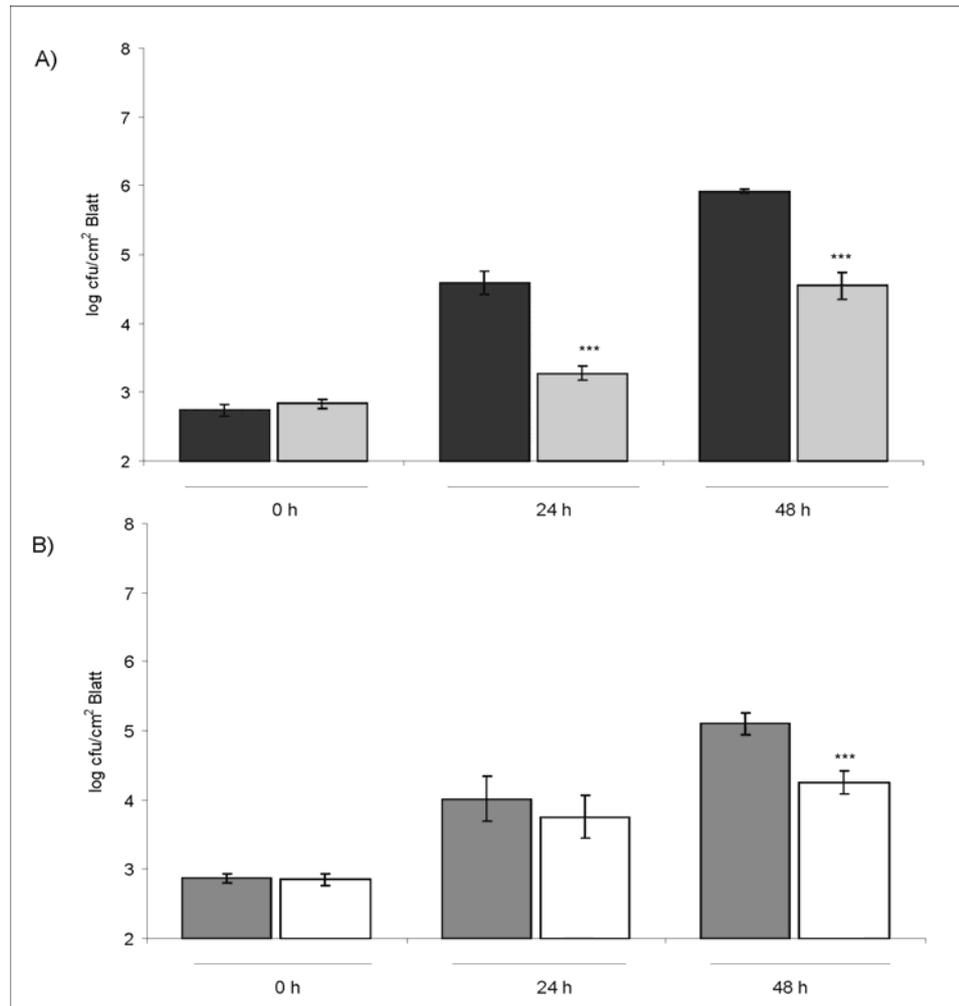


Abbildung 3.19: Col-0 und *dde2* (A) infiltriert mit *P. syringae* (Bakteriendichte: 1×10^6 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$) (B) WS und *opr3*. Col-0 (dunkelgrau), *dde2* (hellgrau), WS (mittelgrau), *opr3* (weiß). Die Ergebnisse wurden in 5 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, n = 9). Der signifikante Unterschied wurde mittels T-Test *** $p < 0.001$ ermittelt.

Die Empfindlichkeit von *dde2* und *opr3* gegenüber *P. syringae* wurde durch die Ausprägung der Symptome und die Anzahl der Bakterienkolonien nach 24 und 48 Stunden ermittelt.

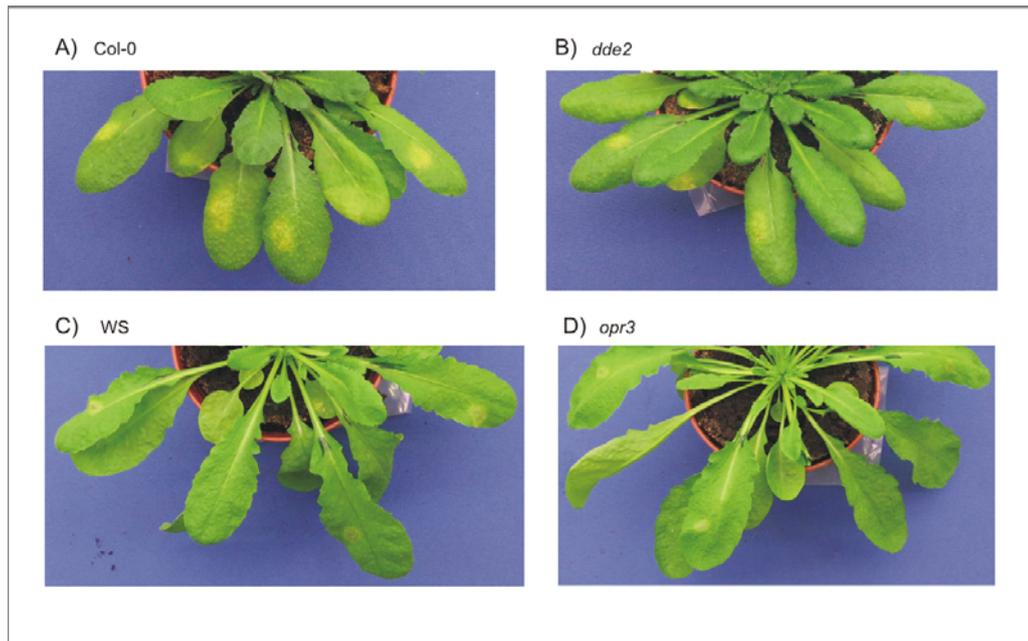


Abbildung 3.20: Symptome von *P. syringae* 3 Tage nach Infiltration mit 1×10^6 cfu/ml Sporensuspension in 10 mM $MgCl_2$. In der oberen Reihe ist der WT Col-0 (A) mit der entsprechenden Mutante *dde2* (B) dargestellt; in der darunter liegenden Reihe der Symptomvergleich von WS (C) mit *opr3* (D).

Die makroskopisch sichtbaren Symptome (Abb. 3.20) waren bei *dde2* im Vergleich zu Col-0 geringer. Die Mutante *opr3* zeigte eine geringere Symptomausprägung als der WT WS.

In den JA-Biosynthese-Mutanten war die Anzahl der Bakterien niedriger als in den entsprechenden Wildtypen. Während die Mutante *dde2* einen um 20fach geringeren Wert nach 24 und 48 Stunden aufzeigte, war das Bakterienwachstum in *opr3* weniger stark verringert. Ein signifikanter Unterschied mit einer 6fach geringeren Bakterienzahl als im WT konnte erst nach 48 Stunden detektiert werden. Die ausgeprägten Unterschiede zwischen Wildtypen und Mutanten und das gezählte Bakterienwachstum stimmen gut überein.

Die höhere Anzahl Bakterien in den Wildtypen zeigte, dass sich das Vorhandensein von OPDA und JA negativ auf die Abwehr gegenüber *P. syringae* auswirkt.

3.7.2 Infektion der JA-Biosynthese-Mutanten mit *B. cinerea*

Ob sich die Empfindlichkeit der beiden Mutanten gegenüber *B. cinerea* unterscheidet, wurde in den nachfolgenden Versuchen durch die quantitative Auswertung der Nekrosen- bzw. Chlorosengrößen untersucht.

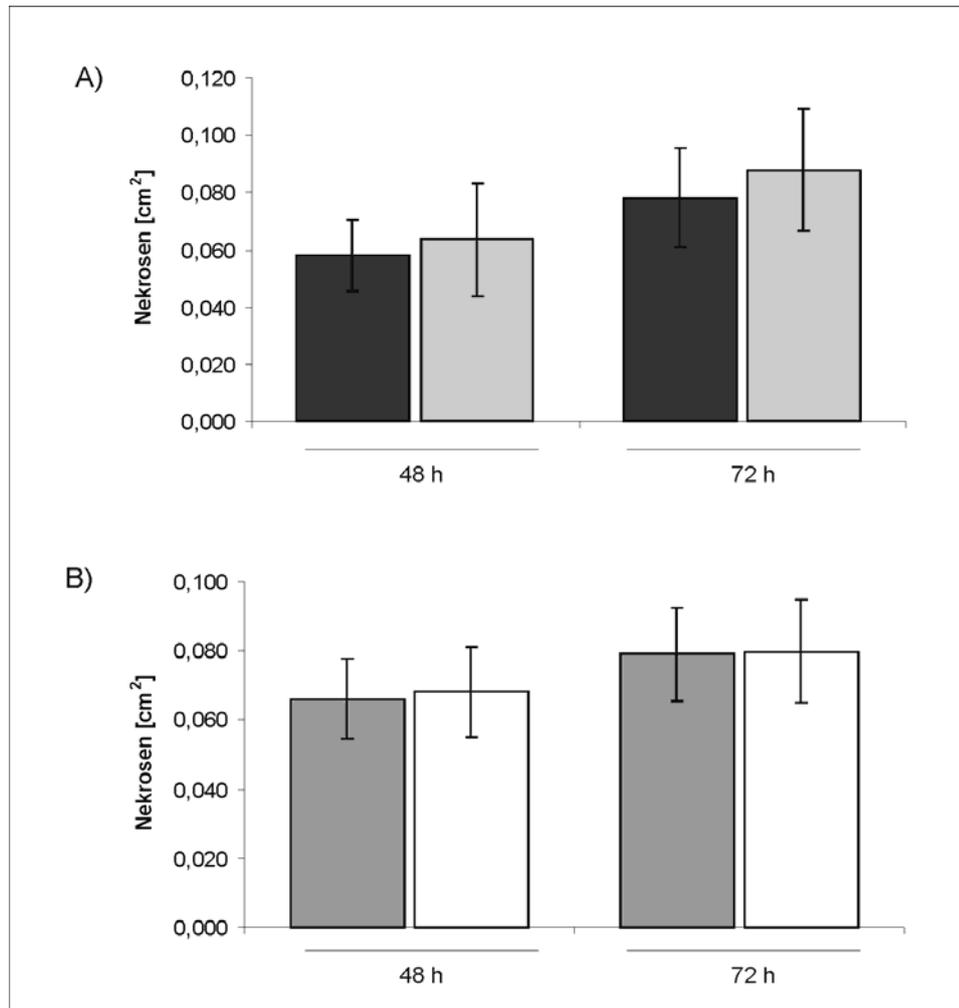


Abbildung 3.21: *B. cinerea* Infektionen (9×10^5 Sporen/ml in PD Broth); Nekrosengrößen nach 48 und 72 Stunden bei Col-0 (dunkelgrau) und *dde2* (hellgrau) (A); (B) bei WS (mittelgrau) und *opr3* (weiß). Die Werte wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, $n \geq 47$ nach 48 Stunden bzw. $n \geq 48$ nach 72 Stunden). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt.

Die Nekrosengrößen (Abb. 3.21) waren sowohl zwischen *dde2* und Col-0 als auch zwischen *opr3* und WS nicht signifikant; wobei tendenziell die Mutante *dde2* etwas größere Nekrosen zeigte als der WT.

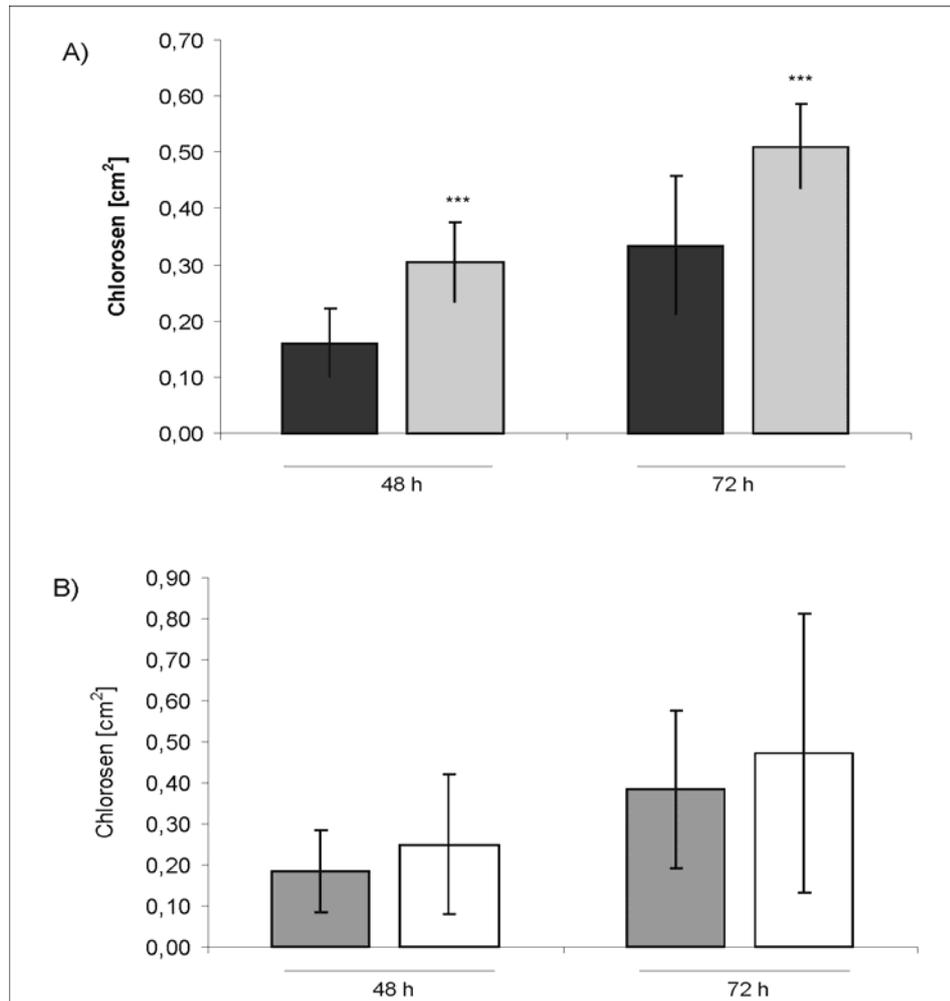


Abbildung 3.22: *B. cinerea* Infektion (9×10^5 Sporen/ml in PD Broth) bei OPDA/JA Mutanten und entsprechenden Wildtypen. A) Col-0 (dunkelgrau) und *dde2* (hellgrau), (B) WS (mittelgrau) und *opr3* (weiß). Die Werte wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt (Mittelwert \pm SD, $n \geq 47$ nach 48 und 72 Stunden). Die Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt (***) (< 0.001).

Die Mutante *dde2* zeigte signifikant eine 2fach größere Chlorosenfläche im Vergleich zu Col-0 (Abb. 3.22). Bei *opr3* war kein signifikant unterschiedliches Ergebnis zu verzeichnen.

Aus den Läsionengrößen lässt sich schließen, dass OPDA eine wichtige Funktion in der Abwehr gegen den nekrotrophen Pilz *B. cinerea* aufweist. Wobei JA vermutlich zusätzlich zur Abwehr beiträgt.

3.7.3 Genexpressions-Analysen nach *P. syringae* Infektion

Wie bereits erwähnt, spielt die SA-abhängige Abwehr eine wichtige Rolle gegen *P. syringae*. Für die Untersuchung, ob eine verstärkte Aktivierung des SA-Weges in *dde2* und *opr3* vorliegt und an der Resistenz gegen *P. syringae* eine Rolle spielt, wurde die Expression der SA-responsiven Gene *Pr1* und *Pr2* mittels Northernblot-Analyse untersucht. Als Beispiel für die Gene in der Detoxifizierung wurde *Gst1* verwendet, für Gene im JA-Weg *Lox2*.

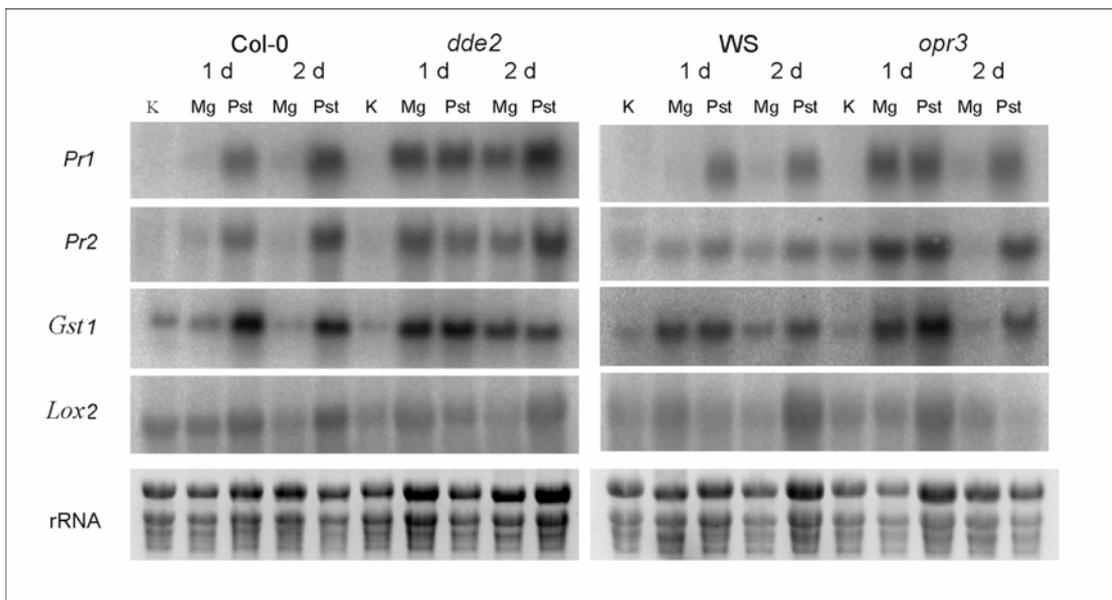


Abbildung 3.23: Genexpression in *dde2* und *opr3* mit den entsprechenden Wildtypen nach Infektion mit *P. syringae* (Pst) (Bakteriendichte: 1×10^6 cfu/ml in 10 mM MgCl₂) bzw. 10 mM MgCl₂ (Mg) vor der Behandlung (K), 1 und 2 Tage nach Infiltration. Das Ergebnis wurde in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt. Pro Spur wurden 7 μ g RNA aufgetragen. Um die Beladung des Gels abschätzen zu können, wurde in der untersten Spur die rRNA mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Die Farbe wurde zur besseren Vergleichbarkeit invertiert.

Die Expression von *Pr1* und *Pr2* nach *P. syringae* (Abb. 3.23) war in den Mutanten und Wildtypen nach einem und 2 Tagen vergleichbar stark. Allerdings war in den Mutanten in der Mg-Kontrolle eine höhere *Pr*-Expression zu beobachten als im WT. Dies deutet darauf hin, dass die Mutanten empfindlicher gegenüber osmotischem Stress sind als die Wildtypen. Der SA-Weg ist in den beiden Mutanten nach *P. syringae* nicht stärker angeschaltet als in den Wildtypen. Die Expression von *Gst1* und *Lox2* war vergleichbar zwischen Mutanten und Wildtypen.

3.8 JA-Untersuchungen von *F. graminearum*

Das Vorkommen von Jasmonaten im Pilz *F. oxysporum matthiolae* ist von Miersch et al. (1999) beschrieben worden. Da das Genom des Stammes *F. graminearum* Linie 7 bekannt war, sollte geklärt werden, ob JA in diesem Pilz nachzuweisen ist (Abb. 3.24), und ob die JA einen Pathogenitätsfaktor darstellt.

3.8.1 JA-Analyse von *F. graminearum* mittels GC-MS

Für die Untersuchungen von *F. graminearum* Linie 7 und *F. oxysporum* auf JA und OPDA, die im GC-MS durchgeführt wurden, wurden die Pilze auf unterschiedlichen Medien angezogen (siehe 2.2.3.3). Ein exemplarischer Nachweis von JA in *F. graminearum* Linie 7 ist in Abbildung 3.24 dargestellt. In *F. oxysporum* konnte JA nicht nachgewiesen werden. OPDA war in den untersuchten Pilzen nicht zu detektieren. Ein Unterschied im JA-Gehalt bei in PDA oder Folsäure angezogenen Pilzen bestand nicht.

Eine JA- und OPDA-Analyse von *F. graminearum* LOX-KO-Mutanten, komplementierten Stämmen und dem entsprechenden WT von N. Keller (USA) zeigte weder einen Grundgehalt von JA noch von OPDA. Erwartet wurde ein verringerter oder kein JA-Gehalt in den LOX-KO-Mutanten und ein erhöhter JA-Wert in den komplementierten Stämmen.

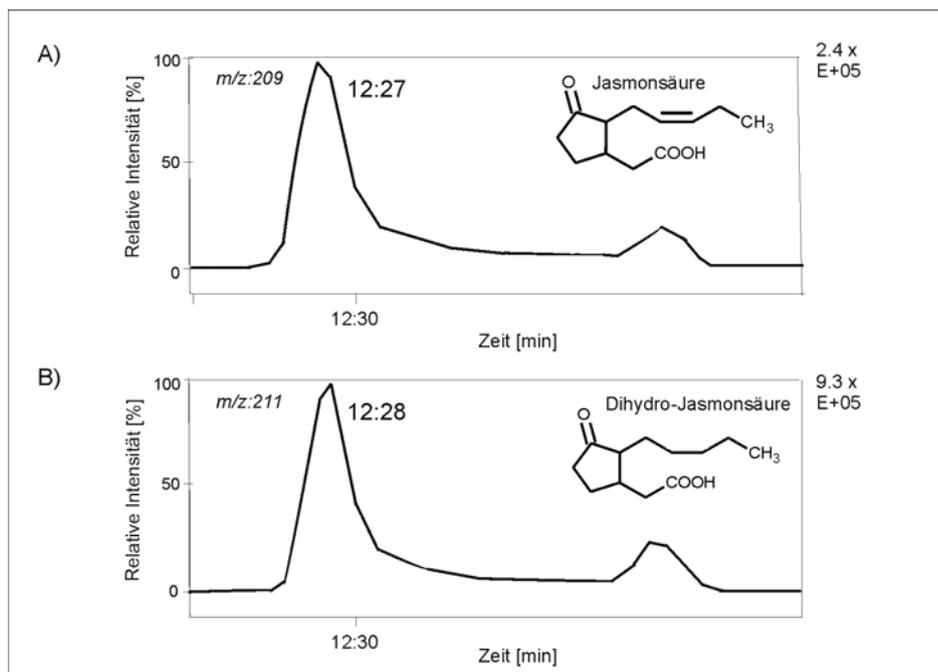


Abbildung 3.24: Repräsentatives GC-MS-Chromatogramm von JA in *F. graminearum* (A) bzw. Dihydro-JA als Standard (B). Die Detektion erfolgte im NICI-Modus („negative ion chemical ionisation“). Dabei wurde JA bei m/z 209 und Dihydro-JA bei m/z 211 nachgewiesen.

Nach der Zugabe von Linolensäure (siehe 2.2.3.3) zur Stimulierung der JA-Synthese im Pilz (WT, LOX-KO-Mutanten und komplementierten Stämmen) wurde in den Messungen kein Effekt auf den JA- und OPDA-Gehalte festgestellt.

Nach dem Nachweis der JA in *F. graminearum* Linie 7 wurde die JA-Biosynthese durch homologe Rekombination ausgeschaltet.

3.8.2 Herstellung eines *F. graminearum* Konstruktes

Um die Funktion der Jasmonate in *F. graminearum* zu untersuchen, sollte die Expression der Lipoxygenase ausgeschaltet werden. In Pilzen ist die gezielte Zerstörung eines Gens durch homologe Rekombination möglich. Um diese Strategie zu verfolgen, wurde ein 916 Bp langes Fragment des Lipoxygenase-Gens mittels PCR aus der genomischen DNA von *F. graminearum* amplifiziert und in den Vektor pGEM T-Easy kloniert (siehe 2.2.4.6.4 und 2.2.4.6.5). Aus diesem Vektor wurde das Fragment über Schnittstellen, die in der Primersequenz enthalten waren, ausgeschnitten und in den Pilz-Transformationsvektor pAN7-1 eingebracht. Es wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Bei Strategie 1 (Abb. 3.25 A) wurde das LOX-Fragment in die *Bgl*II-Schnittstelle eingebracht (Sequenz siehe Anhang Abb. 8.2 und 8.3). Diese Schnittstelle liegt im Promotorbereich des Gens für die Hygromycin-Resistenz, eine erfolgreiche Verwendung dieser Schnittstelle wurde von Reichhard et al. (2000) beschrieben.

3. Ergebnisse

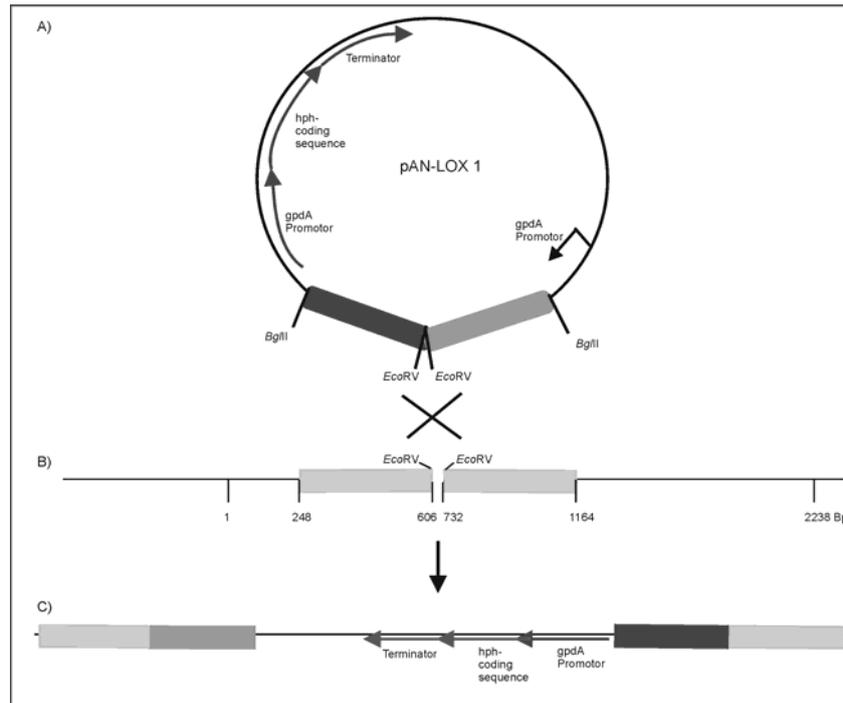


Abbildung 3.25: A) Einbringen der LOX-Sequenz in den pAN7-1-Vektor über die *BglII*-Schnittstelle.

B) Zielsequenz des LOX-Gens = ; LOX-Sequenz in der PCR amplifiziert = und .

C) Darstellung des Genombereiches nach erfolgter homologer Rekombination.

Bei Strategie 2 (Abb. 3.26 A) wurde das LOX-Fragment mit *PvuII*, einem Enzym, das glatte Enden herstellt, aus dem pGEM-Vektor ausgeschnitten und in den mit *EheI* – ebenfalls ein Enzym, das glatte Enden herstellt – geschnittenen pAN-Vektor ligiert (Sequenz siehe Anhang Abb. 8.4 und 8.5). Zur Erleichterung der homologen Rekombination wurde die Vektor-DNA vor der Transformation mit *EcoRV* durch einen Schnitt in der Mitte der LOX-Sequenz linearisiert. In Abb. 3.25 und 3.26 ist die homologe Rekombination dargestellt, in der durch „crossover“ Ereignis die Integration des pAN-Vektors und damit die Zerstörung des LOX-Gens stattfindet. Eine erfolgreiche Transformation würde sich durch Selektion auf Hygromycin-Resistenz und Nachweis einer nicht mehr intakten Sequenz des LOX-Gens nachweisen lassen.

3. Ergebnisse

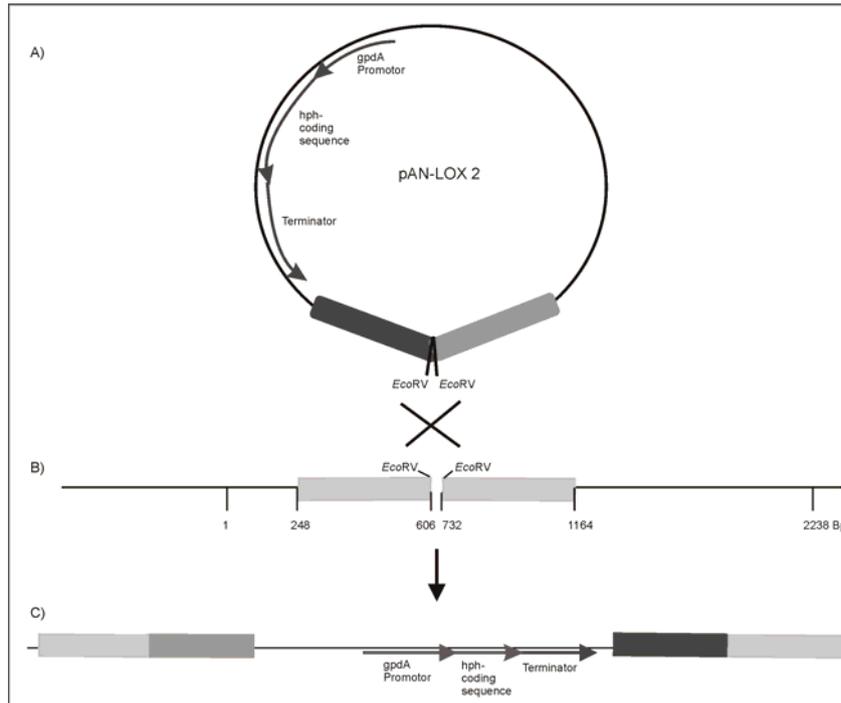


Abbildung 3.26: A) Einbringen der LOX-Sequenz in den pAN7-1-Vektor über die *PvuII/EheI*-Schnittstelle.
 B) Zielsequenz des LOX-Gens = [] ; LOX-Sequenz, in der PCR amplifiziert = [] und [].
 C) Darstellung des Genombereiches nach erfolgreicher homologer Rekombination.

Für beide Strategien (siehe 2.2.4.6.4 und 2.2.4.6.5) wurden Transformanten, die das pAN-LOX-Konstrukt enthielten auf Ampicillin-haltigem Medium selektioniert. Als Nachweis, ob das LOX-Gen im pAN-Vektor enthalten ist, wurde die Plasmid-DNA mit *BglII* geschnitten und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

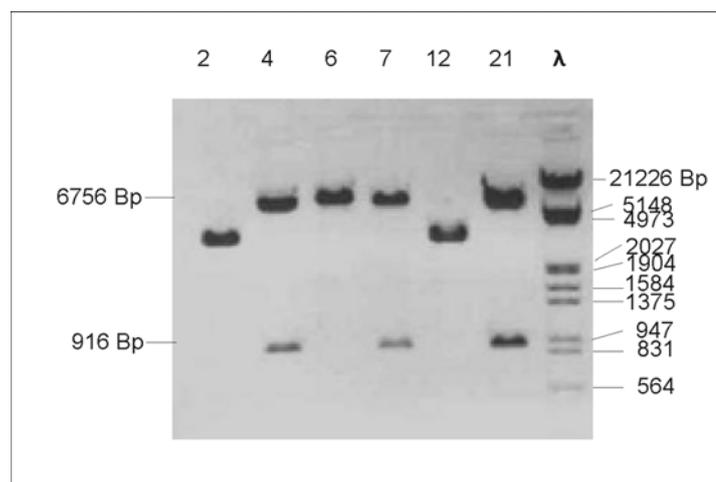


Abbildung 3.27: Exemplarische Klone von pAN-LOX geschnitten mit *BglII*. Die Banden der Klone 7 und 21 besitzen die erwarteten Bandengrößen von 6756 Bp (pAN-Vektor) und 916 Bp (LOX-Gen-Fragment). Zum Vergleich der Bandengrößen der λ-Marker in der rechten Spur.

Auf dem Agarosegel konnten die erwarteten Bandengrößen des pAN-Vektors und des LOX-Gens der einzelnen Transformanten mit dem λ -Marker verglichen werden (Abb. 3.27).

3.8.3 Infektion von *A. thaliana* mit *F. graminearum*

F. graminearum ist nicht nur in der Lage, Getreide und Mais zu befallen, sondern auch *A. thaliana*. Infiziert wurden mit *F. graminearum* Linie 7 (siehe 2.2.3.3) Blüten und junge Schoten (Urban et al., 2002) und, wie Chen et al. (2006) bestätigten, auch unverwundete bzw. verwundete Blätter. Bei unverwundeten Blättern wächst der Pilz als Luftmyzel auf der Blattoberfläche (Abb. 3.28), bei verwundeten Blättern dringt der Pilz in das Blatt ein.



Abbildung 3.28: *F. graminearum* Linie 7 (1×10^5 Konidien/ml Wasser plus 0,01% Silwet L-77) auf *A. thaliana* Col-0-Blättern gesprüht. Die Auswertung erfolgte 6 Tage nach Infektion. Die Pfeile kennzeichnen Symptome auf den Blättern.

5 Tage nach dem Sprühen mit Konidien von *F. graminearum* in die offene Blüte war der Hauptstiel der Blüte vertrocknet, eingeschnürt und bräunlich/grau verfärbt (Abb. 3.29).

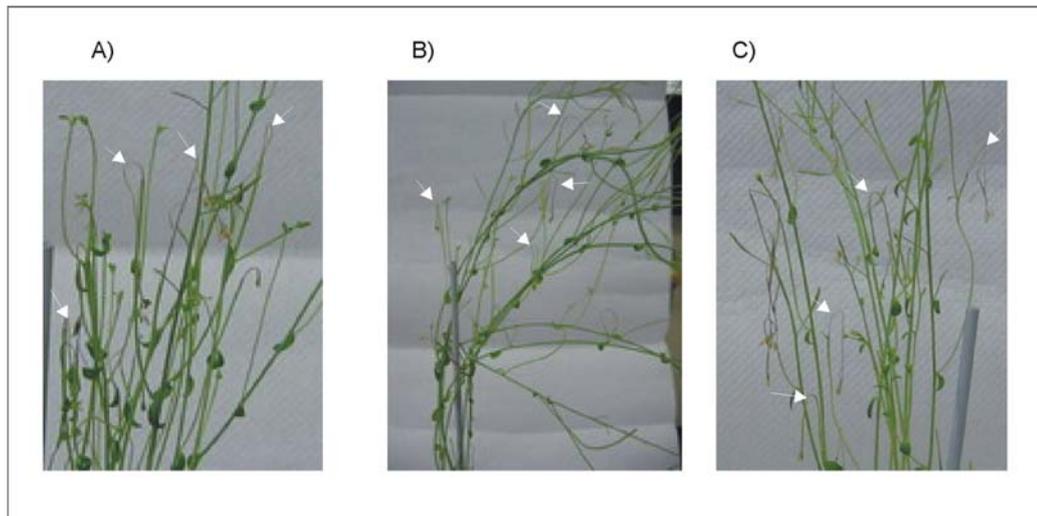


Abbildung 3.29: Symptome von Col 9 Tage nach Sprühinfektion (1×10^5 Konidien/ml Wasser mit 0,01% Silwet L-77) mit *F. graminearum* WT 3639 (A), LOX-KO-Mutante (B) bzw. mit dem komplementierten Stamm von *F. graminearum* (C). Die Pfeile kennzeichnen infizierte Blüten, deren Hauptstiel durch die Infektion vertrocknete, einschnürte und abknickte.

Infektionen von *A. thaliana* Col mit dem WT (3639) (Abb. 3.29 A), LOX-KO-Mutanten (Abb. 3.29 B) und komplementierten Stämmen (Abb. 3.29 C) von N. Keller zeigten in 2 unabhängigen Versuchen keine Unterschiede in der Infektion von Blüten (jeweils zwischen 73 und 91 %). Wenn JA für die Pathogenität des Pilzes verantwortlich wäre, hätten die LOX-KO-Mutanten keine oder stark verringerte Symptome aufweisen müssen als der WT; die komplementierten Stämme gleiche oder verstärkte Symptome im Vergleich zum WT.

4. Diskussion

In Pflanzen werden nach Kontakt mit Mikroorganismen oder Elicitoren Abwehrreaktionen induziert, die zur Pathogenresistenz beitragen. Oxylipine sind Signalmoleküle, die an der Vermittlung der Aktivierung von Abwehrreaktionen beteiligt sind. Ein Aspekt dieser Arbeit war die Aufklärung der Mechanismen der Hefevermittelten Resistenz in *A. thaliana* gegenüber den Pathogenen *P. syringae* und *B. cinerea*. Ein weiterer Aspekt war die Funktion von Jasmonaten in Pflanze-Pathogen-Interaktionen.

4.1 Die Rolle von Jasmonaten in Pflanzen und Pilzen in der Pflanze-Pathogen-Interaktion

4.1.1 Jasmonate in Pflanzen

Für die Untersuchung der Funktion von Jasmonaten, die nach Farmer et al. (2003) hauptsächlich die Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress in Pflanzen regulieren, wurden Mutanten der Jasmonat-Biosynthese und der Signaltransduktion verwendet (Berger, 2002; Devoto und Turner, 2005). Die Jasmonatmutanten *coi1*, *fad3-2fad7-2fad8* und *jar1* zeigen eine höhere Sensitivität gegenüber nekrotrophen Pathogenen, woraus gefolgert wurde, dass die Jasmonat-abhängige Abwehr für die Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene wichtig ist (Staswick et al., 1998; Thomma et al., 1998 und Vijayan et al., 1998). Die Rolle der Salicylsäure, einem weiteren pflanzlichen Signalmolekül, wurde ebenfalls durch die Analyse von Mutanten aufgeklärt. Es wurde gezeigt, dass Mutanten mit einem Defekt im Salicylsäureweg eine höhere Anfälligkeit gegenüber biotrophen Pathogenen, wie *P. syringae*, aufweisen. Basierend auf diesen Daten wurde ein vereinfachtes Modell für die Abwehr gegen biotrophe und nekrotrophe Pathogene entwickelt, nach dem die Salicylsäure-abhängige Abwehr wichtig für eine Abwehr gegenüber biotrophen Pathogenen, wie *P. syringae*, ist (Delaney et al. 1994). Dieses Modell wird zunehmend kritisch diskutiert (Oliver und Ipcho, 2004 und Glazebrook, 2005), denn auch der JA-Weg ist an der Abwehr gegen biotrophe Pathogene beteiligt.

Neben den etablierten pflanzlichen Oxylipin-Signalen JA und MeJA sind in den letzten Jahren weitere biologisch aktive Oxylipine beschrieben worden. Nach Weber et al. (1997) wird die Abwehr gegen Pathogene durch einen Komplex aus mehreren

Signalen, die Oxylin-Signatur, reguliert. Aufgrund der Akkumulation und der biologischen Aktivität wird besonders das Cyclopentenon OPDA als ein wichtiges Signal in der Regulation von Verwundungs-induzierten Abwehrreaktionen diskutiert. Weiterhin ist nach Stintzi et al. (2001) OPDA ein physiologisches Signal für die Abwehr, das ein breites Spektrum an Resistenz in Abwesenheit von JA induziert. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob JA und/oder OPDA bei der Abwehr von biotrophen und nekrotrophen Pathogenen eine wichtige Rolle spielen. Dazu wurden Mutanten der JA-Biosynthese verwendet. Die *dde2* Mutante (Malek et al., 2002) besitzt einen Defekt vor und die *opr3* Mutante (Sander et al., 2000; Stintzi und Browse, 2000) einen Defekt nach der OPDA-Synthese. Die Verwendung dieser Mutanten in der Interaktion mit dem biotrophen Bakterium *P. syringae* und dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* ermöglichte die Untersuchung, ob und welche Rolle OPDA und welche JA in der Abwehr dieser Pathogene spielen. Von *opr3* war bekannt, dass diese Mutante eine vergleichbare Resistenz wie der WT gegenüber *Bradysia impatiens* Larven und dem nekrotrophen Pathogen *A. brassicicola* besitzt (Stintzi et al., 2001). Über die Sensitivität der *dde2* Mutante gegenüber Pathogenen war dagegen bisher nichts bekannt.

4.1.1.1 Die Rolle von JA und OPDA in der Resistenz gegen *P. syringae*

Übereinstimmend mit dem Modell unter 4.1.1 konnte in den vorliegenden Versuchen gezeigt werden, dass die Mutanten *dde2* und *opr3* nicht sensitiver gegenüber *P. syringae* sind (Abb. 4.1). In der *dde2* Mutante war das Bakterienwachstum um den Faktor 20 geringer als im korrespondierenden Wildtyp. Das deutet darauf hin, dass sich das Vorhandensein von OPDA und JA im Wildtyp negativ auf die Abwehr gegen *P. syringae* auswirkt.

Kloek et al. (2001) und Nickstadt et al. (2004) wiesen eine erhöhte Resistenz gegen *P. syringae* in den Signaltransduktions-Mutanten *coi1* und *jln1* nach. Möglicherweise ist eine höhere Akkumulation von SA für die erhöhte Resistenz verantwortlich, da sowohl SA als auch die Induktion von *Pr1* nach *P. syringae* Infektionen in *coi1* und *jln1* nachgewiesen werden konnten. Basierend auf den Daten kann ein negativer „crosstalk“ zwischen SA und JA postuliert werden (siehe Einleitung). Für *dde2* und *opr3* wurde in den für diese Arbeit durchgeführten Northern-Blot Analysen im Gegenteil keine stärkere Aktivierung des SA-Weges nachgewiesen. In diesen Mutanten müssen andere Mechanismen für die erhöhte Resistenz verantwortlich sein.

In den vorliegenden Ergebnissen konnte für *dde2* und *opr3* nachgewiesen werden, dass sich Jasmonate eher negativ auf die lokale Abwehr gegen *P. syringae* auswirken.

Dagegen wurde kürzlich von Truman et al. (2007) gezeigt, dass Jasmonate in *jin1* und *opr3* für die systemische Abwehr gegen *P. syringae* eine wichtige Rolle spielen.

Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen wurde für die *fad3-2fad7-2fad8* Mutante beschrieben (Kloek et al., 2001), dass sie ähnlich wie der Wildtyp auf eine Infektion mit *P. syringae* reagiert. Die *fad3-2fad7-2fad8* Mutante ist nicht in der Lage, Linolensäure und damit weder OPDA noch JA zu synthetisieren. Diese Mutante wurde in den Versuchen in eine *P. syringae* Lösung getaucht, während die Bakterien in der vorliegenden Arbeit standardmäßig infiltriert wurden. Um auszuschließen, dass die Resistenz, die bei *dde2* auftrat, auf die Infektionsmethode zurückzuführen war, wurden zwei Versuche durchgeführt, in denen die oberirdischen Pflanzenteile in eine *P. syringae* Suspension mit Detergenz getaucht wurden. Das Ergebnis der Tauchversuche bestätigte die Ergebnisse aus den Infiltrationsversuchen. Die Mutante *dde2* zeigte deutlich weniger Symptome (Abb. 4.1 B) und war damit resistenter als der korrespondierende Wildtyp Col-0 (Abb. 4.1 A).

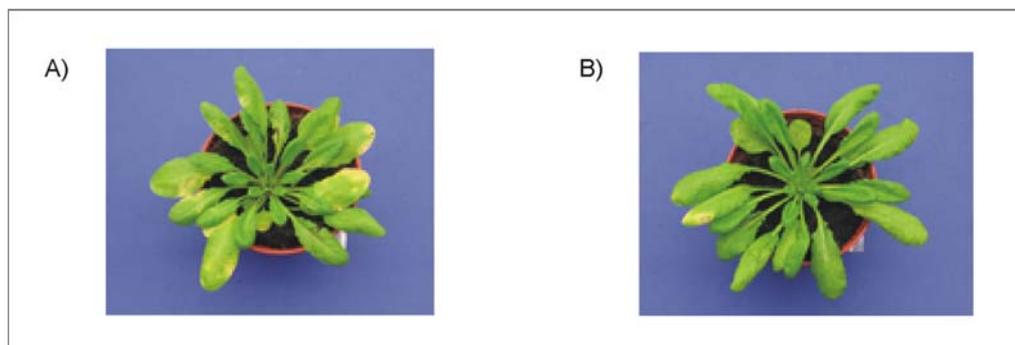


Abbildung 4.1: Blattsymptome 5 Tage nach Tauchbehandlung mit *P. syringae* (Bakteriendichte: 1×10^8 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$ mit 0.02 % Silwet L-77). A) Col-0 im Vergleich zu B) *dde2*.

Tauchversuche mit *opr3* und WS zeigten ebenfalls in Übereinstimmung mit den Infiltrationsversuchen bei *opr3* eine geringere Symptomentwicklung als beim WT.

In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen wurde die *fad*-triple-Mutante nicht eingesetzt, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich war. Beide Mutanten (*dde2* und *fad3-2fad7-2fad8*) haben den Defekt in verschiedenen Abschnitten der JA-Biosynthese. Außer OPDA und JA sind auch andere enzymatisch bzw. nicht enzymatisch gebildete Oxylipine, die von Linolensäure abstammen, biologisch aktiv (Thoma et al., 2003; Montillet et al., 2005), so dass damit die Unterschiede in der Resistenz zwischen der *fad*-triple Mutante und *dde2* erklärt werden könnten.

4.1.1.2 Die Rolle von JA und OPDA in der Resistenz gegen *B. cinerea*

Die Überprüfung der Sensitivität der Mutanten *dde2* und *opr3* im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen ergab, dass die *dde2* Mutante eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber *B. cinerea* aufweist. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit erhöhter Sensitivität der JA-Mutanten *coi1*, *fad3-2fad7-2fad8* und *jar1* gegen nekrotrophe Pathogene (Staswick et al., 1998; Thomma et al., 1998; Vijayan et al., 1998). Bei *opr3* waren die *B. cinerea* Läsionen dagegen nicht signifikant größer. Da die *opr3* Mutante im Gegensatz zur *dde2* Mutante OPDA bilden kann, lässt sich daraus schließen, dass OPDA eine wichtige Rolle in der Abwehr von *B. cinerea* besitzt, die nicht von Jasmonsäure übernommen werden kann. Die nicht signifikant größeren *B. cinerea* Läsionen bei *opr3* korrelieren mit den Ergebnissen von Stintzi et al. (2001), die eine erhöhte Resistenz von *opr3* gegen *A. brassicicola* aufzeigten. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass OPDA eine wichtigere Funktion gegen verschiedene nekrotrophe Pilze aufweist als JA. Eine mögliche Erklärung für die sowohl unterschiedlichen als auch überlappenden Funktionen von Jasmonat-Cyclopentanonen (z.B. JA) und Cyclopentenonen (z.B. OPDA und dnOPDA) kann nach Weber (2002) in den strukturellen Unterschieden von JA und OPDA liegen. OPDA weist eine längere Kohlenstoffkette auf als JA. Weiterhin enthält OPDA, aber nicht JA, eine α -, β - ungesättigte Carbonylstruktur und ist damit ein reaktiveres Molekül als JA (Almeras et al., 2003).

Zusammenfassend führte die Untersuchung der *dde2* und *opr3* Mutante zu interessanten Ergebnissen über die Rolle von OPDA im Vergleich zu JA. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Pathogensensitivität wäre es allerdings wünschenswert, wenn beide Mutanten über den gleichen WT-Hintergrund verfügen würden.

4.1.2 Jasmonate in Pilzen

Außer in Pflanzen sind JA und ihre verschiedenen Derivate auch in Pilzen nachgewiesen worden, z.B. in *Fusarium oxysporum matthiolae*, *Gibberella fujikuroi* und *Botryodiplodia theobromae* (Miersch et al., 1991; Miersch et al., 1999).

Sowohl JA als auch die Vorstufe Linolensäure konnten in der vorliegenden Arbeit in *F. graminearum* nachgewiesen werden, während in *F. oxysporum lycopersici* keine JA zu detektieren war. Dies deutet darauf hin, dass JA nicht allgemein für die pilzliche Entwicklung essentiell ist. Ein Nachweis der JA war bei *F. graminearum* kurz nach Erhalt des Pilzes vom Fungal Genetics Stock Center (Kansas City, USA) möglich, während nach 2 Jahren, in denen der Pilz nur auf Medien angezogen wurde, keine JA nachgewiesen werden konnte. Es wäre denkbar, dass Jasmonate nur in der Pflanze-

Pathogen-Interaktion erforderlich sind. Wird der Pilz ausschließlich auf Medien vermehrt, sind Jasmonate möglicherweise nicht notwendig und werden vom Pilz nicht gebildet.

Durch Sequenzanalyse des gesamten Genoms von *F. graminearum* konnten die putativen Jasmonsäure-Biosynthesegene (Berger, unveröffentlicht) identifiziert werden. Das Genom enthält ein *LOX*-Gen sowie mehrere Gene mit Homologie zu AOS und OPDA-Reduktase. Ob Jasmonate in *F. graminearum* einen Pathogenitätsfaktor darstellen und evtl. eine Wirkung auf die pflanzlichen Signalwege ausüben, sollte durch Ausschalten der Expression der *LOX* überprüft werden.

Untersuchungen von *F. graminearum* *LOX*-KO-Mutanten, komplementierten Stämmen und dem entsprechenden WT von N. Keller (USA) ergaben keine messbaren JA- und OPDA Werte. Erwartet wurde im *F. graminearum* WT von N. Keller (USA) ein vergleichbarer Wert wie im zuvor untersuchten *F. graminearum* WT Stamm, in den *LOX*-KO-Mutanten keine JA und in den komplementierten Stämmen, in denen die Expression wiederhergestellt wurde, einen JA-Spiegel wie im WT oder höher.

Die *F. graminearum* Stämme von N. Keller wurden weiterhin auf ihre Pathogenität an *A. thaliana* Col getestet. Sowohl der Wildtyp, Stämme mit defektem *LOX*-Gen als auch die komplementierten Stämme konnten ohne signifikanten Unterschied Blüten und Schoten infizieren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die *LOX* keine wichtige Rolle für die Pathogenität von *F. graminearum* auf *A. thaliana* spielen. Eine andere Erklärung wäre, dass in *F. graminearum* Proteine mit entfernter Verwandtschaft zu *LOX* existieren, die eine Bildung von Hydroperoxiden aus Linolensäure katalysieren und dadurch Jasmonate bilden können. Eine Überprüfung der *LOX*-Aktivität könnte diese Frage klären.

Einen Nachweis von Proteinen mit Abwehrfunktion, die nach Jasmonatbehandlung akkumulieren, wie z.B. Defensin und Thionine (*Thi2.1*), konnten Epple et al. (1997; 1998) in *A. thaliana* nach Infektionen mit *F. oxysporum* aufzeigen. Thionine sind antimikrobielle Polypeptide. *Thi2.1* kann in *A. thaliana* durch MeJA, Silbernitrat und nekrotrophe Pathogene induziert werden. Eine Induktion von *Thi2.1* und *Pdf1.2* erfolgt durch Jasmonate und nekrotrophe Pilze durch einen SA-unabhängigen Signaltransduktionsweg (Bohlmann et al., 1998). *Thi2.1* wird stark induziert durch *F. oxysporum* und weitere nekrotrophe Pilze, aber nur schwach induziert durch *Peronospora parasitica* und andere biotrophe Pilze (Epple et al., 1997). Ein Effekt durch SA und ET konnte nicht nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen wird, dass *Thi2.1* durch einen anderen Signaltransduktionsweg als die *Pr*-Proteine induziert wird (Epple et al., 1997). Eine frühere (bereits nach einem Tag) und erhöhte Induktion von *Thi2.1* wurde in resistenten *A. thaliana*-Wildtypen nach Infektion mit *F. oxysporum* f. sp. *matthiolae* ermittelt. Daher scheint *Thi2.1* ein Teil des Resistenzmechanismus gegen *F. oxysporum* zu sein (Epple et al., 1998). Das Vorkommen von

Thi2.1 deutet darauf hin, dass Elicitoren aus dem Pilz bei Infektionen eine jasmonsäure-abhängige Abwehr in der Pflanze induziert. Bei diesem Elicitor könnte es sich evtl. um JA handeln.

4.1.3 Weitere Abwehrmechanismen in *A. thaliana*

Neben den Oxylipinen OPDA und JA wurde in den hier aufgezeigten Versuchen die Wirkung des Phytoalexins Camalexin auf die Resistenz gegen das biotrophe Bakterium *P. syringae* und den nekrotrophen Pilz *B. cinerea* untersucht.

Eine Akkumulation von Camalexin, dem Hauptphytoalexin von *A. thaliana*, erfolgt durch biotischen und abiotischen Stress (Zhao und Last, 1996). Diverse Pathogene induzieren eine Camalexin-Akkumulation, z.B. *P. syringae* (Glazebrook und Ausubel, 1994), *A. brassicicola* (Thomma et al., 1999b) und *Cochliobolus carbonum* (Glazebrook et al., 1997; Kagan und Hammerschmidt, 2001). In der Literatur wird die Akkumulation von Camalexin in *A. thaliana* unterschiedlich beschrieben. Während Thomma et al. (1999b) davon ausging, dass eine Camalexin-Biosynthese nicht durch exogene SA, JA oder ET induziert wird, beschreiben Kagan und Hammerschmidt (2001) eine Erhöhung des Camalexingehaltes durch SA. Zeier et al. (2004) geht von einer hemmenden Wirkung von SA auf die Camalexin-Biosynthese aus. Einen lokalen Anstieg des Camalexingehaltes durch Infiltration mit OPDA konnten Ergebnisse von Büttner (2004) zeigen, wobei zwischen dem Camalexingehalt und der OPDA Konzentration keine lineare Abhängigkeit bestand. In der *pad3* Mutante konnte Büttner (2004) durch OPDA die Camalexinsynthese induzieren, was nach Mert-Türk et al. (2003) darauf hindeutet, dass in *pad3* ein alternativer Biosyntheseweg für Camalexin bestehen könnte. Dieser Biosyntheseweg könnte möglicherweise auch durch OPDA induziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Hefebehandlungen von *A. thaliana* eine Akkumulation von Camalexin aufgezeigt werden. Die Bestätigung einer Erhöhung von Phytoalexinen nach Hefebehandlung erfolgte von Blechert et al. (1995) und Hahn und Albersheim (1978) in Sojabohnen und Zellkulturen. Daher wurde die Camalexin-Akkumulation als Kriterium für eine Wirkung der Hefeapplikation verwendet. Entgegen der Annahme, dass in *A. thaliana* die Akkumulation von Camalexin mit einer Ausbildung von Läsionen korreliert ist (Blechert et al., 1995; Hahn und Albersheim, 1978), konnte in dieser Arbeit eine 300fache Erhöhung des Camalexin-Gehaltes ohne Läsionenbildung aufgezeigt werden.

Unter Verwendung von Camalexin-Biosynthesemutanten wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob eine Akkumulation von Camalexin mit der Sensitivität der Mutanten oder Wildtypen gegenüber *P. syringae* bzw. *B. cinerea*

korreliert. In Übereinstimmung mit Glazebrook et al. (1997), Thomma et al. (1999b) und Ferrari et al. (2003) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Camalexin-Biosynthesemutanten nach Infektionen mit *B. cinerea* tendentiell, aber nicht signifikant, größere Nekrosen ausbilden. Daher ist Camalexin zwar an der Resistenz gegenüber *B. cinerea* beteiligt (Abb. 4.2), stellt aber keinen entscheidenden Faktor dar.

Neben *B. cinerea* wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Rolle von Camalexin gegen *P. syringae* untersucht. Camalexin spielte hierbei keine entscheidende Rolle in der Abwehr, da die Mutanten *pad3* (in Übereinstimmung mit Glazebrook und Ausubel, 1994) und *cyp79B2/B3* keine erhöhte Sensitivität im Vergleich zum WT Col-0 zeigten. Die Resistenz gegen *P. syringae* ist demnach nicht von der Camalexin-Biosynthese abhängig.

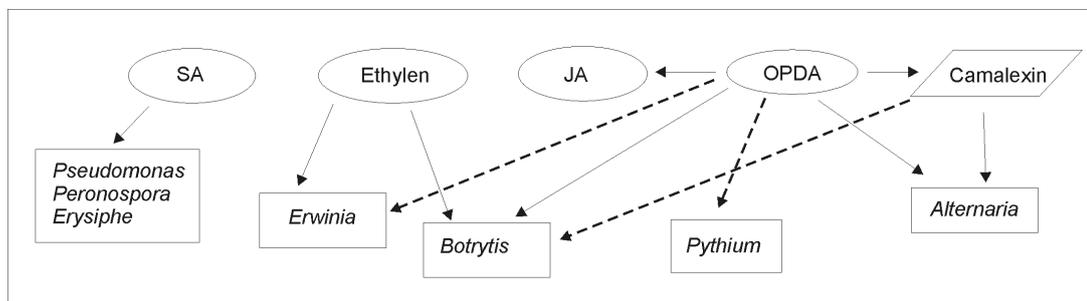


Abbildung 4.2: Induzierbare Signalwege in *A. thaliana* und ihre Wirksamkeit gegen verschiedene Gruppen von Pathogenen (verändert nach Thomma et al., 2001). Durchgehende Linien zeigen Signalwege, die durch Versuche belegt sind; gestrichelte Linien zeigen postulierte Signalwege, die noch durch Versuche bestätigt werden müssen bzw. noch nicht eindeutig sind.

In Abbildung 4.2 ist die Rolle der verschiedenen Signalwege in der Abwehr von Pathogenen dargestellt. In *A. thaliana* ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit OPDA wichtiger für die Abwehr gegen den nekrotrophen Pilz *B. cinerea* als JA. Dieses Ergebnis konnte von Stintzi et al. (2001) für *A. brassicicola* bestätigt werden. Inwieweit sich diese Aussage auf andere nekrotrophe Pathogene übertragen lässt, würde die vergleichende Untersuchung der Sensitivität der *dde2* und *opr3* Mutanten gegenüber weiteren nekrotrophen Pathogenen, wie z.B. *Erwinia*, einem nekrotrophen Bakterium und *Pythium*, einem nekrotrophen Oomyceten, zeigen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann aber eine Wirkung von OPDA im Gegensatz zu JA postuliert werden (Abb. 4.2). JA wurde bisher als wichtiges induziertes Signal gegen verschiedene Pathogene eingestuft, jetzt scheint OPDA die Rolle von JA in der Abwehr zu übernehmen.

Die Produktion von Camalexin trägt nach Thomma et al. (1999b) durch einen direkten antimikrobiellen Effekt zur Resistenz gegen *A. brassicicola* bei. Weiterhin zeigten Versuche mit *pad3* eine höhere Sensitivität gegen *A. brassicicola* als der korrespondierende WT. Eine hemmende Wirkung von Camalexin auf *B. cinerea* wird

bisher kontrovers diskutiert. Camalexin hemmt nach Denby et al. (2004) die Ausbreitung von *B. cinerea* in *A. thaliana*. Nach Ferrari et al. (2003) ist Camalexin wichtig für die lokale Resistenz, die Ausbreitung von *B. cinerea* kann allerdings nicht verhindert werden. Quidde et al. (1998) zeigte in Tomate Unterschiede in der Detoxifizierung von Camalexin zwischen verschiedenen *B. cinerea*-Stämmen.

Ausgehend von der erhöhten Sensitivität der Mutanten im Salicylsäureweg ist die Salicylsäure-abhängige Abwehr notwendig gegen die biotrophen Bakterien *Pseudomonas* und *Erysiphe* sowie gegen den biotrophen Pilz *Peronospora*.

Der Ethylenweg wirkt sowohl gegen *B. cinerea* als auch gegen *Erwinia* (Thomma et al., 1999a).

4.2 Mechanismen der Hefe-vermittelten Resistenz

In der Landwirtschaft können Infektionen mit Pilzen, Bakterien und Viren zu großen Ertragseinbußen führen. Um den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in der Landwirtschaft zu reduzieren, bzw. für den biologischen Anbau, wäre der Einsatz von Elicitoren eine alternative Methode. Extrakte oder chemische Komponente, die die Resistenz in der Pflanze induzieren, werden Pflanzenaktivatoren oder Elicitoren genannt. Klassische Aktivatoren haben keinen direkten Einfluss auf Pathogene, worin sie sich klar von Fungiziden unterscheiden (Kuc, 1983). Wichtig für eine Anwendung in der Praxis ist die Dauer der Schutzwirkung, die in den vorliegenden Versuchen gegenüber *P. syringae* zwischen dem 5. und 11. Tag nach Hefebehandlung nachgewiesen werden konnte. Eine vollständige Befallsfreiheit wurde in keinem der durchgeführten Experimente nach Hefebehandlung erreicht, was nach Schönbeck et al. (1993) typisch für Behandlungen mit Elicitoren ist.

Neben dem Einsatz autoklavierter Bäckerhefe wurde die Eignung autoklavierter Brauerei-Altheife (ein Abfallprodukt in Brauereien) und Zellwand-Elicitoren auf eine Aktivierung der pflanzlichen Resistenz untersucht. In den durchgeführten Versuchen führte Altheife ebenfalls sowohl zu einer Akkumulation von Camalexin als auch zu einer Schutzwirkung gegen *B. cinerea*. Versuche mit einem Zellwand-Elicitor gegenüber *P. syringae* führten im Gegensatz zu Versuchen in Zellkulturen (Gundlach et al., 1992; Meyer et al., 2001; Suzuki et al., 2005), zu keiner Erhöhung der Resistenz. Es wäre denkbar, dass Unterschiede in der Aufarbeitung der Hefezellwände der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse sind.

Lebende Pathogene induzieren in den Pflanzen Abwehrreaktionen, die aus Zellwandverstärkungen, der Ausbildung von Sekundärstoffen sowie einer Akkumulation von Pflanzenhormonen bestehen (Thomma et al., 2001; Govrin und Levine 2002; Heck et al., 2003). Ob eine Induzierung der pflanzlichen Abwehr auch durch abgetötete Hefe bewirkt wird, wurde durch Northern-Blot- und Microarray-Analysen untersucht. Hefe

aktivierte in den vorliegenden Versuchen auf *A. thaliana* verschiedene Gene. Von 1400 untersuchten Genen wurden aber nur relativ wenige induziert (6 Gene). Durch die Hefebehandlung wurden besonders Gene des Detoxifizierungssystems und des SA-Weges induziert, was als typische Reaktion auf einen Stressesstimulus angesehen werden kann. Im Vergleich hierzu bewirkten Anwendungen von Hefe-Elicitoren auf *Medicago truncatula* nach Suzuki et al. (2005) eine Induktion von 36 aus 114 untersuchten Genen. Nach Pathogeninfektionen in *A. thaliana* ist nach einer Resistenzerhöhung die Anzahl der induzierten Gene deutlich höher. Das deutet auf eine transiente Genregulation hin, die 2 Tage nach Hefebehandlung in der Microarray-Analyse nicht zu detektieren war. Weiterhin wäre denkbar, dass es sich bei der Reaktion auf Hefebehandlung um „Priming“ handelt. Da das „Priming“ selber nicht zu einer direkten Induktion von Abwehrreaktionen führt, sondern nur die Signaltransduktionskapazität erhöht (Conrath et al., 2002; 2006), wäre eine Hefewirkung erst später nach einer Pathogeninfektion zu detektieren. Trotz der relativ wenigen induzierten Gene zeigten Hefeanwendungen eine starke Wuchsreduktion auf Pathogene. Deshalb wäre ein Vergleich der Genregulierung, Proteinprofile und Metaboliten von Hefe-behandelten- und Kontrollpflanzen nach Pathogeninfektion interessant. Unterschiede in der Genregulation durch JA und durch Hefe wurde von Suzuki et al. (2005) für *Medicago* Zellkulturen beschrieben. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen ist der JA-Weg dabei nicht der Vermittler der Hefe induzierten Abwehr.

Behandlungen von Mutanten im Salicylsäureweg (*npr1* und *nahG*) zeigten nach Hefebehandlung keine erhöhte Resistenz gegenüber *P. syringae*. Das deutet in Übereinstimmung mit Ergebnissen der Genexpression darauf hin, dass der SA-Weg nicht nur für die basale und spezifische Resistenz, sondern auch für die Hefevermittelte Resistenz notwendig ist. Mutanten aus dem JA-Weg (*dde2* und *opr3*) zeigten nach Hefebehandlung einen signifikanten Schutz gegen *P. syringae*, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der JA-Weg nicht für die Schutzwirkung notwendig ist. Dagegen konnte in den vorliegenden Versuchen eine Schutzwirkung der Hefe gegen *B. cinerea* in den untersuchten Mutanten sowohl im SA- und JA-Weg, als auch in der Camalexinbiosynthese erzielt werden. Daraus lässt sich schließen, dass keiner der untersuchten Wege für eine Hefevermittelte Schutzwirkung gegen *B. cinerea* notwendig ist. AbuQamar et al. (2006) konnten Faktoren identifizieren, die unabhängig von Jasmonaten für die Resistenz gegen *B. cinerea* wichtig sind.

Um die Ursachen der verringerten Läsionengrößen von *B. cinerea* nach Hefebehandlung klären zu können, wurden verschiedene Möglichkeiten getestet. Hefe könnte als Nahrungsquelle für den Pilz dienen, so dass die Hyphen nicht in das Pflanzengewebe eindringen müssen und dadurch weniger Schäden an den Blättern verursachen. Eine Prüfung der direkten Wirkung von Hefe auf das Wachstum von *B.*

cinerea ergab, dass keine Wachstumsunterschiede auf den getesteten Medien (Abb. 3.17) erzielt wurden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Hefe die Hydrophobizität des Blattes verringert, so dass die Keimungsrate der Sporen auf der Oberfläche des Blattes vermindert ist. Möglich wäre auch eine Kombination unterschiedlicher Mechanismen, die eine erhöhte Resistenz gegenüber *B. cinerea* vermitteln, da Hefe über verschiedene Elicitoren verfügt. Auch eine Aktivierung des Sekundärstoffwechsels kann als Mechanismus an der Abwehr gegenüber *B. cinerea* beteiligt sein. Eine Verringerung der *B. cinerea* Infektionen kann nicht nur durch abgetötete Hefezellen erfolgen, sondern auch durch Applikation von saprophytischen Hefeisolaten (Elad et al., 1994). Hierbei kommt es zu einer antagonistischen Wirkung zwischen Hefe und einem pflanzenpathogenen Pilz, z.B. durch eine reduzierte Sporulation von *B. cinerea*, an Tomate und Bohne. Neben der Nahrungskonkurrenz kann auch die Aktivierung des Sekundärstoffwechsels als ein möglicher Mechanismus angesehen werden. Die Resistenz gegen *B. cinerea* wird vermutlich über andere Signaltransduktionswege aktiviert, die bisher in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, wie z.B. ROS.

Unabhängig von den aufgezeigten Ergebnissen durch Hefebehandlung zeigten Versuche, die von Thuerig et al. (2006a; 2006b) mit Präparationen aus *Penicillium* durchgeführt wurden, ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Resistenz in *A. thaliana* und die daran beteiligten Mechanismen. Der Pen-Elicitor ist ein wässriger Extrakt aus trockenem Myzel von *Penicillium chrysogenum* (ein sog. Beiprodukt aus der Herstellung von Penicillin). Ebenso wie für Hefe-Elicitor konnte für den Pen-Elicitor eine vermittelte Resistenz gegen *B. cinerea* in Mutanten des SA-Weges und des JA-Weges nachgewiesen werden; zusätzlich beim Pen-Elicitor aber auch des Ethylenweges. Der Schutz sowohl durch den Hefe-, als auch durch den Pen-Elicitor erfolgt über Signaltransduktionswege, die sich von den klassischen SA/NPR1 oder JA/ET-abhängigen Wegen unterscheiden und bisher ungeklärt sind. Ebenso wie Hefe hat Pen keinen direkten fungiziden Effekt, sondern schützt Pflanzen durch eine Aktivierung der Abwehrmechanismen.

Sowohl für die Elicitorpräparation aus *Penicillium* als auch für die Hefe ist noch ungeklärt, welche Komponente für die Elicitorwirkung verantwortlich ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass Hefe mehrere PAMPs enthält, weil Elicitoraktivitäten sowohl für Zellwandpräparationen aus Hefe als auch für Glykopeptide und Proteine beschrieben wurden, die als PAMPs wirken.

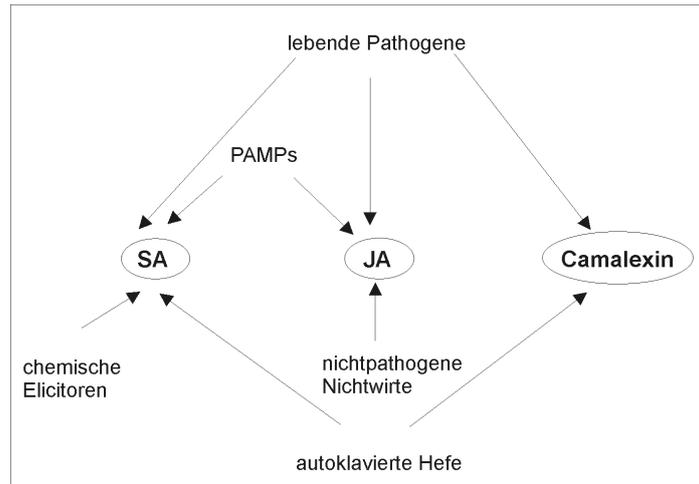


Abbildung 4.3: Vergleich der Aktivierung induzierter Abwehr in *A. thaliana* (verändert nach Raacke et al., 2006). Für die lebenden Pathogene wurden der virulente und avirulente Stamm von *P. syringae* sowie die Pilze *A. brassicicola* und *B. cinerea* (Govrin und Levine, 2002; Heck et al., 2003; Thomma et al., 2001), für die chemischen Elicitoren BTH (Benzo-Thiadiazol) (von Rad et al., 2005) und BABA (β -Aminobuttersäure) (Zimmerli et al., 2000), für die nichtpathogenen Mikroorganismen *P. fluorescence* (Verhagen et al., 2004) und *Serratia marcescens* 90-166 (Ryu et al., 2004) und für die PAMPs Flagellin (Gomez-Gomez et al., 1999) herangezogen.

In Abbildung 4.3 ist die Aktivierung von Abwehrmechanismen durch Hefe sowie durch Elicitoren und Mikroorganismen dargestellt. Welche Abwehrwege in der Pflanze aktiviert werden, ist abhängig davon, ob lebende Pathogene, chemische Elicitoren, nichtpathogene Mikroorganismen oder Hefe auf die Pflanze einwirken. Lebende Pathogene induzieren die größte Anzahl an Abwehrreaktionen. Beispielsweise induzieren virulente und avirulente Stämme von *P. syringae* und Pilze wie z.B. *A. brassicicola* und *B. cinerea*, ein komplexes Set aus Abwehrreaktionen, darunter eine Akkumulation von SA, JA und Camalexin (Thomma et al., 2001; Govrin und Levine 2002; Heck et al., 2003). Lebende Nichtpathogene und Nichtwirt-Mikroorganismen aktivieren hauptsächlich den JA-Weg (Ryu et al., 2004; Verhagen et al., 2004; Zimmerli et al., 2004). Eines der am besten untersuchten PAMPs ist das bakterielle Flagellin, das den SA- und JA-Weg in *A. thaliana* induziert, im Gegensatz zu Hefe aber nicht die Camalexinakkumulation (Gomez-Gomez et al., 1999). Chemische Elicitoren „primen“ oder aktivieren den SA-Weg, wobei BABA einen negativen Effekt auf eine Camalexin-Akkumulation ausübt (Zimmerli et al., 2000). Interessanterweise führt die Behandlung mit abgetöteter Bäckerhefe nicht zu gleichen Effekten wie eine Behandlung mit nichtpathogenen Mikroorganismen, die hauptsächlich den JA-Weg aktivieren. Die autoklavierte Bäckerhefe zeigt hingegen die größten Ähnlichkeiten zu chemischen Elicitoren und PAMPs (Abb. 4.3). In Übereinstimmung hiermit werden alle Hefe

induzierten Gene auch durch den chemischen Pflanzenaktivator Bion[®] induziert (von Rad et al., 2005).

Da durch Hefebehandlungen die Camalexingehalte in *A. thaliana* erhöht werden konnten, schließt sich eine interessante Fragestellung an, ob nicht auch eine erhöhte Akkumulation von Sekundärstoffen gefördert werden könnte, z.B. Resveratrol in Wein oder wichtige Inhaltsstoffe in Arzneipflanzen.

4.3 Weiterführende Arbeiten

4.3.1 Hefe-Elicitor

Die Nutzung eines Hefe-Elicitors kann in der Landwirtschaft den Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel mindern, da verschiedene Abwehrreaktionen aktiviert werden und eine Wirkung gegenüber verschiedenen Pathogenen besteht. Ein großer Vorteil der Hefe ist, dass es sich um einen billigen, nicht toxischen, biologisch abbaubaren Elicitor und um einen nichtpathogenen Mikroorganismus handelt. In das Konzept des integrierten Anbaus würde eine Hefeanwendung allerdings nur schwer einzugliedern sein, da Hefeapplikationen jeweils vor einer Infektion erfolgen müsste und nicht nach dem Schadschwellenprinzip durchzuführen wären. Außerdem ist kein vollständiger Schutz gegenüber Pathogenen möglich. Für den biologischen Anbau ist die Aktivierung der pflanzlichen Resistenz durch sog. Pflanzenstärkungsmittel eine praktikable Möglichkeit, Kulturen vor Pathogenen zu schützen. Eine mögliche Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse müsste auf wichtigen Kulturpflanzen getestet werden, weil sich beispielsweise die Hydrophobizität der Blattoberflächen unterscheidet und dadurch die Hefe unterschiedlich auf den Blättern anhaftet mit Auswirkungen auf die hefeabhängige Abwehr. Die Wirksamkeit der induzierten Resistenz ist unter Feldbedingungen von einer Vielzahl von Faktoren abhängig und nur schwer voraussagbar (Elmer und Reglinski, 2006). Durch die zunehmenden Kenntnisse über die pflanzliche Abwehr und die dazu erforderlichen Signalwege können Strategien für verbesserte Stresstoleranz und Pathogenresistenz entwickelt werden. Möglicherweise sind durch Elicitor eine Erhöhung der Biomasse der Pflanzen und ebenso eine Steigerung pharmazeutisch relevanter Sekundärstoffe möglich.

Für eine praktische Anwendung wäre es interessant zu wissen, welcher Teil des Hefe-Elicitors für die Wirkung auf Pathogene verantwortlich ist. Eine ausreichende Wirkung der Hefe-Zellwände konnte in den durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen

werden, so dass andere mögliche PAMPs, wie z.B. Glykopeptide und Proteine, auf ihre Wirkung untersucht werden könnten.

Der Wirkmechanismus von Hefe gegen *B. cinerea* konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, daher sind weiterführende Untersuchungen mit *A. thaliana* Mutanten aus anderen Signaltransduktionswegen, z.B. *ein2* aus dem ET-Weg oder *aba2-1* aus dem Abscisinsäure-Weg, notwendig. Eine direkte Hefewirkung auf *B. cinerea* konnte in Versuchen auf unterschiedlichen Medien ausgeschlossen werden (Abb. 3.17), daher wäre eine mögliche Veränderung der Hydrophobizität durch Hefe und die daraus möglicherweise resultierenden Einflüsse auf das Keimungsverhalten von *B. cinerea* Sporen zu untersuchen, in Anlehnung an *Erysiphe pisi* auf Blättern von *Pisium sativum* (Gniwotta et al., 2005).

4.3.2 Jasmonate in der Pflanze-Pathogen-Interaktion

In den *A. thaliana* Mutanten *dde2* und *opr3* belegten die Ergebnisse aus den Infektionsversuchen mit *B. cinerea* eine wichtige Funktion von OPDA in der Abwehr gegen den nekrotrophen Pilz. Weiterführende Versuche über die Wirkung von OPDA im Vergleich zu JA würden mit *dde2* und *opr3* Mutanten im gleichen WT-Hintergrund zu noch genaueren Ergebnissen führen.

Im Pilz ist die Funktion von JA noch unklar, da auch das Ausschalten des *Lox*-Gens zu keinen Veränderungen in der Pathogenität geführt hat. Möglicherweise ist trotz des Ausschaltens des *Lox*-Gens noch eine *Lox* Aktivität, an der andere Gene beteiligt sein können, im Pilz vorhanden. Interessant wäre die Untersuchung, ob es letztendlich zur Bildung von JA im Pilz kommt oder ob andere biologisch aktive Produkte gebildet werden.

Um eine mögliche Pathogenität von *F. graminearum* auf Pflanzen klären zu können, wäre die Bedeutung von JA im Pilz zu untersuchen. Eine Analyse auf JA und OPDA wäre nach verschiedenen Zeitpunkten durchzuführen. Interessant wäre die Klärung, ob weitere Oxylipine im Pilz aktiv sind. Da die JA-Biosynthese in den Pflanzen bis zur Synthese von OPDA in den Chloroplasten stattfindet (Abb. 1.3), Pilze aber keine Chloroplasten enthalten, wäre eine Klärung des Syntheseortes in *F. graminearum* wichtig.

Die Aktivierung der Abwehr in Weizen nach Infektionen mit *F. graminearum* ist bekannt (Anand et al., 2003; Li et al., 2001; Pritsch et al., 2000), während für *F. graminearum* Infektionen in *A. thaliana* bisher nur wenige Gene, z.B. *Npr1* und *Pr1* (Makandar et al., 2006) nachgewiesen wurden. Für *F. oxysporum* wurde an *A. thaliana* herausgefunden, dass sowohl *Thi2.1* (Epple et al., 1998), als auch *Npr1* (Berrocal-Lobo und Molina,

2004), an der Resistenz beteiligt sind. Daher wären Makroarray-Analysen interessant, um eine verstärkte Expression weiterer Gene herauszufinden, die in der Pflanze nach Infektionen mit *F. graminearum* induziert werden. Dazu sollte ein *F. graminearum*-Stamm mit geringer Pathogenität verwendet werden.

5. Zusammenfassung

Die Anwendung von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) als Elicitor wurde bisher in Zellkulturen, ebenso in Sojabohne und Gerste beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Elicitorwirkung von Hefe auf *A. thaliana* untersucht. Das Sprühen mit autoklavierter Bäckerhefe führte zu einem Anstieg des Phytoalexins Camalexin mit einem Maximum (54 nmol/g FG) am 5. Tag nach der Behandlung mit dem Elicitor.

Bei nachfolgenden Infektionen am 5. Tag nach Hefebehandlung mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 wurde eine Schutzwirkung detektiert, die beim Wildtyp Col-0 zu einer 3 bis 4fachen Verringerung des Bakterienwachstums im Vergleich zur Wasserbehandlung führte. Die Schutzwirkung setzte mit dem 5. Tag nach Hefebehandlung ein und hielt bis einschließlich dem 11. Tag an. Ein Schutz gegen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 war auch systemisch in nicht mit Hefe behandelten Blättern zu detektieren.

Infektionen mit *Botrytis cinerea* 5 Tage nach Hefebehandlung führten beim Wildtyp Col-0 zu Nekrosengröße, die nur 17 % der Nekrosengröße der mit Wasser behandelten Kontrolle betrug.

Veränderungen in der Genexpression 48 Stunden nach Hefebehandlung wurden in einer Microarray-Analyse (in Kooperation mit der GSF Neuherberg) ermittelt. Von rund 1400 Stress-responsiven Genen konnte eine Induktion von 6 Genen nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um Salicylsäure-abhängige Gene (*Pr1*, *Pr2* und *Pr5*), Gluthation-S-Transferasen (*Gst2* und *Gst11*) und eine UDP Glucosyltransferase. Die Erhöhung der Gene *Pr1* und *Pr2* deutet auf eine Aktivierung des Salicylsäure-Weges hin. Die Induktion der anderen Gene deutet auf eine Aktivierung der Detoxifizierung hin. Gene aus dem Jasmonsäure (JA)- und Ethylen-Weg wurden nicht induziert. Reprimiert wurde das Gen *Asa1*, das für eine JA-induzierte Antranilatsynthase kodiert. In Northernblot-Analysen wurden Gene auch zu früheren Zeitpunkten als in der Microarray-Analyse untersucht.

Für die Untersuchung, welche Signalwege für die Resistenz durch Hefebehandlung verantwortlich sind, wurden verschiedene Mutanten mit den korrespondierenden Wildtypen von *Arabidopsis thaliana* aus dem JA-Weg (*dde2*, *opr3* und *jin1*), aus dem Salicylsäure-Weg (*nahG* und *npr1*) und aus dem Camalexin-Weg (*cyp79B2/B3* und *pad3*) mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 oder *Botrytis cinerea* infiziert. Nach Infektionen mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 konnte nur in den Salicylsäure-Mutanten keine erhöhte Hefe-vermittelte Resistenz festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass Salicylsäure für den Schutzeffekt der Hefe gegenüber

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 notwendig ist. Bei den getesteten Wildtypen und den Mutanten aus dem JA- und Camalexin-Weg wurden in den mit Hefe vorbehandelten Pflanzen Schutzfaktoren gegen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 zwischen 2 und 5fach nachgewiesen. Bei Infektionen mit *Botrytis cinerea* wurde in allen getesteten Mutanten nach Hefebehandlung eine Schutzwirkung aufgezeigt (Schutzfaktoren von 3 bis 7). Das deutet darauf hin, dass weder JA, noch Salicylsäure oder Camalexin für die Schutzwirkung gegen *Botrytis cinerea* verantwortlich ist. Eine direkte hemmende Wirkung der Hefe auf das Wachstum des nekrotrophen Pilzes konnte durch Wachstumsversuche auf unterschiedlichen Medien ausgeschlossen werden.

In Versuchen mit den Mutanten *dde2* und *opr3* konnte nachgewiesen werden, dass *dde2*, die weder 12-Oxo-Phytodiensäure noch JA bilden kann, größere Läsionen nach *Botrytis cinerea* Infektionen ausbildet als der Wildtyp. Größere Läsionen zeigte auch *opr3*, die 12-Oxo-Phytodiensäure, aber keine JA bildet, die sich aber nicht signifikant vom Wildtyp unterschieden. Daraus lässt sich schließen, dass 12-Oxo-Phytodiensäure eine wichtige Rolle für die Abwehr gegenüber dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* spielt, wobei JA vermutlich zusätzlich zur Abwehr beiträgt.

Infektionen mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 führten bei beiden Mutanten zu einer geringeren Symptomausprägung als in den Wildtypen. Übereinstimmend mit den makroskopisch sichtbaren Symptomen zeigte die Mutante *dde2* ein mehr als 20fach geringeres Bakterienwachstum als der Wildtyp. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sich die Anwesenheit von 12-Oxo-Phytodiensäure und JA im Wildtyp negativ auf die Abwehr gegen das biotrophe Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 auswirkt.

In *Fusarium graminearum* konnte JA nachgewiesen werden. Ob es sich bei der JA um einen Pathogenitätsfaktor des Pilzes handelt, sollte durch Mutanten mit einem Defekt im Lipoxygenasegen untersucht werden. Infektionsversuche mit Lipoxygenase-Knockout-Mutanten und Stämmen mit komplementierter Lipoxygenase-Expression zeigten keine Unterschiede in der Symptomausprägung an Blüten und jungen Schoten von *Arabidopsis thaliana* im Vergleich zum Wildtyp-Pilz. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Lipoxygenase in *Fusarium graminearum* keine Rolle in der Pathogenität gegenüber *Arabidopsis thaliana* spielt.

6. Summary

In previous studies yeast-elicitors (*Saccharomyces cerevisiae*) were described as defense inducers in different cell cultures as well as in plants of soybean and barley. In this work a possible elicitor effect on *Arabidopsis thaliana* was analysed. After spraying with autoclaved bakers yeast, the phytoalexin camalexin increased in the plants and reached maximum level of 54 nmol/g fw five days after treatment.

Infection with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 five days after yeast treatment showed a protection effect which resulted in 3 to 4 fold less bacterial growth in the wild type Col-0. A protection was detectable between five and eleven days after yeast treatment. Protection was also systemic. Infection with *Botrytis cinerea* five days after yeast spraying showed a reduction in necrotic lesions to 17 % of water pre-treated plants.

Regulation of gene expression 48 hours after yeast treatment was assessed. In a cDNA array comprising 1,400 stress responsive genes (in cooperation with GSF Neuherberg) six genes were induced. Induction was evident for salicylic acid-responsive genes (*Pr1*, *Pr2* and *Pr5*), glutathion-S-transferases (*Gst1* and *Gst2*), and an UDP-glucosyl transferase. This regulation of gene expression indicated an activation of the salicylic acid pathway and of the detoxification system by yeast. Genes of the jasmonic acid (JA)- and ethylene pathway were not induced. The gene *Asa1* which encodes a JA-inducible antranilate synthase was down regulated.

With Northern blot analysis the results of the array analyses were verified and in addition earlier time points were analysed.

To investigate which signaling pathways are involved in the resistance after yeast treatment different *Arabidopsis thaliana* mutants were analysed. In the jasmonic acid pathway the mutant's *dde2*, *opr3* and *jin1* were examined, in the salicylic acid pathway *nahG* and *npr1* and in the camalexin biosynthesis *cyp79B2/B3* and *pad3*. The mutants in the salicylic acid pathway showed no yeast-mediated resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. This indicates that the salicylic acid pathway is necessary for the protection by yeast against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. In contrast, yeast pre-treatment resulted in a protection in mutants in the jasmonic acid and Camalexin pathways which was similar to the wild type. Upon infection with *Botrytis cinerea* after yeast pre-treatment a protection effect was detectable in all explored mutants (three to seven fold). This indicates that neither JA, nor salicylic acid nor camalexin is necessary for the protection against *Botrytis cinerea*. A direct inhibitory effect of yeast on the growth of the necrotrophic fungus can be excluded from growth tests on different plates.

Experiments with the *dde2* mutant which is not able to synthesize 12-oxo-phytodienoic acid and JA, and the *opr3* mutant which is able to accumulate 12-oxo-phytodienoic acid but not JA showed that after *Botrytis cinerea* infection *dde2* developed bigger lesions as the wild type. Lesion sizes were also bigger in *opr3* but not significant. These results suggest that 12-oxo-phytodienoic acid is important for the defense against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* while JA might additionally contribute.

Both mutants showed fewer symptoms after *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 infection as the corresponding wild types. In agreement with the symptom development, the bacterial growth of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in the mutant *dde2* was more than 20-fold lower than in the wild type. This result indicates that in the wild type 12-oxo-phytodienoic acid and JA negatively affect the defense against the biotrophic pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

JA was detected in *Fusarium graminearum*. In order to investigate if JA is important for pathogenicity of this fungus, mutants with a defect in the lipoxygenase gene were analysed. No difference in the symptom development after infection of flowers and young siliques of *Arabidopsis thaliana* with lipoxygenase-knockout-mutants or strains with complemented lipoxygenase expression in comparison to the wild type were detectable. These results indicated that the lipoxygenase gene in *Fusarium graminearum* is not necessary for the pathogenicity in *Arabidopsis thaliana*.

7. Literaturverzeichnis

- AbuQamar, S., Chen, X., Dhawan, R., Bluhm, B., Salmeron, J., Lam, S., Dietrich, R.A., Mengiste, T.** (2006). Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in *Arabidopsis* response to *Botrytis* infection. *The Plant Journal* 48, 28-44.
- Almeras, E., Stolz, S., Vollenweider, S., Reymond, P., Mene-Saffrane, L., Farmer, E.E.** (2003). Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 34, 205-216.
- Anand, A., Zhou, T., Trick, H.N., Gill, B.S., Bockus, W.W., Muthukrishnan, S.** (2003). Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany* 54, 1101-1111.
- Anderson, J.P., Thatcher, L.F., Singh, K.B.** (2005). Plant defence responses: conservation between models and crops. *Functional Plant Biology* 32, 21-34.
- Baier, R., Schiene, K., Kohring, B., Flaschel, E., Niehaus, K.** (1999). Alfalfa and tobacco cells react differently to chitin oligosaccharides and *Sinorhizobium meliloti* nodulation factors. *Planta* 210, 157-164.
- Basse, C.W. und Boller, T.** (1992). Glycopeptide elicitors of stress responses in tomato cells. *Plant Physiology* 98: 1239-1247.
- Bell, E. und Mullet, J.E.** (1993). Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology* 103, 1133-1137.
- Bell, E., Creelman, R.A., Mullet, J.E.** (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92, 8675-8670.
- Berger, S., Bell, E., Mullet, J.E.** (1996). Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of *AtVsp* in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology* 111, 525-531.
- Berger, S.** (2002). Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta* 214, 497-504.
- Berrocal-Lobo, M. und Molina, A.** (2004). Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17, 763-770.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z.-Q., Zenk, M.H.** (1995). The octadecanoid pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92, 4099-4105.
- Bohlmann, H.B., Vignutelli, A., Hilpert, B., Miersch, O., Wasternack, C., Apel, K.** (1998). Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene *Thi2.1*, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. *FEBS Letters* 43, 281-286.

- Boller, T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46, 189-214.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., Dong, X.** (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *The Plant Cell* 9, 1573-1584.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Butt, A., Mousley, C., Morris, K., Beynon, J., Can, C., Holub, E., Greenberg, J.T., Buchanan-Wallaston, V.** (1998). Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal* 16, 209-221.
- Büttner, B.** (2004). Untersuchungen zum Oxylin-Signaling in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität-Würzburg.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., Dong, X.** (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88, 57-63.
- Chang, C. und Shockey, J.A.** (1999). The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 2 (5), 352-358.
- Chen, X., Steed, A., Harden, C., Nicholson, P.** (2006). Characterization of *Arabidopsis thaliana-Fusarium graminearum* interactions and identification of variation in resistance among ecotypes. *Molecular Plant Pathology* 7(5), 391-403.
- Chester, K.S.** (1933). The problem of acquired physiological immunity in plants. *The Quarterly Review of Biology* 8, 275-324.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., Felix, G.** (2006). The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell* 18 (2), 465-476.
- Chrisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J.** (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124(4), 803-814.
- Christensen, A.B., Cho, B.H., Naesby, M., Gregersen, P.L., Brandt, J., Madriz-Ordenana, K., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H.** (2002). The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology* 3(3), 135-144.
- Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., Dong, X.** (1998). Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant *Arabidopsis cpr 6-1* mutant. *The Plant Cell* 10, 557-569.
- Clough, S.J., Fengler, K.A., Yu, I.C., Lippok, B., Smith, R.K., Bent, A.F.** (2000). The *Arabidopsis dnd1* 'defense, no death' gene encodes a mutated cyclic

nucleotide-gated ion channel. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97, 9323-9328.

Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S., Kohler, A. (2001). Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology* 107, 113-119.

Conrath, U., Pieterse, C. M.J., Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7(5), 210-216.

Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.-A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., Mauch-Mani, B. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19(10), 1062-1071.

Dangl, J.L. und Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens are integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.

Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T. Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247-1250.

Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I., Wasternack, C. (2006). Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* – enzymes, products, regulation. *Plant Biology* 8, 297-306.

Denby, K.J., Kumar, P., Kliebenstein, D.J. (2004). Identification of *Botrytis cinerea* susceptibility loci in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 38, 473-486.

Devoto, A. und Turner, J.G. (2005). Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiologia Plantarum* 123, 161-172.

Dhondt, S., Gouzerh, G., Müller, A., Legrand, M., Heitz, T. (1995). Spatiotemporal expression of patatin-like lipid acyl hydrolases and accumulation of jasmonates in elicitor-treated tobacco leaves are not affected by endogenous levels of salicylic acid. *The Plant Journal* 32, 749-762.

Dixon, R.A. (1986). The phytoalexin response: Elicitation, signalling and the control of host gene expression. *Biological Reviews* 61, 239-291.

Dong, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 316-323.

Durner, J., Gow, A.J., Stamler, J.S., Glazebrook, J. (1999). Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 96(25), 14206-14207.

Ebel, J. und Scheel, D. (1997). Signals in host-parasite interactions. *The Mycota; Vol V. Plant Relationships, PartA.* G.C. Carroll, Tudzynski, P. Berlin, Springer Verlag: 85-105.

Edwards, R. und Dixon, R. (1991). Isoflavone o-methyltransferase activities in elicitor-treated cell suspension cultures of *Medicago sativa*. *Phytochemistry* 30, 2597-2606.

- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D.E., Roitsch, T.** (1997). Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *The Plant Cell* 9, 1825-1841.
- Elad, Y., Kohl, J., Fokkema-Nyckle, J.** (1994). Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology* 100, 315-336.
- Elmer, P.A.G. und Reglinski, T.** (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* 55, 155-177.
- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H.** (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* 9, 509-520.
- Epple, P., Vignutelli, A., Apel, K., Bohlmann, H.** (1998). Differential induction of the *Arabidopsis thaliana* *Thi2.1* gene by *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthiolae*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11, 523-529.
- Farmer, E.E., Almeras, E., Krishnamurthy, V.** (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 372-378.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive detection system for the most conserved domain of the bacterial flagellin. *The Plant Journal* 18(3), 265-276.
- Ferrari, S., Plotnikova, J.M., Lorenzo, G.D., Ausubel, F.M.** (2003). *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *The Plant Journal* 35, 193-205.
- Feussner, I., Hause, B., Vörös, K., Parthier, B., Wasternack, C.** (1995). Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv *Salome*). *The Plant Journal* 7, 949-957.
- Feussner, I. und Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53, 275-297.
- Feys, B.J.F., 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. *The Plant Cell* 6, 751-759.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9, 275-296.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J.** (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261, 754-756.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A.** (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 7, 711-724.

- Genoud, T. und Metraux, J.-P.** (1999). Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network. *Trends in Plant Science* 4, 503-507.
- Glawischmig, E., Hansen, B.G., Olsen, C.E., Halkier, B.A.** (2004). Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101, 8245-8250.
- Glazebrook, J. und Ausubel, F.M.** (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 8955-8959.
- Glazebrook, J.** (1997). Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics* 31, 547-569.
- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I.R., Holub, E.B., Hammerschmidt, R., Ausubel, F.M.** (1997). Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that *PAD4* encodes a regulatory factor and that four *PAD* genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* 146, 381-392.
- Glazebrook, J.** (1999). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 2(4), 280-286.
- Glazebrook, J.** (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* – 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 301-308.
- Glazebrook, J. und Ausubel, F.M.** (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 8955-8959.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 205-227.
- Gniwotta, F., Vogg, G., Gartmann, V., Carver, T.L.W., Riederer, M., Jetter, R.** (2005). What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of pea leaf cuticular waxes. *Plant Physiology*, 139, 519-530.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G., Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 18(3), 277-284.
- Gomez-Gomez, L. und Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 5, 1003-1011.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., Boller, T.** (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13, 1155-1163.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J.** (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* 8, 629-643.

- Govrin, E.M. und Levine, A.** (2002). Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant Molecular Biology* 48, 267-276.
- Gundlach, H., Mueller, M.J., Kutchan, T. M., Zenk, M.H.** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89(6), 2389-2393.
- Gupta, V., Willits, M.G., Glazebrook, J.** (2000). *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13, 503-511.
- Hahn, M.G., und Albersheim, P.** (1978). Host-pathogen interactions. *Plant Physiology* 62, 107-111.
- Hammerschmidt, R., Métraux, J.-P., van Loon, L.C.** (2001). Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on induced resistance to plant diseases, Corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology* 107, 1-6.
- Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D.G.** (1994). Incomplete dominance of tomato *Cf* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 7, 58-70.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580 .
- Hansen, C.H., Du, L., Naur, P., Olsen, C.E., Axelsen, K.B., Hick, A.J., Pickett, J.A., Halkier, B.A.** (2001). Cyp83B1 is the oxime-metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 24790-24796.
- Hauck, P., Thilmony, R., He, S.Y.** (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100, 8577-8582.
- He, S.Y., Nomura, K., Whittam, T.S.** (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1694, 181-206.
- Heath, M.C.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 315-319.
- Heck, S., Grau, T., Buchala, A., Métraux, J.P., Nawrath, C.** (2003). Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* pv. *tomato* interaction. *The Plant Journal* 36, 342-352.
- Heil, M. und Kost, C.** (2006). Priming of indirect defences. *Ecology Letters* 9, 813-817.
- Hilpert, B., Bohlmann, H., op den Camp, R., Przbyla, D., Miersch, O., Buchala, A., Apel, K.** (2001). Isolation and characterization of signal transduction mutants of

- Arabidopsis thaliana* that constitutively activate the octadecanoid pathway and form necrotic microlesions. *The Plant Journal* 26, 435-446.
- Howe, G.A.** (2001). Cyclopentenone signals for plant defense: remodeling the jasmonic acid response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98(22), 12317-12319.
- Howe, G.A. und Schillmiller, A.L.** (2002). Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 230-236.
- Ichihara, A., Shiraishi, K., Sato, H., Sakamura, S., Nishiyama, K., Sakai, R., Furusaki, A., Matsumoto, T.** (1977). The structure of coronatine. *Journal of the American Chemical Society* 99, 636-637.
- Jakobek, J.L. und Lindgren, P.B.** (1993). Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with induction of the hypersensitive response. *The Plant Cell* 5, 49-56.
- Jones, D.A., und Jones, J.D.G.** (1996). The roles of leucine rich repeats in plant defences. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology* 24, 90-167.
- Kagan, I.A. und Hammerschmidt, R.** (2001). Pitfalls in screening for camalexin-deficient mutants: effects of kinetics, pathogen choice and inoculum concentration on apparent camalexin accumulation of wild-type (Columbia) and *pad2 Arabidopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59, 119-127.
- Keen, N.T.** (1975). Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity of plants? *Science* 187, 74-75.
- Kliebenstein, D.J., Rowe, H.C., Denby, K.J.** (2005). Secondary metabolites influence *Arabidopsis/Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant Journal* 44, 25-36.
- Kloek, A.P., Verbsky, M.L., Sharma, S.B., Schoelz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F., Kunkel, B.N.** (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *The Plant Journal* 26(5), 509-522.
- Klüsener, B., Young, J.J., Murata, Y., Allen, G.J., Mori, I.C., Hugouvieux, V., Schroeder, J.I.** (2002). Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiology* 130, 2152-2163.
- Kombrink, E. und Schmelzer, E.** (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107, 69-78.
- Kuc, J.** (1983). Induced systemic resistance in plants to diseases caused by fungi and bacteria. In: Bailey JA, Deverall, B.J. (eds) *The dynamics of plant defense*. Academic Press, New York, 255-271.
- Kunkel, B.N. und Brooks, D.M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 325-331.

- Lam, E., Kato, N., Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411, 848-853.
- Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I.H., Kunkel, B.N.** (2006). The *Arabidopsis thaliana* *JASMONATE INSENSITIVE 1* gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(7), 789-800.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S. Ryals, J.** (1995). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8, 863-870.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., Ryals, J.** (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The Plant Journal* 10, 71-82.
- Lee, H.-I., Leon, J., Raskin, I.** (1995). Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92, 4076-4079.
- Li, W.L., Faris, J.D., Muthukrishnan, S., Liu, D.J., Chen, P.D., Gill, B.S.** (2001). Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. *Theoretical and Applied Genetics* 102, 353-362.
- Liavonchanka, A. und Feussner, I.** (2006). Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology* 163, 348-357.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., Solano, R.** (2004). *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16, 1938-1950.
- Lorenzo, O. und Solano, R.** (2005). Molecular players regulating the jasmonate signaling network. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 532-540.
- Lyon, G.D., Reglinski, T., Newton, A.C.** (1995). Novel disease control compounds: the potential to 'immunize' plants against infection. *Plant Pathology* 44, 407-427.
- Lyon, G.D., und Newton, A.C.** (1997). Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? *Plant Pathology* 46, 636-641.
- Maier, F.J., Malz, S., Lösch, A.P., Lacour, T., Schäfer, W.** (2005). Development of a highly efficient gene targeting system for *Fusarium graminearum* using the disruption of a polyketide synthase gene as a visible marker. *FEMS Yeast Research* 5, 653-662.
- Makandar, R., Essig, J.S., Schapaugh, M.A., Trick, H.N., Shah, J.** (2006). Genetically engineered resistance to Fusarium Head Blight in wheat by expression of *Arabidopsis* NPR1. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19, 123-129.
- McConn, M., und Browse, J.** (1996). The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *The Plant Cell* 8(3), 403-416.

- McConn, J., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E., Browse J.** (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 94, 5473-5477.
- McDowell, J.M. und Dangl, J.F.** (2000). Singal transduction in the plant immune response. Trends in Biochemical Sciences 25, 79-82.
- Menke, F.L.H., Parchmann, S., Mueller, M.J., Kijne, J.W., Memelink, J.** (1999). Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. Plant Physiology 119, 1289-1296.
- Mert-Türk, F., Bennett, M.H., Mansfield, J.W., Holub, E.B.** (2003). Camalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* following abiotic elicitation or with virulent or avirulent *Hyaloperonospora parasitica*. Physiological and Molecular Plant Pathology 62, 137-145.
- Meyer, A., Pühler, A., Niehaus, K.** (2001). The lipopolysaccarides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. Planta 213, 214-222.
- Miersch, O., Schneider, G., Sembdner, G.** (1991). Hydroxylated jasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. Phytochemistry 30, 4049-4051.
- Miersch, O., Bohlmann, H., Wasternack, C.** (1999). Jasmonates and related compounds from *Fusarium oxysporum*. Phytochemistry 50, 517-523.
- Mithöfer, A., Maitrejean, M., Boland, W.** (2005). Structural and biological diversity of cyclic octadecanoids, jasmonates, and mimetics. Journal of Plant Growth Regulation 23, 170-178.
- Montillet, J.L., Chamnongpol, S., Rustérucchi, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J.-P., Battesti, C., Inzé, D., van Breusegem, F., Triantaphylidès, C.** (2005). Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. Plant Physiology 138(3), 1516-1526.
- Morris, S.W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C.C., Frederiksen, R.A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S., Uknes, S.** (1998). Induced resistance responses in maize. Molecular Plant Microbe Interactions 11, 643-658.
- Müller, K.O. und Börger, H.** (1941). Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*-Resistenz der Kartoffel. Arb. Biolog. Anstalt (Reichsanst.) Berlin 23, 189-231.
- Nawrath, C. und Metraux, J.-P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. The Plant Cell 11(8), 1393-1404.
- Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., Ohashi, Y.** (1998). Antagonistic effects of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related protein genes in wounded mature tobacco leaves. Plant Cell Physiology. 39, 500-507.

- Nickstadt, A., Thomma, B.P.H.J., Feussner, I., Kangasjärvi, J., Zeier, J., Loeffler, C., Scheel, D., Berger, S.** (2004). The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Molecular Plant Pathology* 5(5), 425-434.
- Nürnberg, T.** (1999). Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Science* 55, 167-182.
- Oliver, R.P. und Ipcho, S.V.S.** (2004). *Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology* 5(4), 347-352.
- Otte, O. und Barz, W.** (2000). Characterization and oxidative in vitro cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls. *Phytochemistry* 53, 1-5.
- Parchmann, S., Gundlach, H., Mueller, M.J.** (1997). Induction of 12-Oxo-Phytodienoic Acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiology* 115, 1057-1064.
- Park, J.-H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., Feyereisen, R.** (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal* 31(1), 1-12.
- Pauw, B., van Duijn, B., Kijne, J.W., Memelink, J.** (2004). Activation of the oxidative burst by yeast elicitor in *Catharanthus roseus* cells occurs independently of the activation of genes involved in alkaloid biosynthesis. *Plant Molecular Biology* 55, 797-805.
- Pieterse, C.M.J., v. Wees, S.C.M., Hoffland, E., van Pelt, J.A., van Loon, L.C.** (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell* 8, 1225-1237.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C.** (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10(9), 1571-1580.
- Pieterse, C.M.J. und van Loon, L.C.** (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4(2), 52-58.
- Pieterse, C.M.J., Ton, J., van Loon, L.C.** (2001). Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet* 3, 1-8.
- Preston, G.M.** (2000). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular Plant Pathology* 1(5), 263-275.
- Prins, T.W., Tudzynski, P., von Tiedemann, A., Tudzynski, B., ten Have, A., Hansen, M.E., Tenberge, K., van Kan, J.A.L.** (2000). Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Pritsch, C., Muehlbauer, G.J., Bushnell, W.R., Somers, D.A., Vance, C.P.** (2000). Fungal development and induction of defense response genes during early

- infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13, 159-169.
- Quidde, T., Osbourn, A.E., Tudzynski, P.** (1998). Detoxification of alpha-tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52, 151-165.
- Raacke, I.C., van Rad, U., Mueller, M.J., Berger, S.** (2006). Yeast increases resistance in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by salicylic acid-dependent as well as –independent mechanisms. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19(10), 1138-1146.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E.I., Stevens, C.V., Smagghe, G., Steurbaut, W.** (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4(6), 1457-1465.
- Radman, R., Saez, R., Bucke, C., Keshavarz, T.** (2003). Review: Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 37, 91-102.
- Reglinski, T., Lyon, G.D., Newton, A.C.** (1993). Lettuce: a non-toxic crop protection system for lettuce (and other vegetable crops). Petersfield, Hants: Horticultural Development Council Project Report PV/FV135.
- Reglinski, T., Newton, A.C., Lyon, G.D.** (1994). Assessment of the ability of yeast-derived resistance elicitors to control barley powdery mildew in the field. *Journal of Plant Diseases and Protection* 101, 1-10.
- Reichard, U., Hung, C.-Y., Thomas, P. W., Cole, G. T.** (2000). Disruption of the gene which encodes a serodiagnostic antigen and chitinase of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Infection and Immunity* 68, 5830–5838.
- Repka, V., Fischerova, I., Silharova, K.** (2001). Biological activity of the elicitor released from mycelium of a grapevine isolate of the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Vitis* 40, 205-212.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E.E.** (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12, 707-720.
- Rogers, E.E., Glazebrook, J., Ausubel, F.M.** (1996). Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions. *Molecular Plant Microbe Interactions* 9, 748-757.
- Rogers, E.E. und Ausubel, F.M.** (1997). *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in *PR-1* gene expression. *The Plant Cell* 9, 305-316.
- Ross, A.F.** (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14, 340-358.
- Rostas, M., Ton, J., Mauch-Mani, B., Turlings, T.C.J.** (2006). Fungal infection reduces herbivore-induced plant volatiles of maize but does not affect naive parasitoids. *Journal of Chemical Ecology* 32, 1897-1909.

- Royo, J., Vancanneyt, G., Perez, A.G., Sanz, C., Störmann, K., Rosahl, S., Sanchez-Serrano, J.J.** (1996). Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *Journal of Biological Chemistry* 271, 21012-21019.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M.D.** (1996). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Ryu, C.-M., Murphy, J.F., Mysore, K.S., Kloepper, J.W.** (2004). Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against *Cucumber mosaic virus* by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *The Plant Journal* 39, 381-392.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.).
- Sanders, P.M., Lee, P.Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weiler, E.W., Goldberg, R.B.** (2000). The *Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *The Plant Cell* 12, 1041-1061.
- Schaller, F. und Weiler, E.W.** (1997). Molecular cloning and characterization of 12-Oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signaling pathway from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 272(44), 28066-28072.
- Scheidle, H., Gross, A., Niehaus, K.** (2005). The lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti lipopolysaccharides* is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytologist* 165, 559-565.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., Manners, J.M.** (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97, 11655-11660.
- Schönbeck, F., Steiner, U., Kraska, T.** (1993). Induced resistance: criteria, mechanisms, practical application and estimation. *Journal of Plant Disease and Protection* 100(5), 541-557.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y. W., Hwang, I., Lee, J.S., Choi, Y.D.** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98, 4788-4793.
- Sesan, T., Oprea, M., Podosu Cristescu, C.A., Tica, C., Oancea, F.** (1999). Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine with *Trichoderma* spp. and *Saccaromyces chevalieri*. *Bulletin of the Polish Academy of Biological Sciences* 47, 197-205.
- Shulaev, V., Leon, J., Rashin, I.** (1995). Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *The Plant Cell* 7, 1691-1701.
- Siegrist, J., Glenewinkel, D., Kollé, C., Schmidtke, M.** (1997). Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens *Journal of Plant Disease and Protection* 104, 599-610.

- Skadsen, R.W. und Hohn, T.M.** (2004). Use of *Fusarium graminearum* transformed with *gfp* to follow infection patterns in barley and *Arabidopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64, 45-53.
- Sosa-Alvarez, M., Madden, L.V., Ellis, M.A.** (1995). Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. *Plant Disease* 79, 609-615.
- Stakman, E.C.** (1915). Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *Journal of Agricultural Research* 4, 193-200.
- Staswick, P.E., Su, W., Howell, S.H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89, 6837-6840.
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., Lehmann, C.C.** (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *The Plant Journal* 15(6), 747-754.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., Rowe, M.L.** (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity of jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell* 14(6), 1405-1415.
- Stelmach, B.A., Müller, A., Hennig, P., Laudert, D., Andert, L., Weiler, E.W.** (1998). Quantitation of the octadecanoid 12-Oxo-Phytodienoic Acid, a signalling compound in plant mechanotransduction. *Phytochemistry* 47(4), 539-546.
- Stintzi, A. und Browse, J.** (2000). The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97(19), 10625-10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., Farmer, E.E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98, 12837-12842.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U.B., Howe, G.A., Weiler, E.W., Amrhein, N., Macheroux, P., 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. *The Plant Journal* 32, 585-601.
- Sun, W., Dunning, F.M., Pfund, C., Weingarten, R., Bent, A.F.** (2006). Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis* FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *The Plant Cell* 18, 764-779.
- Suzuki, H., Reddy, M.S.S., Naoumkina, M., Aziz, N., May, G.D., Huhman, D.V., Summer, L.W., Blount, J.W., Mendes, P., Dixon, R.A.** (2005). Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* 220, 696-707.

- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K., Shibata, D., Kobayashi, Y., 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, 1268-1283.
- Thaler, J.S., Owen, B., Higgins, V.J.** (2004). The role of jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* 135, 530-538.
- Thatcher, L.S., Anderson, J.P., Singh, K.B.** (2005). Plant defence responses: what have we learned from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology* 32, 1-19.
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A.K. Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Roitsch, T., Mueller, M.J.** (2003). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *The Plant Journal* 34, 363-375.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F.** (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defence-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95, 15107-15111.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Tierens, K.F. Broekaert, W.F.** (1999a). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 121, 1093-1102.
- Thomma, B.P.H.J., Nelissen, I., Eggermont, K., Broekaert, W.F.** (1999b). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* 19(2), 163-171.
- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W., Cammue, B.P.A.** (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* 13, 63-68.
- Thompson, J.R. und Latorre, B.A.** (1999). Characterization of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile using RAPD-PCR. *Plant Disease* 83, 1090-1094.
- Thuerig, B., Binder, A., Boller, T., Guyer, U., Jiménez, S., Rentsch, C., Tamm, L.** (2006a). An aqueous extract of the dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* induces resistance in several crops under controlled and field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 114, 185-197.
- Thuerig, B., Felix, G., Binder, A., Boller, T., Tamm, L.** (2006b) An extract of *Penicillium chrysogenum* elicits early defense-related responses and induces resistance in *Arabidopsis thaliana* independently of known signalling pathways. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67, 180-193.
- Thulke, O. und Conrath, U.** (1998). Salicylic acid has a dual role in the activation of defense-related genes in parsley. *The Plant Journal* 14, 35-42.
- Tierens, K.F., Thomma, B.P., Bari, R.P., Garmier, M., Eggermont, K., Brouwer, M., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., Cammue, B.P.** (2002). *Esa1*, an *Arabidopsis* mutant with enhanced susceptibility to a range of necrotrophic

fungal pathogens, shows a distorted induction of defense responses by reactive oxygen generation compounds. *The Plant Journal* 29, 131-140.

- Ton, J., Davison, S., van Wees, S.C.M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J.** (2001). The *Arabidopsis* *ISR1* locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiology* 125, 652-661.
- Ton, J., van Pelt, J.A., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J.** (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 15, 27-34.
- Truman, W., Bennett, M.H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., Grant, M.** (2007). *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104, 1075-1080.
- Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R., Somerville, S.C.** (1992). Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiology* 98, 1304-1309.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenco, A., Ward, E., Ryals, J.** (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 4, 645-656.
- Urban, M., Daniels, S., Mott, E., Hammond-Kosack, K.** (2002). *Arabidopsis* is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *The Plant Journal* 32, 961-974.
- van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., Ton, J.** (2006). Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103, 5602-5607.
- van Kan, J.A.L.** (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11, 247-253.
- van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V.** (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12, 245-264.
- van Loon, L.C.** (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103, 753-765.
- van Loon, L.C. und van Strien, E.A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 85-97.
- van Wees, S.C.M., de Swart, E.A.M., van Pelt, J.A., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J.** (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97(15), 8711-8716.

- Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.S., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J.** (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17, 895-908.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kesseman, H., Ryals, J.** (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *The Plant Cell* 6(7) 959-965.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R., ten Hoopen, H.J.G., Memelink, J.** (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters* 21, 467-479.
- Vick, B.A. und Zimmerman, D.C.** (1984). Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology* 75, 458-461.
- Vick, B.A.** (1993). Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway. In: (Moore, J., T.S., Ed.) *Lipid Metabolism in Plants*. CPC Press, London, 167-191.
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J., Browse, J.** (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95(12), 7209-7214.
- von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K., Keller, B.** (2002). The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the *ALLENE OXIDE SYNTHASE* gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* 216, 187-192.
- von Rad, U., Mueller, M.J., Durner J.** (2005). Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by microarray technology. *New Phytologist* 165, 191-202.
- Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F., Staskawicz, B.J.** (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Cell* 3, 49-59.
- Weber, H., Vick, B.A., Farmer, E.E.** (1997). Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94, 10473-10478.
- Weber, H.** (2002). Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science* 7(5), 217-223.
- Weiler, E. W., Kutchan, T. M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U., Bublitz, F.** (1994). The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Letters*. 345, 9-13.
- Weiss, U. und Edwards, J.M.** (1980). *The biosynthesis of aromatic compounds*. New York/Chichester: Willey-Interscience, 728.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. *Nature* 414, 562-565.

- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., Turner, J.G.** (1998). COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280, 1091-1094.
- You, I.-S., Ghosal, D., Gunsalus, I.C.** (1991). Nucleotide sequence analysis of the *Pseudomonas putida* PpG7 salicylate hydroxylase gene (*nahG*) and its 3'-flanking region. *Biochemistry* 30(6), 1635-1641.
- Zeier, J., Pink, B., Müller, M.J., Berger, S.** (2004). Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta* 219, 673-683.
- Zhao, J., und Last, R.L.** (1996). Coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 8(12), 2235-2244.
- Zhao, J., Williams, C.C., Last, R.L.** (1998). Induction of *Arabidopsis* tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor. *The Plant Cell* 10, 359-370.
- Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J., Celenza, J.L.** (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & Development* 16(23), 3100-3112.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Métraux, J.-P., Mauch-Mani, B.** (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97(23), 12920-12925.
- Zimmerli, L., Métraux, J.-P., Mauch-Mani, B.** (2001). β -aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 126(2), 517-523.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428, 764-467.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125, 749-760.

8. Anhang

8.1 *Fusarium graminearum* genomische LOX Sequenz

atgtctgcagttgccagtcacgtgtcccaccagggtccaagctggactcgatctgagctctggactcgagcacaatatcgaccacg
 atcctctgaggctctgggacaaggggtcttcttaatgagcttctcaagcaaggtattgcactcagcactaatgaaaacggaactcttga
 cggagaactgttgcggacgaaggtctcaagaagggatctacaaggggtaccagactggccttgactgagatctacagcattctgga
 agatgctgctgtatcccatttggataagcgcggctatgagccaatcttctgtcaaaagggagcttgactgaagaaacgcatctatca
 atggagcgcggaactgacggctatcctctcacttgaaggtgatgtaatgatgaagccaacctcccgtgacgagcgcaaaa
 gcaagccaggctccgctagatcagagggagtggacaaatcttggatgcaagaaacggccttggatccaagattgacaggcag
 ttctattcattatcccaaggatctgaccacgagaatactcttacaaggtcctactcttggcagctgagaagttcaacaaggctc
 agttcccaaagactgatggcgacgctccaaccaggataacctcaacaaggcgggatctatgaagggcggtaacatcggcg
 agtatgacgactggtactctgacgcccgggtcggccagcagcactcagcgggtcaacccagcactatcgagactgctcccagg
 acaagatcaaggagtatatcagcgaagcccagaagcaagcctcgacaaaagtgaaaggcaattcttgaggatggaaggacattct
 tatccaagactattcctactcggagaggctaccggcgctaccaatgaacagatttccagaacacgggtgacgaactcaagggtaca
 acaccaactgaaagactactagccgatagcgtgcccctctgctgtatcttccagcttcacgaggatggacgactcaccggtggc
 tatcacactcgaactaaaaggttactggacaactccatcacatcttcaaccggaagctctctccagacgacacttgcgatattgctg
 agaaggaggattggccttgagatacggcaagactgttctcaaacgctgactggcgagacacgaggtcgccactcatctgtcg
 atacgcacatgatcgaggaagccattatcgtcgaacaaaccgaatcatccctgaaggcgaactcctgtacgagattctagcccc
 attggttagaaccttcttgaatgctgcccacgcaagctcctggctccagggtcattgagagaatcgctggttggaccaacgag
 ccttctctgattcaagggtacaatgctttaaagctgattgactggtcacaagaactcaactccaggacaagtacatcccaac
 gatctcaagaagcgtggcttcgacatcaagggagacaagagtggcaagtacaagaactaccctacgccaacgatatgtacctgctt
 tgggggatcatccgcaacttggtaagaccgtgattgagctcagtagacacagaccagcgtcgttcagaggatccttacattggcgg
 ctggtgcaaggagattcagaccaatggtcagatcccaacggttcccacatcaccactgttgaacagctatcgacgctgctaccatg
 tgcattccacacagcttcggccacaacacactgctgcaactatctcaggactattactacagcttccagccaagccacctgctctc
 tgtacgcccctgcccaggacctcagcgtctcagggctacacagagaaggacctcactgcagctctgctatcggtaccgaggat
 atgaagtgaaggactggcttctggcggcagttgcccagctactgagctacaaggccagcaagactacaacctgattacctac
 gccaaagtcgctgtacaatgtcaacaagaaccgtactatcactgaaaacaccaagttcaactgcaagactatcaagaaggctgctgc
 cgattctacagctatctcaagagcgtggagtggagttgagaactatcaaggacagactgcaggcactgttgagtatcctgttct
 gcagccagagaccactgccatttcaatftaatctag

Abbildung 8.1: *Fusarium graminearum* Sequenz des *Lox*-Gens. Die Primersequenz ist schwarz hervorgehoben mit unterstrichener vollständiger *Bgl*II-Schnittstelle im oberen Bereich, mit unterstrichener halber *Bgl*II-Schnittstelle im unteren Bereich; die *Eco*RV-Schnittstelle ist grau hinterlegt.

Primer für Klonierung in den Vektor pAN7-1:

Forward: 5' agatctacagcattctggaagatg 3'
 cagcagctgagatctacagcattctgg

Reverse: halbe *Bgl*II-Schnittstelle enthalten
 5' tcttcggttgaagatg 3'
 + *Bgl*II, + *Pvu*II, +3 NT
 5' cagcagctgagatctcggttgaagatg 3'

8.2 Sequenzbereich des Konstruktes mit dem Lox-Fragment in pAN7-1 mittels

Strategie 1

```
CGAGACGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTACATTAATCAGCTG
GCACGACAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTA
GCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA
ATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGAATCCCTTGT
ATCTCTACACACAGGCTCAAATCAATAAGAAGAACGGTTCGTCTTTTTTCGTTTATATCTTGC
ATCGTCCCAAAGCTATTGGCGGGATATTCTGTTTGCAGTTGGCTGACTTGAAGTAATCTCT
GCAGATCTTCCGTTGAAGATG
```

Abbildung 8.2: Nukleotidsequenz des pAN7-1 Vektors mit *Fusarium graminearum* Lox-Gen in *Bgl*II-Site (Strategie 1). Die Primersequenz (das Lox-Gen ist umgedreht inseriert) ist schwarz hervorgehoben, die erste *Eco*RV-Site ist grau hinterlegt (die zweite *Eco*RV-Site folgt nach weiteren 120 Bp), die *Bgl*II-Site wurde unterstrichen. Der Sequenzbereich vor dem Primer gehört zu dem Vektor pAN7-1.

Query	57	TGCTGTATCCCATTTTGATAAGCGCGGCTATGAGCCAATCTTTCCTGTCAAAGGGAGCT
116		
Sbjct	273	TGCTGTATCCCATTTTGATAAGCGCGGCTATGAGCCAATCTTTCCTGTCAAAGGGAGCT
332		
Query	117	TGACTTGAAGAAACGCATCTATCAATGGAGCGACGGAAGTACGCGCTATCCTCCTCACTT
176		
Sbjct	333	TGACTTGAAGAAACGCATCTATCAATGGAGCGACGGAAGTACGCGCTATCCTCCTCACTT
392		
Query	177	GAAGGTTGATGGTAATGATGAAGCCAACCTCCCCGCTGACGAGCGACAAAGCAAGCCAGG
236		
Sbjct	393	GAAGGTTGATGGTAATGATGAAGCCAACCTCCCCGCTGACGAGCGACAAAGCAAGCCAGG
452		
Query	237	CTCCGCTAGATCAGAGGGAGTTGGACAAATCTTTGATATGCAAGAAACGGCCTTTGTATC
296		
Sbjct	453	CTCCGCTAGATCAGAGGGAGTTGGACAAATCTTTGATATGCAAGAAACGGCCTTTGTATC
512		
Query	297	CAAGATTGCACAGGCAGTTTCATTTCATTATCCCCAAGGATATCGACCACGAGAATACTCC
356		
Sbjct	513	CAAGATTGCACAGGCAGTTTCATTTCATTATCCCCAAGGATATCGACCACGAGAATACTCC
572		
Query	357	TTACAAAGGTCCTACTCTTGCCGACGTTGAGAAGTTCAACAAGGCTCAGTTCCCAAAGAC
416		
Sbjct	573	TTACAAAGGTCCTACTCTTGCCGACGTTGAGAAGTTCAACAAGGCTCAGTTCCCAAAGAC
632		

8. Anhang

```
Query 417 TGATGGCGACGCCTCCAACCAGGATAACCTCAACAAGGCCGCGGATATCATGAAGGGCCG
476
      |||
Sbjct 633 TGATGGCGACGCCTCCAACCAGGATAACCTCAACAAGGCCGCGGATATCATGAAGGGCCG
692

Query 477 TAACATCGGCGAGTATGACGACTGGTACTCTGACGCCCGGTTGCCCCAGCAGCACTTCAG
536
      |||
Sbjct 693 TAACATCGGCGAGTATGACGACTGGTACTCTGACGCCCGGTTGCCCCAGCAGCACTTCAG
752

Query 537 CGGTGTCAACCCAGCACTATCGAGACTGCTTCCCAGGACAAGATCAAGGAGTATATCAG
596
      |||
Sbjct 753 CGGTGTCAACCCAGCACTATCGAGACTGCTTCCCAGGACAAGATCAAGGAGTATATCAG
812

Query 597 CGAAGCCCAGAAGCAAGGCCTCGACAAAGTGAAGGCAATTCTTGAGGATGGAAAGGACAT
656
      |||
Sbjct 813 CGAAGCCCAGAAGCAAGGCCTCGACAAAGTGAAGGCAATTCTTGAGGATGGAAAGGACAT
872

Query 657 TCTTATCCAAGACTATTCTACTTCCGAGAGGCTACCGGCGCTACCAATGAACAGATTTT
716
      |||
Sbjct 873 TCTTATCCAAGACTATTCTACTTCCGAGAGGCTACCGGCGCTACCAATGAACAGATTTT
932

Query 717 CCAG-ACACGGTGTACGAACTCAAGGGTACAACACCAACTGGAAAGACTACTAGCCGATA
775
      |||
Sbjct 933 CCAGAACACGGTGTACGAACTCAAGGGTACAACACCAACTGGAAAGACTACTAGCCGATA
992

Query 776 CGCTGCCGCCTCTGTGTTATCTT-CAGCTTACAGAGGATGGACGACTTCACCCGTTGGC
834
      |||
Sbjct 993 CGCTGCCGCCTCTGTGTTATCTTCCAGCTTACAGAGGATGGACGACTTCACCCGTTGGC
1052

Query 835 TATCAACCTCGACTAC-AAGGTTCACTGGACAACCTCCATCACCATCTTCAACCGA
888
      |||
Sbjct 1053 TATCACACTCGACTACAAAGGTTCACTGGACAACCTCCATCACCATCTTCAACCGA
1107
```

Abbildung 8.3: Sequenzvergleich mit Hilfe des BLAST-Algorithmus.

Score = 1061 bits (535), Expect = 0.0

Identities = 538/539 (99%), Gaps = 0/539 (0%)

Strand=Plus/Minus

8. Anhang

```
Query 673 GATATACTCCTTGATCTTGTCTGCGGAAGCAGTCTCGATAGTGCTGGGGTTGACACCGCT
732
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 810 GATATACTCCTTGATCTTGTCTGCGGAAGCAGTCTCGATAGTGCTGGGGTTGACACCGCT
751

Query 733 GAAGTGCTGCTGGGCGAACC GGCGTCAGAGTACCAGTCGTCATACTCGCCGATGTTACG
792
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 750 GAAGTGCTGCTGGGCGAACC GGCGTCAGAGTACCAGTCGTCATACTCGCCGATGTTACG
691

Query 793 GCCCTTCATGATATCCGCGGCCTTGTTGAGGTTATCCTGGTTGGAGGCGTCGCCATCAGT
852
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 690 GCCCTTCATGATATCCGCGGCCTTGTTGAGGTTATCCTGGTTGGAGGCGTCGCCATCAGT
631

Query 853 CTTTGGAACCTGAGCCTTGTTGAACTTCTCAACGTCGGCAGGAGTAGGACCTTTGTAAG
911
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 630 CTTTGGAACCTGAGCCTTGTTGAACTTCTCAACGTCGGCAAGAGTAGGACCTTTGTAAG
572
```

Abbildung 8.5: Sequenzvergleich mit Hilfe des BLAST-Algorithmus.

Score = 1592 bits (803), Expect = 0.0

Identities = 830/835 (99%), Gaps = 3/835 (0%)

Strand=Plus/Plus

Teile der vorliegenden Arbeit fanden Eingang in folgenden Veröffentlichungen:

Raacke, I.C., van Rad, U., Mueller, M.J., Berger, S. (2006). Yeast increases resistance in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by salicylic acid-dependent as well as –independent mechanisms. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19(10), 1138-1146.

Raacke, I.C., Mueller, M.J., Berger, S. (2006). Defects in allene oxide synthase and OPDA reductase alter the resistance to *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea*. *Journal Phytopathology* 154, 740-744.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Martin J. Müller und Herrn Prof. Dr. Thomas Roitsch danke ich für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen und dem steten Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Dr. Susanne Berger für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, die intensive Betreuung und die Korrektur dieser Arbeit. Weiterhin danke ich ihr für immer neue Vorschläge und Ideen, die zur Bereicherung meiner Arbeit beigetragen haben.

Dem GSF in Neuherberg danke ich für die Kooperation; insbesondere Frau Dr. Uta von Rad, für die Durchführung der Microarray-Analysen.

Frau Dr. Nancy Keller (University of Wisconsin-Madison, USA) danke ich für die Kooperation und die Bereitstellung der *Fusarium*-Stämme.

Für die Bereitstellung der *A. thaliana* Mutanten danke ich Frau Prof. Beate Keller (Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich), Herrn Dr. Erich Glawischnig (Lehrstuhl für Genetik, Technische Universität München) und Frau Dr. Annick Stintzi (Institut für Pflanzenphysiologie und Biotechnologie, Universität Hohenheim).

Für die Sequenzierungen danke ich Frau Susanne Michel und Frau Ute Neef aus der Botanik I.

Herrn Dr. Jürgen Zeier, Herrn Dr. Michael Rostas und Frau Prof. Caroline Müller – aus der Botanik II – danke ich für die gute Kooperation.

All denen, die mich bei meiner Arbeit unterstützten, möchte ich an dieser Stelle danken, besonders Joachim Rothenhöfer, Jörg Hirsche, Markus Krischke, Gabriele Gresser, Nadja Stingl, Christine Hampp, Beate Hilbert, Regina Burkl, Katharina Dückerhoff, Nhan Pham Phuoc, Barbara Dietrich, Christiane Löffler, Andreas Hauser, Bianca Büttner und Kathrin Karg.

Weiterhin danke ich allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls, die durch ihr kollegiales Verhältnis zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Den Praktikanten Katja Schmidt, Theresa Haase, Katja Scholl und Marianthi Stylov danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Dieses Projekt wurde vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt Gesundheit und Verbraucherschutz gefördert, auch hierfür bedanke ich mich.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Mutter und meiner Schwester bedanken, die mich stets in meinem Forscherdrang unterstützten und mir die Kraft für diese Arbeit gaben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Ines Christine Raacke

Geburtsdatum: 09.11.1962

Geburtsort: Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1968 – 1974 Grundschule in Harburg

1974 – 1979 Realschule in Harburg und Buxtehude

1979 – 1980 Höhere Handelsschule in Buxtehude

1980 – 1983 Wirtschaftsgymnasium in Buxtehude

Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1983 – 1985 Ausbildung zum Gärtner Fachrichtung Obstbau

Praktikum

9/1985 – 9/1986 Obstbauversuchsanstalt Jork der Landwirtschaftskammer Hannover

Berufstätigkeit

1/1987 – 9/1988 Obstbaugehilfin im Bereich Pflanzenschutz und Steinobst, Obstbauversuchsanstalt Jork der Landwirtschaftskammer Hannover

Hochschulstudium

10/1998 – 12/2003 Universität Hannover Fachbereich Gartenbau
Abschluss: Diplom-Agraringenieur

Berufstätigkeit

2/1994 – 9/1996 Zeitangestellte im Pflanzenschutzamt Hannover-Ahlem der Landwirtschaftskammer Hannover

Berufsausbildung

6/1996 – 5/1997 Landwirtschaftlicher Berater

Berufstätigkeit

6/1997 – 5/2002 Steinobstberaterin im Obstbauversuchsring des Alten Landes e.V.

Stipendium

6/2002 – 11/2004 Stipendiatin der Zeit-Stiftung

Promotion

12/2004 – 9/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis von Prof. Dr. Martin J. Müller am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie an der Julius-Maximilians Universität Würzburg

EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG

Würzburg, den

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bisher noch keinen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Ines C. Raacke