

Funktionelle Analyse von 13-Lipoxygenase- abgeleiteten Oxylipinen in der Pathogenabwehr von *Solanum tuberosum* L.

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Simone Altmann

geboren am 22.04.1982, in Beckendorf-Neindorf

Gutachter /in

1.

2.

3.

Halle (Saale),

A	EINLEITUNG.....	1
1.	Die pflanzliche Abwehr: Co-Evolution zwischen Pflanze und Pathogen	1
1.1	PAMP-induzierte Immunität.....	2
1.2	Effektor-induzierte Suszeptibilität.....	5
1.3	Effektor-induzierte Immunität	6
2.	Oxylipine	9
2.1	Der Octadecanoidweg – Jasmonatbiosynthese	10
2.2	Mechanismus der JA-Perzeption	12
2.3	Biologische Funktionen der Oxylipine	14
2.4	Die Wechselwirkung verschiedener Phytohormone in der pflanzlichen Immunabwehr	16
3.	Zielsetzung der Arbeit.....	21
B	MATERIAL UND METHODEN.....	23
1.	Material	23
1.1	Pflanzen	23
1.2	Bakterien.....	24
1.2.1	<i>Escherichia coli</i>	24
1.2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
1.3	<i>Phytophthora infestans</i>	25
1.4	<i>Botrytis cinerea</i>	25
1.5	Pep-13/W2A	25
1.6	Liste verwendeter Chemikalien	25
2.	Methoden	27
2.1.	Klonierung von Konstrukten.....	27
2.2	Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation	28
2.2.1	Chemokompetente <i>E. coli</i> DH5 α -Zellen	28
2.2.2	Chemokompetente <i>A. tumefaciens</i> -Zellen.....	28
2.3	<i>A. tumefaciens</i> -vermittelte stabile Transformation von Kartoffelpflanzen	28
2.4	Nucleinsäure-Isolation	29
2.4.1	DNA-Isolation aus Blattmaterial.....	29
2.4.2	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> Bakterien	30
2.4.3	Plasmidpräparation aus <i>A. tumefaciens</i>	30
2.4.4	RNA-Isolation (Trizol-Methode)	31
2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR) und Kolonie-PCR	31
2.6	Agarosegelelektrophorese.....	31
2.6.1	DNA-Gele	31
2.6.2	RNA-Gele	32
2.7	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
2.8	Restriktionsverdau	32
2.9	Southern-Hybridisierungen.....	32
2.10	DNaseI-Behandlung von RNA	33
2.11	Transkriptmengen-Quantifizierung.....	33
2.11.1	Northern-Hybridisierungen	33
2.11.2	Semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (sqRT-PCR)....	34
2.11.3	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	34
2.11.4	Microarray-Analysen	35
2.12	Pflanzenbehandlung - Bioassays.....	36
2.12.1	Verwundung der Blätter	36
2.12.2	Infiltration von Kartoffelblättern mit Pep-13/W2A.....	36
2.12.3	Inokulation von Kartoffelblättern mit <i>P. infestans</i>	37
2.12.4	Behandlung von Kartoffelpflanzen mit β -Aminobuttersäure	38
2.12.5	Infektion von Kartoffelpflanzen mit <i>B. cinerea</i>	38
2.13	Quantitative Real-Time PCR (qPCR) zur Bestimmung der Pathogenbiomasse	38
2.13.1	Quantifizierung der <i>P. infestans</i> -Biomasse	38
2.13.2	Quantifizierung der <i>B. cinerea</i> -Biomasse	38
2.14.	Färbetechniken.....	39
2.14.1	3,3-Diaminobenzidin (DAB) -Färbung von H ₂ O ₂	39

2.14.2	Trypan-Blau-Färbung	39
2.15	Quantifizierung der HR-ähnlichen Zelltodreaktion.....	39
2.16	Bestimmung des OPDA-, JA- und JA-Ile-Gehalts in Blättern	40
2.17	Bestimmung des SA-Gehalts in Blattproben.....	41
2.18	Statistische Auswertungen	41
C	ERGEBNISSE	43
1.	13-Lipoxygenase-abgeleitete Oxylipine in der PAMP-induzierten Signaltransduktion in Solanum tuberosum L.	43
1.1	PAMP-induzierte Akkumulation von SA, OPDA und JA.....	44
1.2	PAMP-induzierte Expression ausgewählter Biosynthesegene des Octadecanoid-Weges	46
1.3	RNAi -vermittelte Herabsetzung der JA-Biosynthese und der JA-Perzeption.....	47
1.3.1	Nachweis der RNAi-vermittelten Herabsetzung der Expression der Zielgene.....	47
1.3.2	Untersuchung der OPDA- und JA-Akkumulation in den RNAi-Pflanzen	50
1.4	Pep-13-induzierte Abwehrantworten in den StAOC- StOPR3- und StCOII-RNAi-Pflanzen.....	52
1.4.1	Nekrosenbildung und ROS-Akkumulation.....	52
1.4.2	Akkumulation der Signalsubstanzen SA und JA.....	54
1.4.3	Pep-13-induzierte Genexpression.....	56
1.5	Microarray-Analysen nach Pep-13-Behandlung	57
1.5.1	Oxylipin-abhängige Veränderungen im Genexpressionsmuster nach Pep-13-Behandlung	58
1.5.1.1	Vergleich der W2A-behandelten RNAi- und Wildtyp-Pflanzen.....	58
1.5.1.2	Analyse der Pep-13-behandelten Wildtyp- und RNAi-Pflanzen.....	59
1.5.2	Oxylipin-regulierte Kandidatengene in der Pep-13-Signalverarbeitung.....	63
1.5.3	Das Kandidatengen StJAZ.....	68
2.	13-Lipoxygenase-abgeleitete Oxylipine in der Pathogenantwort von Solanum tuberosum L.	71
2.1.	Rolle der 13-LOX-Oxylipine in der kompatiblen Interaktion zwischen Kartoffel und <i>P. infestans</i>	71
2.2	Rolle der 13-LOX-Oxylipine in der chemisch-induzierten Resistenz gegen <i>P. infestans</i>	74
2.3	Die inkompatible Interaktion zwischen <i>P. infestans</i> und den R1-Gen-tragenden Kartoffeln – Rolle der 13-Oxylipine.....	76
2.3.1	Generierung der JA-defizienten und JA-insensitiven RNAi-Pflanzen im R1-Hintergrund.....	76
2.3.2	Einfluss der JA-Defizienz und JA-Insensitivität auf das <i>P. infestans</i> Wachstum.....	78
2.4	13-Oxylipine in der Interaktion mit dem nekrotrophen Pilz <i>B. cinerea</i>	79
D	DISKUSSION.....	83
1.	PAMP-induzierte Abwehrantworten in Solanum tuberosum L. - Rolle der 13-Oxylipine	83
1.1	Die Pep-13 induzierte HR – eine atypische PAMP-Antwort?.....	83
1.2	Pep-13-induzierte Signalverarbeitung in Kartoffel	88
1.3	Oxylipin-regulierte Gene in der Pep-13-Antwort der Kartoffel.....	94
1.4	Das Zusammenspiel von SA und JA in der Pep-13-Antwort.....	104
2.	Die Pathogenabwehr in Kartoffelpflanzen mit verändertem Oxylipinmuster	108
2.1	Die Interaktion mit <i>P. infestans</i>	108
2.2.	13-Oxylipine in der kompatiblen Interaktion mit dem nekrotrophen Pilz <i>B. cinerea</i>	111
E	ZUSAMMENFASSUNG.....	115

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
12,13-EOT	12,13-Epoxy-Octadecatriensäure
13-HOT	13-Hydroxy-Octadecatriensäure
13-HPOT	13-Hydroperoxy-Octadecatriensäure
13-KOT	13-Keto-Octadecatriensäure
4-CL	4-Coumarat-CoA-Ligase
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
aa	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure, Vorläufer des ET in der Ethylenbiosynthese
ACRE	Avr9/Cf-9 Rapidly Elicited (ACRE)
AOC	Allenoxid-Cyclase
AOS	Allenoxid-Synthase
au	<i>arbitrary units</i> (beliebige Einheiten)
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CHS	Chalcon Synthase
COI1	engl. CORONATINE INSENSITIVE, an JA-Perzeption beteiligtes F-BOX-Protein
COR	Coronatin
Ct	engl. <i>threshold cycle</i>
d.h.	das heißt
DAB	3,3-Diaminobenzidin
<i>defl</i>	Tomaten-Mutante, die kein JA akkumuliert
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dpi	engl. <i>day(s) post infection</i> (Tag(e) nach Infektion)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFR	EF-Tu Rezeptor
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
EST	engl. <i>expressed sequence tag</i>
ET	Ethylen
<i>et al.</i>	<i>und andere</i>
EV	Vektorkontrolle
Exp.	Experiment
flg22	22 aa langes Peptid des bakteriellen Proteins Flagellin
<i>FLS2/FLS2</i>	engl. <i>flagellin sensing 2</i> (flg22-Rezeptor-Gen/-Protein)
GC-MS	Gas-Chromatographie-Massenspektroskopie
gFW	Gramm Frischgewicht
h	Stunde(n)
hpi	engl. <i>hours post infection/infiltration</i> (Stunden nach Infektion/Infiltration)
HPLC	engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>
HR	engl. <i>hypersensitive response</i> (Hypersensitive Reaktion)
hrpZ	ein bakterielles Harpin-Protein
ISR	engl. <i>induced systemic resistance</i>
JA	Jasmonsäure
jar1/JAR1	engl. <i>jasmonate resistant 1</i> (JA-insensitive Arabidopsis Mutante)
JAs	Jasmonate (Jasmonsäure und weitere Vertreter des Octadecanoid-Weges z.B. 12-OPDA)
Kap.	Kapitel
kb	kilo Basenpaare
l	Liter
LOX	Lipoxygenase

LPS	Lipopolysaccharid; ein bakterielles PAMP
LRR	engl. <i>leucine-rich repeat</i>
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
min.	Minute (n)
<i>NahG</i>	Salizylhydroxylase-kodierendes Gen aus <i>Pseudomonas putida</i>
nmol	Nanomol
ntc	engl. non-treated control (unbehandelte Kontrolle)
OGA	Oligogalacturonide
OPDA	12-Oxophytodiensäure
OPR3	12-Oxophytodiensäurereduktase 3
<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
PAL	Phenylalanin Ammoniak Lyase
PAMP	engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i> (Pathogen-assoziiertes Molekülmuster)
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pep-13	13 aa langes Peptid des GP42 von <i>Phytophthora sojae</i> , aktiver Elicitor/PAMP
PGN	Peptidoglycan; ein bakterielles PAMP
<i>PR1</i>	engl. <i>pathogenesis-related protein 1</i>
<i>PR10</i>	engl. <i>pathogenesis-related protein 10</i>
<i>PR5</i>	engl. <i>pathogenesis-related protein 5</i>
PRR	engl. <i>pattern recognition receptor</i> , Rezeptor für PAMPs
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PUFA	engl. <i>polyunsaturated fatty acid</i> (mehrfach ungesättigte Fettsäure)
RES	engl. <i>reactive electrophile species</i>
RLK	engl. <i>receptor-like kinase</i>
RLP	engl. <i>receptor-like protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuclease
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Reverse Transkriptase
Rt	Retentionszeit
s.	siehe
SA	Salizylsäure
SAG	Salizylsäureglucosid
SAR	engl. <i>systemic acquired resistance</i>
SDS	engl. <i>sodiumdodecylsulphate</i> (Natriumdodecylsulphat)
sog.	sogenannte
TAE	Tris, Acetat, EDTA
TLP	engl. <i>tubby-like protein</i>
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tri-(hydroxymethyl) aminomethan
Ub	Ubiquitin
W2A	<i>Pep-13</i> -Analogon mit Aminosäureaustausch an Position 2, inaktiver Elicitor/PAMP
WT	Wildtyp

A EINLEITUNG

1. Die pflanzliche Abwehr: Co-Evolution zwischen Pflanze und Pathogen

Obwohl Pflanzen nicht mit einem zirkulierenden Immunsystem oder einer adaptiven Immunabwehr ausgestattet sind, besitzen sie ein bemerkenswertes Potential der Abwehr gegenüber sehr verschiedenen Pathogenklassen, wie Bakterien, Pilzen, Oomyceten, Viren oder Nematoden. Dabei ist jede Einzelzelle in der Lage, gezielt auf den Pathogenbefall zu reagieren. Vor den induzierten Mechanismen stehen jedoch konstitutive Barrieren, wie die pflanzliche Zellwand oder die Kutikula. Zudem können präformierte antimikrobielle Substanzen, sog. Phytoantizipine, in den Vakuolen der Zellen gespeichert werden, entweder im gesamten Gewebe oder aber in spezialisierten Organen wie den Trichomen oder in Drüsenzellen (Bednarek und Osbourn, 2009; Bednarek und Schulze-Lefert, 2009). Induzierbare Abwehrmechanismen der Pflanzen umfassen die Produktion von giftigen Metaboliten wie Phytoalexinen oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Dabei können die ROS sowohl als Signal oder auch zur Polymerisierung von zellwandverstärkenden Molekülen dienen (Gechev *et al.*, 2006). Die Phytoalexine umfassen verschiedene Stoffklassen. So kommen in Arabidopsis das Tryptophan-abgeleitete Alkaloid Camalexin (Glawischnig, 2007) oder Glucosinolat-Abbauprodukte vor (Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009). In der Solanacee Kartoffel können in Knollen die Sesquiterpene Lubimin und Rishitin gebildet werden (Morrissey und Osbourn, 1999) während in Blättern Hydroxyzimtsäuren und Divinylether als Phytoalexine fungieren könnten (Schmidt *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 1999). Diese toxischen Substanzen werden über Sekretionsprozesse gezielt an den Ort der versuchten Penetration gebracht, wobei die Reorganisation des Cytoskeletts und Vesikeltransportprozesse eine wichtige Rolle spielen (Collins *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2008; Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009). Weiterhin wird Callose, ein β -1,3-Glucan, zur Verstärkung der Zellwand synthetisiert und zusammen mit Phytoalexinen, Phenolen und Proteinen in Zellwandauflagerungen, den Papillen, angereichert (Hardham *et al.*, 2007). Diese Prozesse werden auch unter dem Begriff Penetrationsresistenz oder prä-invasive Resistenz zusammengefasst, da sie nicht-adaptierte Pathogene erfolgreich an der Besiedelung der Pflanze hindern (Lipka *et al.*, 2005; Hardham *et al.*, 2007). Pathogene, die die Penetrationsresistenz überkommen können, werden von der Pflanzenzelle erkannt und induzieren in dieser weitere Abwehrmechanismen, wie die Aktivierung von PR- (*pathogenesis-related*) Genen. Die Produkte der PR-Gene sind z.B. porenformende Osmotine (PR5), Zellwand-lyisierende

Enzyme wie β -1,3-Glucanasen (*PR2*) und Chitinasen (*PR3*) oder auch Ribonucleasen (*PR10*) (van Loon *et al.*, 2006). Eine weitere Form der Abwehr ist die lokal eng begrenzte programmierte Zelltod-Antwort, die Hypersensitive Reaktion (HR), bei der die infizierte Zelle und möglicherweise wenige benachbarte Zellen absterben, um die Ausbreitung des Pathogens zu verhindern.

Ein Schlüsselpunkt der Pflanze-Pathogen-Interaktionen ist die Erkennung der Pathogene auf der Pflanzenseite, und umgekehrt die Vermeidung der Erkennung auf der Pathogenseite. Diese beiden gegensätzlichen Mechanismen führen im Verlauf der Evolution zu einem *arms race* zwischen Pflanze und Pathogen, dessen Ergebnis schematisch durch das *zigzag*-Modell erklärt werden kann (Jones und Dangl, 2006) (s. Abb. A-1 A). Dieses Modell erklärt die Dynamik der Pflanze-Pathogen-Interaktion als zeitlich gestaffelte Phasen in der Co-Evolution von Pflanze und Pathogen.

1.1 PAMP-induzierte Immunität

Die erste Phase des *zigzag*-Modells ist die PAMP-induzierte Immunität (*PAMP-triggered immunity*, PTI, (Jones und Dangl, 2006)). Dabei erfolgt die Erkennung des angreifenden Pathogens anhand von Molekülstrukturen der Pathogene, den PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), über Oberflächenrezeptoren der Pflanzen, den PRRs (*pattern recognition receptors*) (Zipfel, 2008; Boller und Felix, 2009) (Vgl. Abb. A-1 B). Diese Perzeption der PAMPs induziert vielfältige Abwehrmechanismen in der Pflanze, wie beispielsweise die Aktivierung von Abwehrgenen und Zellwandverstärkungen (Nürnberger und Kemmerling, 2009), die letztlich zur Abwehr der Pathogene führen (Zipfel *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006; Hann und Rathjen, 2007). Zudem wird vermutet, dass die PTI die Pflanze in einen Zustand erhöhter Responsivität gegenüber weiterem Pathogenbefall versetzt und so ihre Abwehrbereitschaft erhöht (Zipfel *et al.*, 2004; Jones und Dangl, 2006).

PAMPs sind definiert als hochkonservierte Strukturen in Molekülen, die charakteristisch für eine ganze Klasse von Mikroben sind, in der Pflanze aber nicht vorkommen. Diese Moleküle sind weiterhin essentiell für die Fitness der Pathogene und daher seltener evolutionären Veränderungen unterworfen. Somit können sie der Pflanze zur Unterscheidung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ dienen (Göhre und Robatzek, 2008; Nürnberger und Kemmerling, 2009).

Allgemein wird davon ausgegangen, dass PAMPs evolutionär konservierte Strukturen darstellen, die essentiell für das Pathogen sind. Dennoch existieren auch Beispiele für eine Veränderung der Aminosäuresequenz in PAMPs, die nicht zu einem Verlust der Pathogenität führen (Felix *et al.*, 1999; Jones und Dangl, 2006; Sun *et al.*, 2006).

Beispiele für bakterielle PAMPs sind u.a. flg22, ein N-terminales Peptid des Flagellins (Felix *et al.*, 1999), elf18, ein Peptid des Elongationsfaktors EF-Tu (Kunze *et al.*, 2004), Lipopolysaccharide (LPS) (Meyer *et al.*, 2001), Peptidoglycan (Gust *et al.*, 2007) oder das RNP-1-Motiv des Kälteschock-Proteins CSP (Felix und Boller, 2003). In Pilzen fungieren Chitin (Ito *et al.*, 1997), die Ethylen-induzierbare Xylanase (EIX, Enkerli *et al.*, 1999; Rotblat *et al.*, 2002) oder Ergosterol (Granado *et al.*, 1995) als PAMP. Für Oomyceten sind ein Peptid einer Transglutaminase (Pep-13, Nürnberger *et al.*, 1994, Brunner *et al.*, 2002), die Cellulose-bindenden Domänen (CBD) des Cellulose-bindenden Lectins (CBEL, Gaulin *et al.*, 2006) oder Sterol-bindende Elicitine (Osman *et al.*, 2001, Kawamura *et al.*, 2009) mit PAMP-Charakteristika beschrieben.

Allgemein gehören zu den häufig nach Behandlung mit isolierten PAMPs beobachteten Abwehrantworten Ionenströme, Ca^{2+} -Einstrom, die Aktivierung von MAP-Kinasen (MAPKs) (Nühse *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2002) sowie der ROS- und NO-*burst* als Antworten, die in einem zeitlichen Rahmen von wenigen Minuten nach Behandlung einsetzen (Boller und Felix, 2009). Spätere Antworten, die aber auch noch nach 5-30 Minuten detektierbar sind, umfassen die Synthese von Ethylen (ET), die Endocytose des PRR (Robatzek *et al.*, 2006) und erste Genaktivierung. Im Zeitraum von Stunden bis Tagen erfolgen dann weitere Aktivierung von Genen, sowie Callose-Ablagerung (Gómez-Gómez *et al.*, 1999). Diese Antworten werden als stereotype PAMP-Antworten klassifiziert (Boller und Felix, 2009).

Das 13 Aminosäuren lange Peptid Pep-13 aus der Zellwand-assoziierten Transglutaminase GP42 von *Phytophthora sojae* wurde als Elicitor in Petersilie identifiziert (Nürnberger *et al.*, 1994), löst aber auch in Kartoffel, Tabak, *N. benthamiana* und Wein Abwehrantworten aus (Brunner *et al.*, 2002; Nürnberger und Kemmerling, 2009). Es erfüllt alle Charakteristika von PAMPs, da es ein hochkonserviertes Epitop der GP42-Transglutaminase verschiedener *Phytophthora*-Spezies und essentiell für die Enzymaktivität des GP42 ist, sowie keine Sequenzähnlichkeiten zu Pflanzenproteinen besitzt. Pep-13 bindet in Petersilienzellen an einen putativen Rezeptor (Diekmann *et al.*, 1994; Nürnberger *et al.*, 1994; Nürnberger *et al.*, 1995; Nennstiel *et al.*, 1998). Diese Erkennung führt zu Ionenströmen über die Plasmamembran (Nürnberger *et al.*, 1994), zur Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration (Zimmermann *et al.*, 1997; Blume *et al.*, 2000) sowie zu einem *oxidative burst* (Nürnberger *et al.*, 1994; Jabs *et al.*, 1997) und zur Aktivierung einer MAP-Kinase (MAPK) -Kaskade (Ligterink *et al.*, 1997). Als späte Abwehr-Antwort kann in diesem System die Akkumulation von Furanocoumarin-Phytoalexinen nachgewiesen werden (Nürnberger *et al.*, 1994). Die Aktivierung der Phytoalexinbiosynthese-Gene nach Pep-13-Behandlung erwies sich als abhängig vom *oxidative burst*, wohingegen Abwehrgene unabhängig von der ROS-Akkumulation und in Abhängigkeit einer funktionalen MAPK-Kaskade aktiviert werden (Nürnberger *et al.*, 1994; Jabs *et al.*, 1997; Ligterink *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Blume *et al.*, 2000; Kroj *et al.*, 2003). Ebenso wurde in diesem System die Beteiligung von WRKY-

Transkriptionsfaktoren an der Aktivierung von PR-Genen, wie dem *PRI*, nachgewiesen (Rushton *et al.*, 1996).

Die PTI trägt sowohl zur Nichtwirts-Resistenz gegenüber nicht-adaptierten Pathogenen, als auch zur basalen Abwehr in suszeptiblen Pflanzen bei (Göhre und Robatzek, 2008), und bildet damit aus evolutionärer Sicht die erste Ebene der aktiven Abwehr (Vgl. Abb. A-1 A und B). Es wird davon ausgegangen, dass die Erkennung der PAMPs zwar die Signalschwelle für eine effektive Abwehr überschreitet, aber nicht zur Ausbildung einer HR führt.

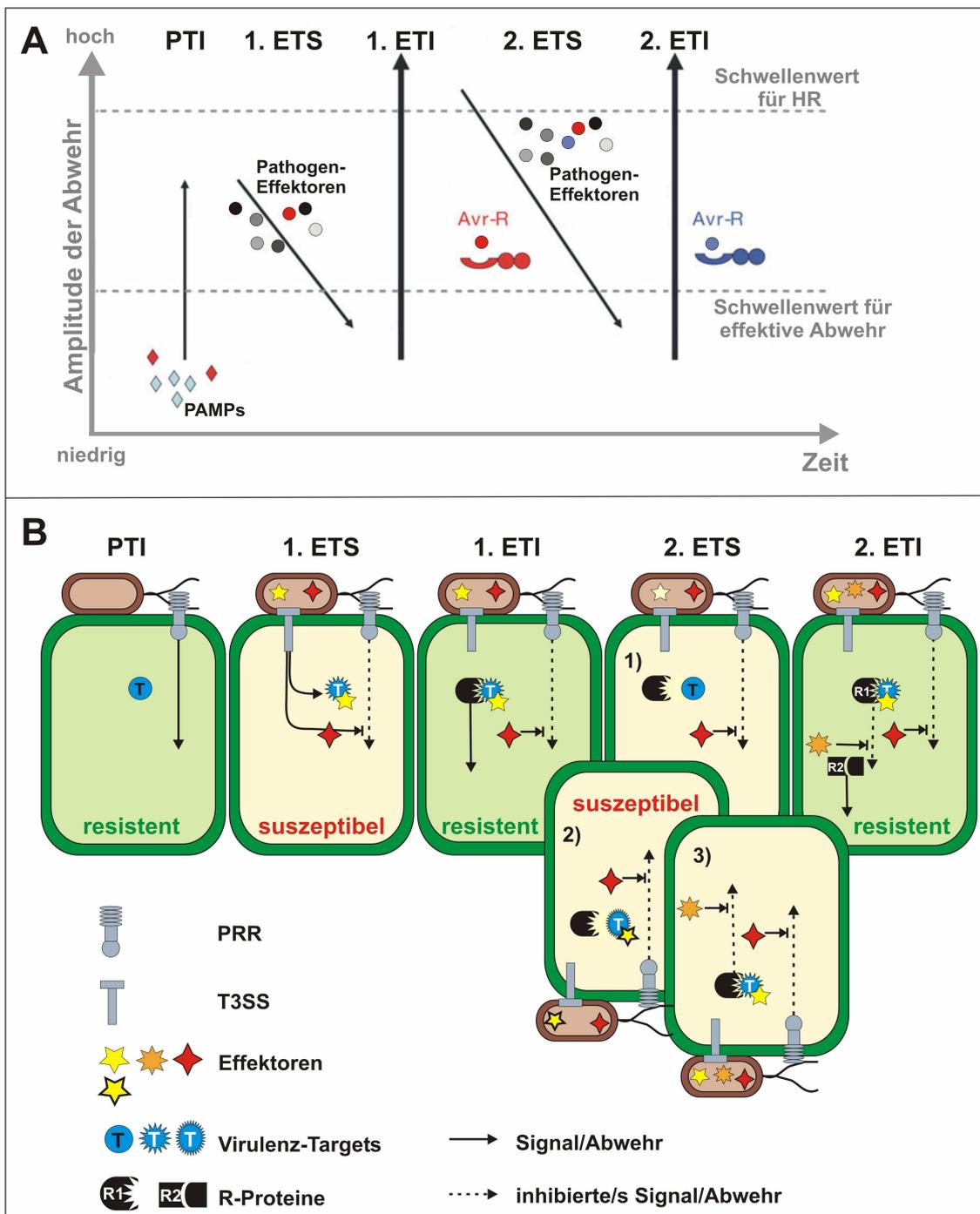


Abb. A-1: Schema der Co-Evolution von Pflanze-Pathogen-Interaktionen

(modifiziert nach Jones und Dangl [2006], A) und Ma und Guttman [2008], B)

Dargestellt sind die einzelnen Phasen der Co-Evolution der Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen. Im oberen Teil zeigt das *zigzag*-Schema den postulierten zeitlichen Verlauf der Interaktion zusammen mit der Amplitude der Abwehrantworten. Darunter ist schematisch die Wechselwirkung von Pflanzenzellen mit einem bakteriellen Pathogen abgebildet.

In der ersten Phase, der *PAMP-triggered immunity* (PTI), werden PAMPs (hier flg22) durch PRRs (hier FLS2) erkannt und induzieren eine Signalkaskade, die zu Abwehrantworten führt. Die Schwelle für eine effektive Abwehr wird überschritten und die Pflanze ist resistent gegenüber dem Pathogen.

In einer zweiten Phase, der *effector-triggered susceptibility* (1. ETS), konnten Pathogene Effektoren entwickeln, die über Transportmechanismen (hier T3SS) in die Pflanzenzellen gebracht werden. Die Virulenzfunktion der Effektoren unterdrücken erfolgreich die Mechanismen der PTI, indem sie pflanzliche Komponenten der Abwehr (*virulence targets* (T)) modifizieren. Der Schwellenwert für eine effektive Abwehr kann nicht überschritten werden und die Pflanze ist suszeptibel.

Die dritte Phase, die *effector-triggered immunity* (1. ETI) ist durch den Erwerb von Resistenzgenen auf der Pflanzenseite gekennzeichnet, deren Produkte, die R-Proteine, die Erkennung Pathogen-spezifischer Effektoren oder ihrer Wirkungen ermöglichen. Diese zweite Stufe der Erkennung der Pathogene führt im Verhältnis zu den PAMP-induzierten Abwehrmechanismen zu verstärkten Abwehrantworten in der Pflanze, so dass die Schwelle für eine effektive Abwehr und zusätzlich die Schwelle für die HR überschritten werden. Die Ausbildung der HR führt zum Absterben einzelner Pflanzenzellen und zur Resistenz der Pflanze.

Im Verlauf der Evolution konnten einige Pathogene ihr Set an Effektoren weiter der Interaktion anpassen und so die Erkennung durch pflanzliche R-Proteine vermeiden (z.B. Nicht-Expression oder Modifizierung des Effektors (1,2)) oder aber die Signalkaskade inhibieren (3), die durch das R-Protein induziert wird. Als Folge davon ist die Pflanze suszeptibel (2. ETS).

Die Entwicklung weiterer R-Proteine ermöglicht es der Pflanze auf den neuen oder veränderten Effektor zu reagieren und so wiederum eine erfolgreiche Abwehr zu initiieren (2. ETI).

Diese Schritte des Erwerbs von Effektoren und R-Genen können sich beliebig oft wiederholen.

1.2 Effektor-induzierte Suszeptibilität

Erfolgreiche Pathogene zeichnen sich durch den Erwerb von Effektoren aus, die in Pflanzenzellen geschleust werden und dort als Virulenzmechanismus die Erkennung der PAMPs oder die PAMP-induzierten Signalwege unterbinden (Vgl. Abb. A-1 B). So ist die Pflanze nicht in der Lage, eine ausreichende Immunabwehr zu aktivieren, und kann von dem Pathogen besiedelt werden – sie ist suszeptibel. Dieser Zustand stellt die zweite Phase im *zigzag*-Modell dar und wurde als Effektor-induzierte Suszeptibilität (*effector-triggered susceptibility* (ETS), (Jones und Dangl, 2006)) bezeichnet (Vgl. Abb. A-1 A).

Für den Transport der Effektoren in das Cytosol der Pflanzen nutzen phytopathogene Bakterien einen Typ-III-Sekretionsapparat (T3SS) (Büttner und Bonas, 2002, 2006), während Pilze und Oomyceten ein auf Sekretionsprozessen basierendes Transportsystem zu nutzen scheinen (Panstruga und Dodds, 2009; Tyler, 2009). Die Effektoren von Oomyceten besitzen unterhalb vom Signalpeptid ein RXLR-(D)EER-Motiv, das für den Transport in die Pflanzenzelle, aber nicht für den ersten Schritt, die Exocytose in die extrahaustoriale Matrix benötigt wird (Bhattacharjee *et al.*, 2006; Whisson *et al.*, 2007; Birch *et al.*, 2008). Arabidopsis selbst besitzt ca. 300 RXLR-Proteine, von denen zahlreiche eine Funktion in der Endocytose aufweisen, so dass Oomyceten möglicherweise einen Wirts-Mechanismus für den Import der Effektoren ins pflanzliche Cytosol nutzen (Birch *et al.*, 2008).

Für bakterielle Effektoren konnten bisher drei generelle „Grundfunktionen“ nachgewiesen werden: die Manipulation der Protein-Stabilität durch direkten (mittels Proteasen) oder 26S-Proteasom-vermittelten Proteinabbau, Eingriff in den RNA-Metabolismus oder Inhibierung von Kinasen (Block *et al.*, 2008). Die Funktion von Oomyceten-Effektoren ist dagegen größtenteils unbekannt. Von den sechs derzeit bekannten Effektoren, *Phytophthora sojae* Avr1b, *Hyaloperonospora arabidopsidis* ATR1 und ATR13, sowie *Phytophthora infestans* Avr3a, Avr4 und Avr-blb1, konnte lediglich für Avr3a ein Funktion in der Manipulation des pflanzlichen Ubiquitin-26S-Proteasomweges postuliert werden (Bos *et al.*, 2006; Birch *et al.*, 2009).

Neben den intrazellulär wirkenden Effektoren besitzen Pilze und Oomyceten apoplastidäre Effektoren, die häufig eine inhibierende Wirkung auf pflanzliche Glucanasen oder Proteasen haben (Rose *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2005; Kamoun, 2007; Tian *et al.*, 2007; Damasceno *et al.*, 2008).

Als Modell für eine kompatible Interaktion, in der die Pflanze suszeptibel und das Pathogen virulent ist, diente in dieser Arbeit das Pathosystem Kartoffel – *P. infestans*. *P. infestans* ist ein hemibiotropher Oomycet, der ein aggressives Pathogen für Kartoffel und Tomate darstellt. Eine Infektion erfolgt durch windverbreitete Sporangien oder durch unter feuchten Bedingungen aus den Sporangien freigesetzte Zoosporen. In der ersten biotrophen Lebensphase wächst der Oomycet interzellulär und bildet Haustorien aus. Später, in der nekrotrophen Lebensphase, kommt es zur Zerstörung des pflanzlichen Gewebes, die als braune Läsionen makroskopisch sichtbar wird. In dieser Phase werden Sporangioophoren gebildet, die durch die Stomata aus dem Blatt herauswachsen und asexuelle Sporen enthaltene Sporangien tragen (Kamoun, 2005; Fry, 2008; Birch *et al.*, 2009).

1.3 Effektor-induzierte Immunität

Die Effektoren sollten den Pathogenen zur Unterdrückung der pflanzlichen Immunabwehr dienen und stellen somit einen Virulenzfaktor dar. Einige Pflanzen haben mit den Resistenz- (R-) Gen-kodierten R-Proteinen jedoch einen Mechanismus erworben, Pathogene an den Aktionen ihrer Effektoren zu erkennen. Diese Erkennung führt zur nächsten Phase des *zigzag*-Modells, der Effektor-vermittelten Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI, (Jones und Dangl, 2006) (vgl. Abb. A-1 A).

Die Erkennung der Effektoren durch die R-Proteine kann über direkte Interaktion erfolgen. Dafür gibt es jedoch nur sehr wenige Beispiele, wie das *L5/L6* und *Avr567* aus Flachs bzw. *Melampsora lini* (Dodds *et al.*, 2006) sowie das Arabidopsis *RRS1-R* und *PopP2* aus *Ralstonia solanacearum* (Deslandes *et al.*, 2003). In den meisten Fällen konnte jedoch keine direkte Interaktion zwischen Effektor und R-Protein nachgewiesen

werden, so dass alternativ in der *guard*-Hypothese davon ausgegangen wird, dass R-Proteine die Wirkung der Effektoren erkennen (Van der Biezen und Jones, 1998; Dangl und Jones, 2001; Chisholm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006) (vgl. Abb. A-1 B). R-Proteine „überwachen“ nach dieser Hypothese ein begrenztes Set an pflanzlichen Proteinen mit einer Funktion in der PTI, die ein wahrscheinliches Virulenz-Ziel der Effektoren darstellen. So wird gewährleistet, dass wenige R-Proteine in der Lage sind, die unterschiedlichen Effektoren von verschiedensten Pathogenen zu erkennen, ohne dass dafür eine evolutionär instabile spezifische Interaktion mit einzelnen Effektoren nötig wäre. Dennoch erklärt auch das *guard*-Modell nicht vollständig alle vorliegenden Daten. Nach dem *guard*-Modell sollte die Manipulation der Virulenz-Ziele durch die Effektoren die Virulenz der Pathogene fördern. Die Modifikation des Pto-Proteins aus Tomate durch den entsprechenden Effektor AvrPto aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* führt beispielsweise zur Erkennung des Pathogens. Diese Erkennung ist abhängig von dem R-Protein Prf (Mucyn *et al.*, 2006). In Abwesenheit des Prf führt die Modifizierung des Pto jedoch nicht zu einer gesteigerten Virulenz des Pathogens (Chang *et al.*, 2000) und das eigentliche Virulenzziel des AvrPto scheint FLS2 zu sein, zu dessen Gen *Pto* starke Sequenzähnlichkeit aufweist (Xiang *et al.*, 2008). Auch die Aktivierung des Paprika *Bs3*-Promotors durch *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs3 führt in der Pflanze zur Erkennung des Pathogens (Römer *et al.*, 2007) ohne erkennbaren Nutzen für das Pathogen. Das eigentliche Virulenzziel des AvrBs3 scheint der Promotor des Paprikagens *upa20* zu sein, das als Transkriptionsfaktor an der Regulation der Zellgröße beteiligt ist (Kay *et al.*, 2007). Auf der Basis dieser Daten wurde mit dem *decoy*-Modell eine Abwandlung des *guard*-Modells postuliert, nach dem Pflanzen das eigentliche Virulenz-Ziel quasi als „Falle/Köder“ (*decoy*) imitieren. Dieses imitierte Ziel könnte in der Evolution auf eine stärkere Interaktion mit dem Effektor hin selektiert werden. Der *decoy* würde dann nur die Erkennung einer Effektor-Aktion vermitteln. Dagegen kann sich das eigentliche Virulenzziel in Richtung verminderte Interaktion mit dem Effektor entwickeln (van der Hoorn und Kamoun, 2008; Zhou und Chai, 2008; Zipfel und Rathjen, 2008).

Die Abwehrmechanismen der PTI und ETI weisen zwar große qualitative Ähnlichkeiten auf, dennoch sind die Effektor-induzierten Mechanismen meist stärker und schneller induziert und zusätzlich von einer HR begleitet (Tao *et al.*, 2003; Tameling und Takken, 2008).

Eine große Gruppe von pflanzlichen R-Proteinen gehört den NB-LRR-Proteinen an. Bei diesen handelt es sich um cytosolische Multidomänen-Proteine, die eine N-terminale CC-(*coiled coil*) oder TIR- (*Toll and human interleukin 1 receptor*) Domäne, eine zentrale NB- (*nucleotide binding*) Domäne sowie eine C-terminale LRR- (*leucine rich repeat*) Domäne besitzen (Takken und Tameling, 2009). Sie werden durch Autoinhibierung in inaktivem Zustand gehalten, ein Mechanismus, der durch vielfältige intramolekulare Wechselwirkungen ermöglicht wird. Die Aktivierung erfolgt nach Effektorerkennung, an der vermutlich die N-terminale Domäne und Teile der LRR-

Domäne beteiligt sind. Eine Konformationsänderung der aktivierten NB-LRRs erlaubt einen ADP-ATP-Austausch in der NB-Domäne, wodurch vermutlich eine Signalkette initiiert wird. ATP-Hydrolyse inaktiviert dann das NB-LRR-Protein (Takken und Tameling, 2009).

In dieser Arbeit wurden u.a. Kartoffelpflanzen untersucht, die mit dem R1-Gen transformiert waren, bei dem es sich ebenfalls um ein CC-NB-LRR-Protein handelt (Ballvora *et al.*, 2002). Der entsprechende Effektor, dessen Wirkungsweise das R1-Protein detektieren soll, ist jedoch noch nicht aus *Phytophthora* isoliert worden.

Wie genau aktivierte R-Proteine die nachfolgenden Abwehrmechanismen auslösen, ist derzeit unklar (Takken und Tameling, 2009). Als Interaktoren der NB-LRRs wurden die Komponenten des molekularen *chaperone*-Komplex HSP90/RAR1/SGT1 identifiziert, aber die genaue Funktion dieser Interaktion ist nicht bekannt (Picard, 2008; Shirasu, 2009). Zusätzlich zur cytoplasmatischen Lokalisation konnte für einige NB-LRR-Proteine eine Lokalisation im Kern nachgewiesen werden, so dass eine Funktion als transkriptionelle Co-Regulatoren vermutet wird (Tameling und Takken, 2008). In dem Arabidopsis NB-LRR-Protein RRS1 beispielsweise wurde eine C-terminale WRKY-Domäne nachgewiesen, die charakteristisch für eine Gruppe von Abwehr-assoziierten Transkriptionsfaktoren ist (Deslandes *et al.*, 2003). Das Gerste MLA10-R-Protein hebt nach Erkennung des Mehltau-Effektors AvrA10 die von WRKY-Transkriptionsfaktoren vermittelte negative Regulation der PTI auf, so dass die Abwehrmechanismen der PTI schneller und stärker induziert werden können (Shen *et al.*, 2007). Trotz dieser scheinbar sehr direkten Wirkungsweise einiger R-Proteine zeigen viele NB-LRRs für die Induktion der Resistenzantwort eine Abhängigkeit vom SA-Weg (Feys und Parker, 2000).

Die Effektor-induzierte Immunität ist jedoch nicht die letzte Stufe der Co-Evolution zwischen Pflanze und Pathogen. Vielmehr konnten Pathogene im Verlauf der Evolution Mechanismen entwickeln, um die ETI zu unterwandern und eine neue Stufe der ETS zu etablieren (s. Abb. A-1, 2. ETS). So könnten Pathogene einen Effektor, der erkannt wird, nicht mehr transkribieren (s. Abb. A-1, 2. ETS (1)) oder den Effektor bzw. dessen Aktion modifizieren (s. Abb. A-1, 2. ETS (2)). Zusätzlich könnte der „Erwerb“ von neuen Effektoren z.B. über horizontalen Gentransfer oder Mutationsprozesse dazu beigetragen haben, die Signalweiterleitung der ETI unterhalb der Effektorerkennung zu inhibieren (s. Abb. A-1, 2. ETS (3)). Nach dem *zigzag*-Modell führt eine erneute Anpassung der Pflanze an diese Situation zur Entstehung eines neuen R-Gens, so dass erneut ein resistenter Zustand hergestellt wird (vgl. Abb. A-1, 2.ETI).

Diese Mechanismen können sich im Verlauf der Evolution in einer Art oszillierendem Prozess beliebig oft wiederholen. Daraus kann auch geschlussfolgert werden, dass die heutigen Pathosysteme erstens keine statische Situation darstellen sondern sich weiter entwickeln und, dass zweitens verschiedene Pathosysteme sich in verschiedenen Stufen dieses Prozesses befinden können.

2. Oxylipine

Oxylipine bilden eine sehr diverse Gruppe von Lipid-abgeleiteten Sekundärmetaboliten in Pflanzen, deren gemeinsames Strukturmerkmal eine Sauerstoff-haltige funktionelle Gruppe ist. Ihre Synthese erfolgt u.a. über den Lipoxygenase- (LOX-) Weg, ausgehend von den mehrfach ungesättigten Fettsäuren pflanzlicher Membranen (Feussner und Wasternack, 2002; Wasternack, 2006). Benannt ist dieser Weg nach der LOX, dem Enzym, das den Einbau von molekularem Sauerstoff in die (1Z, 4Z)-Pentadienstruktur des Kohlenstoffgrundgerüsts der Fettsäuren katalysiert. Dadurch werden im ersten Schritt die entsprechenden S-Isomere der Fettsäure-Hydroperoxide gebildet, die dann von einer Reihe von Enzymen als Substrat genutzt werden können. Somit lässt sich der LOX-Weg unterhalb der Hydroperoxide in sieben Unterzweige klassifizieren: (1) Bildung von Keto-Fettsäuren durch die LOX, (2) Allenoxidsynthase- (AOS)/Octadecanoid-Weg zur Synthese von Jasmonaten, (3) Bildung von ω -oxo-Fettsäuren, Aldehyden und Alkoholen durch eine Hydroperoxidlyase (HPL), (4) Divinylether-Synthase- (DES-) Weg zur Bildung von Divinylethern, (5) Peroxygenase- (POX-) Weg zu Bildung von Epoxyhydroxy-Fettsäuren, (6) Synthese von Epoxyhydroxy-Fettsäuren durch eine Epoxyalkohlsynthase (EAS) und (7) Reduktase-Weg zur Synthese von Hydroxy-Fettsäuren (s. Abb. A-2). Abhängig von der Position der Oxygenierung an Position 9 oder 13 im Kohlenstoffgerüst können die LOXn in 9- und 13-LOXn untergliedert werden. Die meisten der nachfolgenden Enzyme nutzen spezifisch die 9- bzw. 13-Hydroperoxide, so dass die gebildeten Oxylipine in 9- bzw. 13-LOX abgeleitete Oxylipine – oder kurz 9- bzw. 13-Oxylipine - eingeteilt werden können. Zusätzlich kann zwischen Typ I-LOXn ohne Transitpeptid und Typ II-LOXn mit chloroplastidärem Transitpeptid unterschieden werden. Neben dem LOX-Weg existieren zwei weitere Möglichkeiten, der Bildung von Hydroperoxy-Fettsäuren: nicht-enzymatische Auto-Oxidationsprozesse, die zur Bildung der Phytoprostane führen (Müller, 2004), und katalysiert durch eine α -Dioxygenase (Hamberg *et al.*, 1999; Wasternack, 2006).

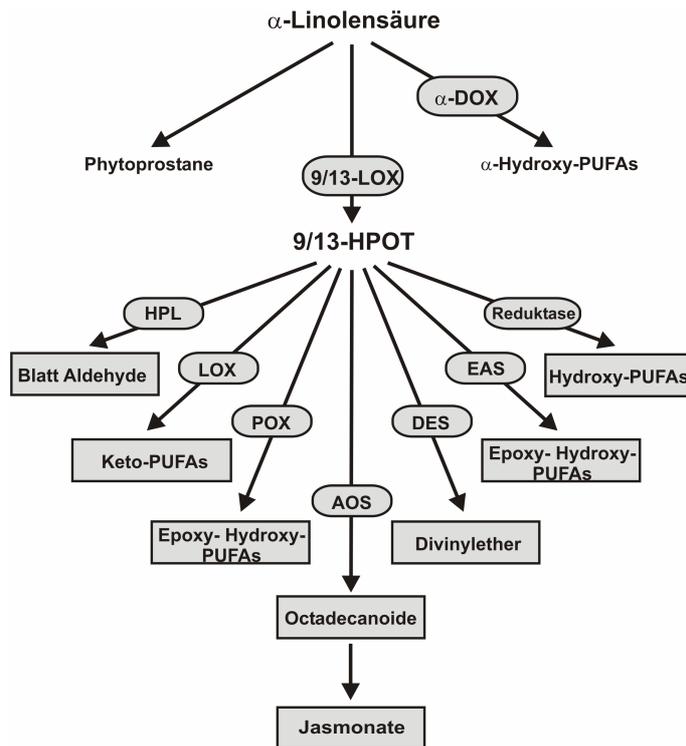


Abb. A-2: Schematische Darstellung der Reaktionen des LOX-Weges

(nach Wasternack, 2006)

Zunächst wird durch eine Lipoxygenase (LOX) die Hydroperoxy-Octadecatriensäure (HPOT) gebildet. Anschließend erfolgt die weitere Metabolisierung der HPOT durch verschiedene Enzyme des LOX-Weges. (Details s. Text).

2.1 Der Octadecanoidweg – Jasmonatbiosynthese

Die Biosynthese des Jasmonats (JA) erfolgt aus Linolensäure in einem Syntheseweg, der durch Arbeiten an *Arabidopsis* und Tomate aufgeklärt werden konnte. In *Arabidopsis* wird zunächst Linolensäure durch die Lipasen AtDGL und AtDAD1 aus den Galactolipiden bzw. Phospholipiden der plastidären Membran freigesetzt (Ishiguro *et al.*, 2001; Hyun *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass DGL für die basale JA-Produktion und die frühe Wund-induzierte JA-Akkumulation in Blättern verantwortlich ist (Hyun *et al.*, 2008), während DAD1 die JA-Produktion in Stamen und die späte Wund-induzierte JA-Akkumulation vermittelt (Ishiguro *et al.*, 2001; Hyun *et al.*, 2008). Neben der räumlich-temporären Spezifität zeigen diese beiden Lipasen der *AtPLA₁-I*-Familie Substratspezifität: DGL bevorzugt in *in vitro*-Analysen Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) und DAD1 nutzt bevorzugt Phosphatidylcholin (PC) (Ishiguro *et al.*, 2001; Hyun *et al.*, 2008). Die entsprechenden Lipasen aus Solanaceen konnten noch nicht identifiziert werden.

Allgemein beginnt die JA-Synthese mit der Bildung der 13-Hydroperoxy-Octadecatriensäure (13-HPOT) aus der freien Linolensäure durch eine 13-LOX (vgl. Abb. A-3, dort ist die JA-Biosynthese mit den beteiligten Enzymen für Kartoffel, das Untersuchungsobjekt dieser Arbeit, dargestellt). Daraus synthetisiert die Allenoxidsynthase (AOS) in einem Dehydrierungsschritt die instabile 12,13-Epoxy-

Octadecatriensäure (12,13-EOT), die stereospezifisch von einer Allenoxidcyclase (AOC) zu (9S, 13S)-12-Oxo-Phytodiensäure (12-OPDA, kurz: OPDA) umgesetzt wird. Diese ersten drei Schritte erfolgen in Chloroplasten, während die weiteren Syntheseschritte in Peroxisomen ablaufen (vgl. Abb. A-3). Dazu muss OPDA zunächst in die Peroxisomen transportiert werden, wobei unklar ist, ob dieser Transport auf der Stufe des OPDA oder des OPDA-CoA-Esters erfolgt. In Arabidopsis konnten anhand von genetischen Daten zwei mögliche Wege für den Import in Peroxisomen vorgeschlagen werden: der peroxisomale ABC-Transporter COMATOSE (CTS/PXA1) und das sog. *anion trapping* („Ionenfalle“) (Theodoulou *et al.*, 2005). Der Exportweg aus den Chloroplasten ist bisher noch ungeklärt. Im nächsten Schritt erfolgt die Reduktion des Cyclopentenon-Ringes durch eine 12-Oxo-Phytodiensäure-Reduktase (OPR) unter Bildung der 12-Oxo-Phytoensäure (OPC8:0). Der letzte Schritt in der Synthese der (+)-7-*iso*-JA ist die Kürzung der Carbonylseitenkette, die in drei sequentiellen β -Oxidationsschritten erreicht wird. Daran sind die Enzyme Acyl-CoA-Synthase (ACS), Acyl-CoA-Oxidase (ACX), ein multifunktionales Protein (MFP) sowie eine L-3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (KAT) beteiligt. (Schaller *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2006; Wasternack, 2006).

Drei verschiedene Regulationsmechanismen wurden für die JA-Biosynthese vorgeschlagen und in einem Übersichtsartikel zusammengefasst (Wasternack, 2007). Zum einen kann eine Regulation über die Verfügbarkeit der Substrate erfolgen, weiterhin über eine positive *feedback*-Regulation der JA-Biosynthesegene und schließlich über die gewebespezifische Expression der Biosyntheseenzyme.

Das (+)-7-*iso*-JA kann in der Pflanze zu einer Reihe von verschiedenen Metaboliten umgesetzt werden. Eine der wichtigsten ist wohl die Reaktion des JAR1, einer JA-Aminosynthetase (Staswick und Tiriyaki, 2004), die das biologisch aktive (+)-7-*iso*-JA-Isoleucin-Konjugat (JA-Ile) synthetisiert (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Browse, 2008). Daneben kann u.a. die Konjugation mit 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) oder weiteren Aminosäuren (Staswick und Tiriyaki, 2004; Staswick, 2009), Methylierung (Seo *et al.*, 2001), Decarboxylierung oder Glycosylierung der Carboxylseitenkette erfolgen oder auch die Hydroxylierung und anschließende Sulfatierung (Miersch *et al.*, 2008) oder Glycosylierung der Pentenylseitenkette (Wasternack, 2007).

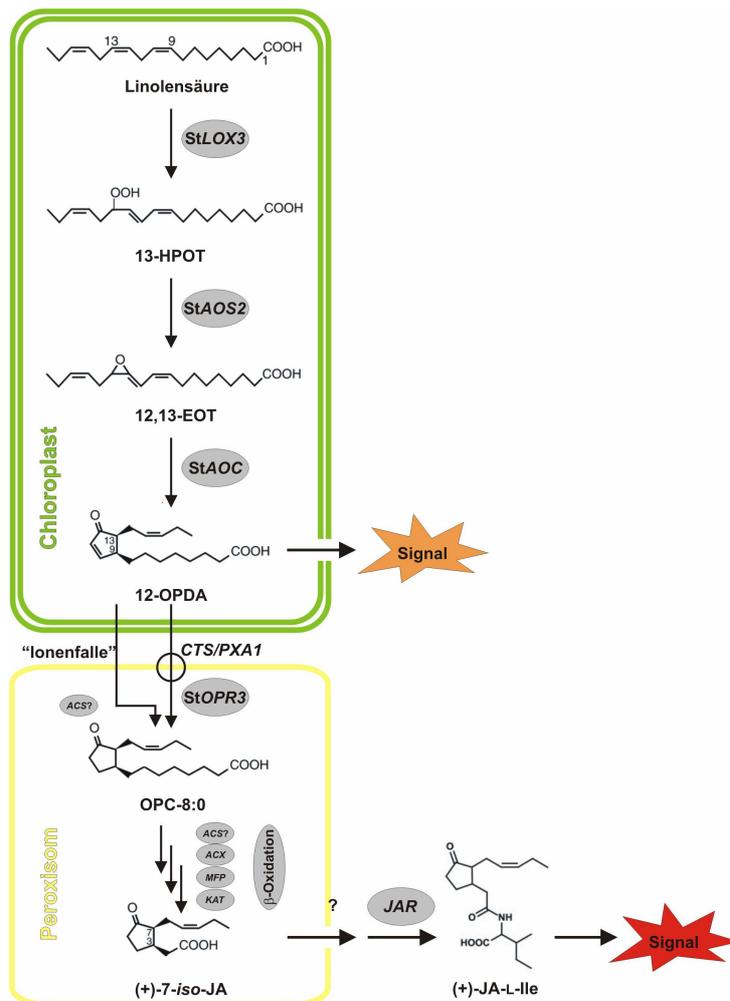


Abb. A-3: JA-Biosynthese in Kartoffel

(verändert nach (Wasternack, 2006; Schaller *et al.*, 2008). Die Synthese beginnt im Chloroplasten mit der Freisetzung von α -Linolensäure durch Lipasen. Die 13-Lipoxygenase StLOX3 (Royo *et al.*, 1996) synthetisiert daraus die 13-Hydroperoxy-Octadecatriensäure (13-HPOT). Diese wird von der Allenoxidsynthase StAOS2 (Farmaki *et al.*, 2007) zu der instabilen 12,13-Epoxy-Octadecatriensäure (12,13-EOT) umgesetzt. Diese wird durch die Allenoxidcyclase StAOC (Farmaki *et al.*, 2007) unter Bildung von *cis*-(+)-12-Oxo-Phytodiensäure (12-OPDA) cyclisiert. Nach Transport ins Peroxisom, vermutlich über den ABC-Transporter (CTS/AtPXA1) oder über *anion trapping* („Ionenfalle“) (Theodoulou *et al.*, 2005), erfolgt ein Reduktionsschritt, katalysiert durch die 12-Oxo-Phytodiensäure-Reduktase StOPR3. Es folgen drei β -Oxidations-schritte zur (+)-7-*iso*-Jasmonsäure ((+)-7-*iso*-JA). Eine JA-Aminosynthetase, in Arabidopsis kodiert durch JAR1 konjugiert die JA im Cytosol an Isoleucin (Staswick und Tiryaki, 2004), wodurch das biologisch aktive (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-Isoleucin ((+)-JA-L-Ile) entsteht (Staswick und Tiryaki, 2004; Fonseca *et al.*, 2009).

2.2 Mechanismus der JA-Perzeption

Die Aufklärung der JA-Wirkungsweise profitierte vornehmlich von der Nutzung der JA-insensitiven Arabidopsis-Mutanten *coil* (*coronatine insensitive 1*), *jar1* (*jasmonate resistant 1*) und *jin1* (*jasmonate insensitive 1*) (Xie *et al.*, 1998; Staswick *et al.*, 2002; Lorenzo *et al.*, 2004). Aus den Arbeiten mit diesen Pflanzen konnte postuliert werden, dass das aktive JA-Signal ein JA-Ile-Konjugat (Staswick und Tiryaki, 2004) ist und dass die Perzeption von JA-Ile zum Abbau von negativen Regulatoren der JA-Antwort über den Ubiquitin-Proteasomweg führt (Xie *et al.*, 1998; Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002).

Das *COI1* kodiert für ein F-Box-Protein (Xie *et al.*, 1998), das Teil eines SCF- (SKP1/Cullin/F-Box) Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist (s. Abb. A-4) (Devoto *et al.*, 2002;

Xu *et al.*, 2002). Diese SCF-Komplexe sind in Pflanzen aus vier Polypeptiden aufgebaut, die zusammen eine funktionale E3-Ubiquitin-Ligase bilden (Vierstra, 2003). Sie bestehen aus dem CUL1-Protein (Cullin), ASK (Arabidopsis SKP-like), RBX (RING-Box) und dem F-Box-Protein, wobei die LRR-Domäne des F-Box-Proteins die spezifische Erkennung des Zielproteins vermittelt. Das Cullin fungiert als „Gerüst“ und bindet sowohl ASK, das mit der F-Box-Domäne des F-Box-Proteins interagiert, als auch RBX. RBX wiederum ist in der Lage über sein RING-Finger-Motiv mit der Ubiquitin (Ub)-„beladenen“ E2-Komponente zu interagieren. Die Ubiquitinierung erfolgt in einer Kaskade aus drei Reaktionsschritten, katalysiert durch die E1-, E2- und E3-Enzymfamilien. Das Ub-aktivierende Enzym E1 aktiviert Ub durch ATP-Hydrolyse und überträgt es auf das Ub-konjugierende Enzym E2. Die Ub-Protein-Ligase (E3) vermittelt den Transfer des Ub auf das Zielprotein, indem es Zielprotein und E2-Ub in geeigneter Weise zueinander positioniert. Polyubiquitinierte (>4 Ubiquitine) Zielproteine werden dann durch das 26S-Proteasom degradiert (Vierstra, 2003; Chow und McCourt, 2006; Somers und Fujiwara, 2009).

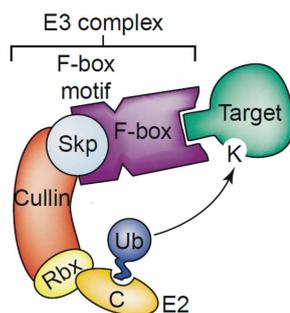


Abb. A-4: Schema des SCF^{COI1}-Komplexes (aus Vierstra, 2003)

Strukturelle Organisation der SCF-E3-Ubiquitin-Ligase (E3-Komplex) in Assoziation mit dem E2-Ub-Intermediat. E3-Ligase bestehend aus dem Cullin, das als Gerüst für das RBX (RING-Box Protein) und SKP (in Pflanzen ASK) dient, sowie dem F-Box-Protein, das von SKP gebunden wird. Das Zielprotein (Target) wird spezifisch von dem F-Box-Protein erkannt und so über den SCF-Komplex mit dem E2-Ub-Intermediat in Kontakt gebracht, dass der Ub-Transfer auf ein Lysin (K) des Targets erfolgen kann. Ub, Ubiquitin.

Mit den JAZ-Proteinen konnten 2007 die Zielproteine identifiziert werden, die von COI1 in Abhängigkeit des JA-Signals gebunden und zum Proteinabbau markiert werden (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Diese JAZ-Proteine bilden innerhalb der TIFY-Familie eine Gruppe von transkriptionellen Regulatoren, die jedoch keine DNA-bindende Domäne enthalten. JAZ-Proteine sind durch zwei Domänen charakterisiert: die ZIM/TIFY-Domäne, über die eine Homo- und Heterodimerisierung der JAZ-Proteine erfolgen kann (Chini *et al.*, 2009; Chung und Howe, 2009) und die C-terminale Jas-Domäne, die eine Interaktion mit COI1 und MYC2 vermittelt (Chini *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2008). Im nicht-induzierten Zustand binden die JAZ-Proteine möglicherweise als Dimere an Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise MYC2 (Chini *et al.*, 2007; Chini *et al.*, 2009) und reprimieren so die Transkription von Genen, die durch diese Transkriptionsfaktoren reguliert werden (s. Abb. A-5). In Analogie zu dem im Mechanismus verwandten Auxin-Signalweg wurde vorgeschlagen, dass diese Reprimierung zusätzlich durch Co-Repressoren vermittelt wird (Browse, 2008; Szemenyei *et al.*, 2008). Auf einen Stimulus hin, der zur Bildung des biologisch aktiven

(+)-JA-Ile (Fonseca *et al.*, 2009) führt, vermittelt JA-Ile die Interaktion der JAZ-Repressorproteine mit dem COI1 (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2008). Durch diese Interaktion mit dem SCF^{COI1}-Komplex erfolgt die Hormon-induzierte Proteolyse der JAZ-Proteine über den Ubiquitin-Proteasomweg. Damit wird die Repression der Transkriptionsfaktoren aufgehoben und die JA-Ile-induzierte Genexpression kann ablaufen (Browse, 2008; Staswick, 2008). Zu den frühen JA-responsiven Genen gehören einerseits die JA-Ile-Biosynthesegene und *MYC2* und andererseits die *JAZ*-Gene selbst, wodurch komplexe Regulationsmechanismen ermöglicht werden (Browse, 2008). Auf der Basis dieser Daten wird der COI1/JAZ-Komplex als JA-Ile-Rezeptor postuliert (Katsir *et al.*, 2008b; Melotto *et al.*, 2008).

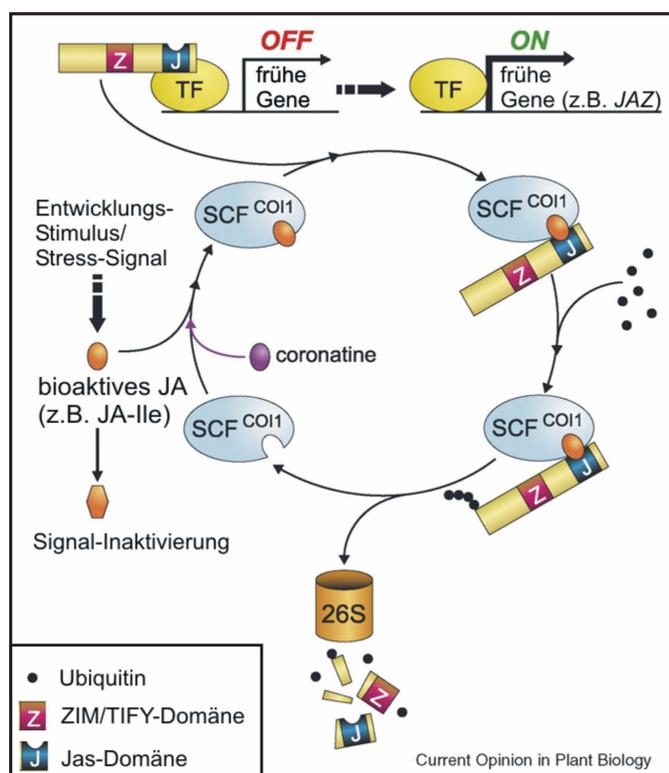


Abb. A-5: Modell der JA-Signaltransduktion (modifiziert aus (Katsir *et al.*, 2008a))

Ohne Stimulus liegen die Transkriptionsfaktoren (TF) der JA-Antwort in einem Komplex mit den JAZ-Proteinen (gekennzeichnet mit der ZIM/TIFY-Domäne und der Jas-Domäne) vor, wodurch die Transkription der frühen JA-responsiven Gene reprimiert wird (OFF). Auf ein externes Stress-Signal oder einen Entwicklungsstimulus reagiert die Pflanze mit der Akkumulation des biologisch aktiven JAs (z.B. JA-Ile, oranges Oval). Dieses vermittelt die Interaktion zwischen der Jas-Domäne der JAZ-Repressoren und dem SCF^{COI1}-Komplex. Dadurch erfolgen die Polyubiquitinierung der JAZ-Proteine und deren anschließende Proteolyse im 26S-Proteasom. Dieser Mechanismus führt somit zur Dereprimierung der JA-responsiven Genexpression (ON). Die Inaktivierung des JA-Signals kann über Metabolisierung des JA-Signalmoleküls (orangefarbenes Hexagon) und Neu-Synthese der JAZ-Repressoren erfolgen.

2.3 Biologische Funktionen der Oxylipine

Oxylipine üben in Pflanzen vielfältige Funktionen sowohl in der Entwicklung als auch in der Interaktion mit Mikroorganismen und Insekten aus (Wasternack, 2006, 2007).

So zeigt JA eine Seneszenz-vermittelnde Wirkung, die sich u.a. in erhöhter JA-Akkumulation sowie JA-responsiver Genexpression während der Seneszenz zeigt. Weiterhin besitzt JA eine Wurzelwachstum-inhibierende Wirkung und verhindert die Samenkeimung. In Tomate wurde die Beteiligung des JA an der Bildung glandulärer Trichome nachgewiesen (Li *et al.*, 2004b). Weiterhin sind JA-insensitive Arabidopsis-

Pflanzen männlich-steril, ein Effekt der auf Defekte in der Antherenformation und Antherendehiszenz sowie der Filament-Elongation zurückgeht (McConn und Browse, 1996; Stintzi und Browse, 2000). Dagegen zeigen JA-insensitive Tomaten eine Fehlbildung der maternalen Samenentwicklung (Li *et al.*, 2004b). In beiden Fällen ist JA scheinbar an der Reproduktion beteiligt, wenn auch in Brassicaceen und Solanaceen auf unterschiedliche Weise. Für OPDA konnte eine Funktion in der Ranken-Windung von *Bryonia spec.* nachgewiesen werden, die unabhängig von JA ist (Blechert *et al.*, 1999). Die Biosynthese-Gene der 9-Oxylipine sind häufig in unterirdischen Organen und Stängeln exprimiert und die Colnensäure, Produkt der Divinylethersynthase-Reaktion, konnte in Kartoffelknollen verestert an Phospholipiden nachgewiesen werden (Fauconnier *et al.*, 2008). Funktionen dieser 9-Oxylipine in der Seitenwurzelentwicklung von *Arabidopsis* und in der Initiierung der Knollenbildung von Kartoffel wurden vermutet (Kolomiets *et al.*, 2001; Vellosillo *et al.*, 2007). Ebenso wurde in Kartoffel für das JA-Derivat 12-Hydroxy-JA (Tuberonsäure) eine Knollen-initiiierende Wirkung beschrieben (Yoshihara *et al.*, 1989).

Neben den Funktionen in der Entwicklung der Pflanzen existieren zahlreiche Beispiele für Funktionen der Oxylipine in der Stressbewältigung. Beispielsweise wurde postuliert, dass Oxylipinen eine Funktion für die Bewältigung von oxidativem Stress, als *Scavenger* freier Radikale und als Signalkomponenten zukommt (Göbel *et al.*, 2003; Müller, 2004; Mueller *et al.*, 2008b; Ritter *et al.*, 2008). Als Signalkomponenten induzieren Oxylipine eine Reihe von Abwehr-assoziierten Genen, u.a. Verwundungs-Marker, Transkriptionsfaktoren und Biosynthesegene für Sekundärmetaboliten (Devoto *et al.*, 2005; Taki *et al.*, 2005; Pauwels *et al.*, 2008). Die Bedeutung der JA-induzierten Abwehrgenexpression für die Interaktion mit Herbivoren zeigt sich an der Anfälligkeit JA-insensitiver bzw. -defizienter Pflanzen gegenüber Herbivor-Fraß (Kessler *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004b; Wasternack, 2006; Schilmiller *et al.*, 2007). Neben den direkten Abwehrantworten können Herbivor-attackierte Pflanzen Signale zur Anlockung von Fress-Feinden abgeben. Bei einigen dieser Signale kann es sich ebenfalls um Oxylipine handeln (Turlings und Ton, 2006; Dicke *et al.*, 2009).

Für Gerste, *Medicago* und Tomate wird zudem eine Rolle der Jasmonate in der Interaktion mit symbiontischen Pilzen postuliert (Hause *et al.*, 2002; Isayenkov *et al.*, 2005; Tejeda-Sartorius *et al.*, 2008).

Eine Funktion der 9-Oxylipine in der Pathogenabwehr von Pflanzen wird vermutet, da beispielsweise 9-Oxylipine in Kartoffel während der Interaktion mit *P. infestans* und nach Elicitor-Behandlung akkumulieren (Weber *et al.*, 1999; Göbel *et al.*, 2001) und eine antimikrobielle Wirkung für diese nachgewiesen wurde (Weber *et al.*, 1999; Prost *et al.*, 2005). Während in Tabak, *Arabidopsis* und auch Mais eine Funktion dieser 9-Oxylipine für die Resistenz gegenüber Pathogenen identifiziert wurde (Rancé *et al.*, 1998; Vellosillo *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008), ist die genaue Rolle der 9-Oxylipine für die

Pathogenabwehr in Kartoffel noch nicht aufgeklärt (Eschen-Lippold *et al.*, 2007; Fauconnier *et al.*, 2008).

Im Hinblick auf die 13-Oxylipine wurde hauptsächlich die Funktion des JA bzw. seiner biologisch aktiven Metaboliten untersucht. So zeigen die *fad3-2 fad7-2 fad8* Mutante, mit einem Defekt in der Synthese der Linolensäure (Vijayan *et al.*, 1998) und die *jar1-1* Mutante, die nicht in der Lage ist, das biologisch aktive JA-Ile-Konjugat zu synthetisieren (Staswick *et al.*, 1998), erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem Wurzelpathogen *Pythium mastophorum* bzw. dem Bodenzpilz *Pythium irregulare*. Ein Defekt in *COII*, das für den putativen Co-Rezeptor des JA-Ile kodiert (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Katsir *et al.*, 2008b), führt ebenso zu erhöhter Suszeptibilität gegenüber den nekrotrophen Pathogenen *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea* und *Erwinia carotovora* (Thomma *et al.*, 1998; Brader *et al.*, 2001). Weiterhin konnte eine Akkumulation von JA und OPDA in Kartoffel-Blättern nachgewiesen werden, die mit einem avirulenten *Pseudomonas*-Stamm infiziert worden waren. In den nicht-infizierten Blättern dieser Pflanzen akkumulierte jedoch lediglich OPDA (Landgraf *et al.*, 2002), so dass für OPDA eine Funktion in der induzierten Resistenz angenommen wird. In *Arabidopsis* ist OPDA an der Abwehr gegen *A. brassicicola* und *B. cinerea* beteiligt (Stintzi *et al.*, 2001; Raacke *et al.*, 2006).

In vielen Pflanzen induzieren nicht-pathogene Rhizobakterien einen Zustand der Resistenz gegen ein weites Spektrum von Pathogenen (Van der Ent *et al.*, 2009). Die Ausbildung dieser induzierten systemischen Resistenz (ISR) ist sowohl abhängig von einem funktionalen JA- und Ethylen (ET)-Signalweg (Pieterse *et al.*, 1998) als auch von der regulatorischen Funktion des *AtMYC2* (Pozo *et al.*, 2008).

2.4 Die Wechselwirkung verschiedener Phytohormone in der pflanzlichen Immunabwehr

In der pflanzlichen Pathogenabwehr stellen neben dem Oxylipin JA auch andere Phytohormone wie Ethylen (ET) und Salizylsäure (SA) wichtige Komponenten des regulatorischen Netzwerkes dar. Dabei nutzen Pflanzen SA vor allem für die Abwehr von biotrophen und hemibiotrophen Pathogenen, während JA zusammen mit ET in die Abwehr gegen nekrotrophe Pathogene involviert ist. Biotrophe Pathogene sind strikt auf einen lebenden Wirt angewiesen, der sie mit Nährstoffen versorgt, während Nekrotrophe das pflanzliche Gewebe abtöten und von dem toten Material leben. Hemibiotrophe leben im Anfangsstadium der Infektion biotroph und schalten später auf eine nekrotrophe Lebensweise um (Glazebrook, 2005). Vor allem in *Arabidopsis* ist eine antagonistische Wirkung des SA- und JA/ET-Wegs beschrieben worden (Glazebrook, 2005). So zeigen beispielsweise JA-insensitive *Arabidopsis coi1*-Mutanten eine erhöhte Anfälligkeit gegen

nekrotrophe Pathogene, die mit einer reduzierten Expression von JA-assoziierten Abwehrgenen einhergeht. Dagegen sind sie, ebenso wie *jin1/myc2*-Pflanzen, gegenüber dem hemibiotrophen Pathogen *Pst* DC3000 resistenter, und es wurde postuliert, dass der Grund hierfür stark erhöhte SA-Level und die konstitutive Expression des *PR1* sind (Feys *et al.*, 1994; Kloek *et al.*, 2001; Laurie-Berry *et al.*, 2006). Die SA-Antworten werden normalerweise von Coronatin (COR) unterdrückt, einem Phytotoxin einiger Pseudomonaden, das strukturell dem JA-Ile ähnelt (Feys *et al.*, 1994; Kloek *et al.*, 2001; Laurie-Berry *et al.*, 2006). Coronatin ist ebenso wie JA-Ile in der Lage die Interaktion zwischen COI1 und den JAZ-Proteinen zu vermitteln und induziert so den JA-Weg (Feys *et al.*, 1994; Katsir *et al.*, 2008b; Spoel und Dong, 2008).

Entsprechend dem Modell der antagonistischen Wirkung von SA und JA führen Mutationen in Genen von regulatorischen Komponenten dieser Wege zu gegensätzlichen Effekten auf den SA- bzw. JA-Signalweg und auf die Resistenz gegenüber biotrophen und nekrotrophen Pathogenen (Pieterse *et al.*, 2009). Eine solche Komponente ist *NONEXPRESSOR OF PR GENES 1 (NPR1)*, das als Redoxstatus-abhängiger transkriptioneller Co-Aktivator zusammen mit den TGA-Transkriptionsfaktoren die SA-abhängige Genexpression reguliert (Mou *et al.*, 2003). In *npr1* Arabidopsis-Pflanzen wurde eine Inhibierung der SA-vermittelten Suppression des JA-Signalweges beschrieben, die auf eine Funktion des NPR1 in der Vermittlung des *Cross-Talks* zwischen SA und JA hinweist (Spoel *et al.*, 2003). So werden beispielsweise über 200 Methyljasmonat (MeJA)-induzierbare Gene durch SA in ihrer Expression unterdrückt, ca. 60% davon in Abhängigkeit von NPR1 (Leon-Reyes *et al.*, 2009). Neben NPR1 ist Glutaredoxin 480 (GRX 480) ein Interaktor des TGA2.2 Transkriptionsfaktors. GRX 480 reguliert unterhalb von NPR1 einen Teil der JA-responsiven Gene negativ und könnte damit im SA/JA-*Cross-Talk* fungieren (Ndamukong *et al.*, 2007). An der SA-Antwort der Pflanzen unterhalb von NPR1 sind weiterhin zahlreiche WRKY-Transkriptionsfaktoren beteiligt (Van der Ent *et al.*, 2009) u.a. WRKY70 (Li *et al.*, 2004a). Dieser agiert als positiver Regulator der SA- und negativer Regulator der JA-induzierten Genexpression (Li *et al.*, 2004a; Ren *et al.*, 2008). Die Beteiligung von NPR1 und GRX 480 am *Cross-Talk* zwischen SA und JA könnte auf eine Regulation des *Cross-Talks* über den Redox-Status hindeuten. Erhöhte Level an Glutathion wurden z.B. in Arabidopsisblättern nachgewiesen, in denen die MeJA-induzierte *PDF1.2*-Expression durch Vorbehandlung mit SA unterdrückt wurde (Koornneef *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu WRKY70 reguliert die MAPK MPK4 den *Cross-Talk* zwischen SA und JA als negativer Regulator der SA- und positiver Regulator der JA-Antwort. In Arabidopsis *mpk4* Mutanten sind die SA-Level drastisch erhöht, ebenso wie die Expression der SA-Markergene *PR1*, *PR2* und *PR5* (Petersen *et al.*, 2000). Dagegen ist *PDF1.2*, ein Markergen des JA-Weges, in seiner Transkriptakkumulation nach MeJA-Behandlung herabgesetzt. Diese veränderte Abwehr-Genexpression korreliert mit einer erhöhten Resistenz gegenüber den (hemi-) biotrophen Pathogenen *Pst* DC3000 und

Hyaloperonospora arabidopsidis, sowie zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *A. brassicicola* (Petersen *et al.*, 2000; Brodersen *et al.*, 2006). Der Mechanismus der Einflussnahme von MPK4 auf den SA/JA *Cross-Talk* bleibt vorerst unklar, da die Expression von *NahG* in *mpk4*-Mutanten nicht zu einer Revertierung der Unterdrückung der *PDF1.2*-Expression führt (Petersen *et al.*, 2000). Somit sind die erhöhten SA-Level in den *mpk4*-Mutanten nicht die Ursache für die Repression des JA-Weges (Petersen *et al.*, 2000). Weitere Faktoren die das Ergebnis der Wechselwirkung zwischen SA und JA beeinflussen könnten sind u.a. ET, das als Modulator des SA/JA *Cross-Talk* identifiziert wurde (Leon-Reyes *et al.*, 2009), sowie Phosphorylierung und Ubiquitinierung von NPR1 (Spoel *et al.*, 2009). Die Bedeutung dieser Mechanismen für den SA/JA *Cross-Talk* ist jedoch noch nicht untersucht.

Das Phytohormon ET zeigt häufig eine synergistische Wirkungsweise zu JA. Dies zeigt sich u.a. am Beispiel des Marker-Gens *PDF1.2*, für dessen Expression sowohl der funktionale ET- als auch JA-Weg benötigt wird (Penninckx *et al.*, 1998). Dieses Muster wird in globalen Genexpressionsstudien bestätigt, die eine starke Überlappung der durch ET bzw. JA aktivierten Gene nachweisen (Schenk *et al.*, 2000). ERF1 und ORA59 sind Transkriptionsfaktoren mit regulatorischen Funktionen in diesem Signalweg, deren Expression sowohl von JA als auch ET induziert wird (Lorenzo *et al.*, 2003; Pre *et al.*, 2008). Überexpression von ERF1 oder ORA59 in ET- oder JA-insensitiven Arabidopsis-Pflanzen induziert konstitutive *PDF1.2*-Expression, womit nachgewiesen ist, dass diese Transkriptionsfaktoren unterhalb der ET- bzw. JA-Akkumulation agieren (Lorenzo *et al.*, 2003; Pre *et al.*, 2008). ERF1 ist ein positiver Regulator der Abwehr-assoziierten Genexpression, während wundinduzierbare Gene von ERF1 negativ reguliert werden (Lorenzo *et al.*, 2004). Der zentrale Transkriptionsfaktor der JA-Antwort MYC2 reguliert die JA-vermittelte Wund-Antwort positiv, die JA-vermittelte Expression von Pathogenabwehr-Genen hingegen negativ (Lorenzo *et al.*, 2004). Erst die Kombination von JA und ET scheint die Pathogen-induzierte Abwehrgenexpression zu induzieren, während JA allein, die Pathogenabwehr unterdrückt und Wund-Antworten via MYC2 vermittelt. Andererseits ist die Expression von MYC2 nach der Erkennung von Rhizobakterien induziert und MYC2 scheint für die Ausbildung der ISR, einen Zustand erhöhter Pathogen-Resistenz, benötigt zu werden (Pozo *et al.*, 2008).

Das Spektrum der ET-abhängigen Antworten wird z.B. durch globale Genexpressionsanalysen in *Pseudomonas*-infizierten Arabidopsis-Pflanzen erweitert, die einen inhibierenden Einfluss des ET-Weges auf die SA-responsive Genexpression zeigten (Glazebrook *et al.*, 2003).

Neben den drei zentralen Regulatoren der pflanzlichen Abwehr SA, JA und ET besitzen auch andere Phytohormone eine Funktion in der Abwehr. Zudem können Pathogene gezielt in das Netzwerk der Phytohormon-regulierten Abwehr eingreifen, um die Physiologie der Pflanze zu ihren Gunsten zu verändern (Spoel und Dong, 2008; Bari und Jones, 2009). Beispielsweise agiert Auxin antagonistisch zu SA und fördert so die

Suszeptibilität gegenüber Bakterien. In der PTI kann die Perzeption von flg22 zur Inhibierung des Auxinweges führen. Diese Inhibierung, vermutlich vermittelt durch SA, ist Teil der Abwehr gegen (hemi-) biotrophe Pathogene (Navarro *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Einige Pathogene wie z.B. *Ralstonia solanacearum* sind in der Lage Auxin selbst zu synthetisieren (Valls *et al.*, 2006), während andere, wie *Pseudomonas*, Effektoren zu besitzen scheinen, die die Auxin-Homöostase der Pflanzen modulieren, um die Virulenz zu fördern (Chen *et al.*, 2007). *Agrobacterium* bringt über das Ti-Plasmid Gene zur Synthese von Auxin und Cytokinin in die Wirtszelle ein und induziert so das unkontrollierte Gallenwachstum infizierter Pflanzen (Spoel und Dong, 2008). Cytokinin-Produktion wurde zudem für einige biotrophe, nicht aber für nekrotrophe Pathogene nachgewiesen (Walters und McRoberts, 2006).

Abscisinsäure (ABA) scheint allgemein ein negativer Regulator der pflanzlichen Abwehr zu sein. Pflanzen mit Mutationen in der ABA-Biosynthese oder dem ABA-Signalweg sind häufig resistenter gegenüber Pathogenen (Anderson *et al.*, 2004; Adie *et al.*, 2007; de Torres-Zabala *et al.*, 2007), und ABA wirkt sich negativ auf die Ausbildung der SAR aus (Yasuda *et al.*, 2008). Die Akkumulation von ABA während *P. syringae*-Infektion scheint ebenfalls einen Effektor-vermittelten Virulenzmechanismus darzustellen (de Torres-Zabala *et al.*, 2007). Auf der anderen Seite wurde für die Abwehr von Arabidopsis gegen *P. irregulare* eine positive Funktion des ABA nachgewiesen (Adie *et al.*, 2007). Ein weiterer positiver Einfluss von ABA besteht in seiner Funktion während des PAMP-induzierten Schließens der Stomata (Melotto *et al.*, 2006).

Gibberellin scheint ebenfalls Einfluss auf die Pathogenabwehr zu nehmen, da Arabidopsis-Pflanzen mit Mutationen in vier DELLA-Proteinen, den negativen Regulatoren der Gibberellin-Antwort, eine erhöhte Suszeptibilität gegen nekrotrophe und erhöhte Resistenz gegen biotrophe Pathogene zeigen (Navarro *et al.*, 2008). Dieser Mechanismus wird offenbar von dem nekrotrophen Reis-Pathogen *Gibberella fujikuroi* ausgenutzt, der Gibberellin als Virulenzmechanismus produziert, um über die Proteolyse der DELLA-Proteine die Suszeptibilität der Pflanzen zu fördern (Navarro *et al.*, 2008).

In einigen phytopathogenen Pilzen wie *Fusarium* oder *Aspergillus* spp. kommen endogen auch Oxylipine vor, die in diesen Organismen die Sporulation und Mycotoxin-Synthese positiv regulieren (Tsitsigiannis und Keller, 2007). In Maissamen scheinen 9-Oxylipine u.a. einen Suszeptibilitätsfaktor für die Pathogene *Fusarium verticillioides* und *Colletotrichum graminicola* darzustellen, da das *Silencing* einer 9-LOX zu reduzierter Konidien-Bildung führt. (Gao *et al.*, 2007; Tsitsigiannis und Keller, 2007).

Alles in allem bildet der regulatorische *Cross-Talk* zwischen den Phytohormonen für die Pflanze die Basis für die gezielte Abwehr der unterschiedlichen Pathogene. Gleichzeitig bietet dieses Netzwerk den angepassten Pathogenen eine Möglichkeit die Abwehr der Pflanze so zu manipulieren, dass ihnen die Besiedelung der Pflanze gelingt.

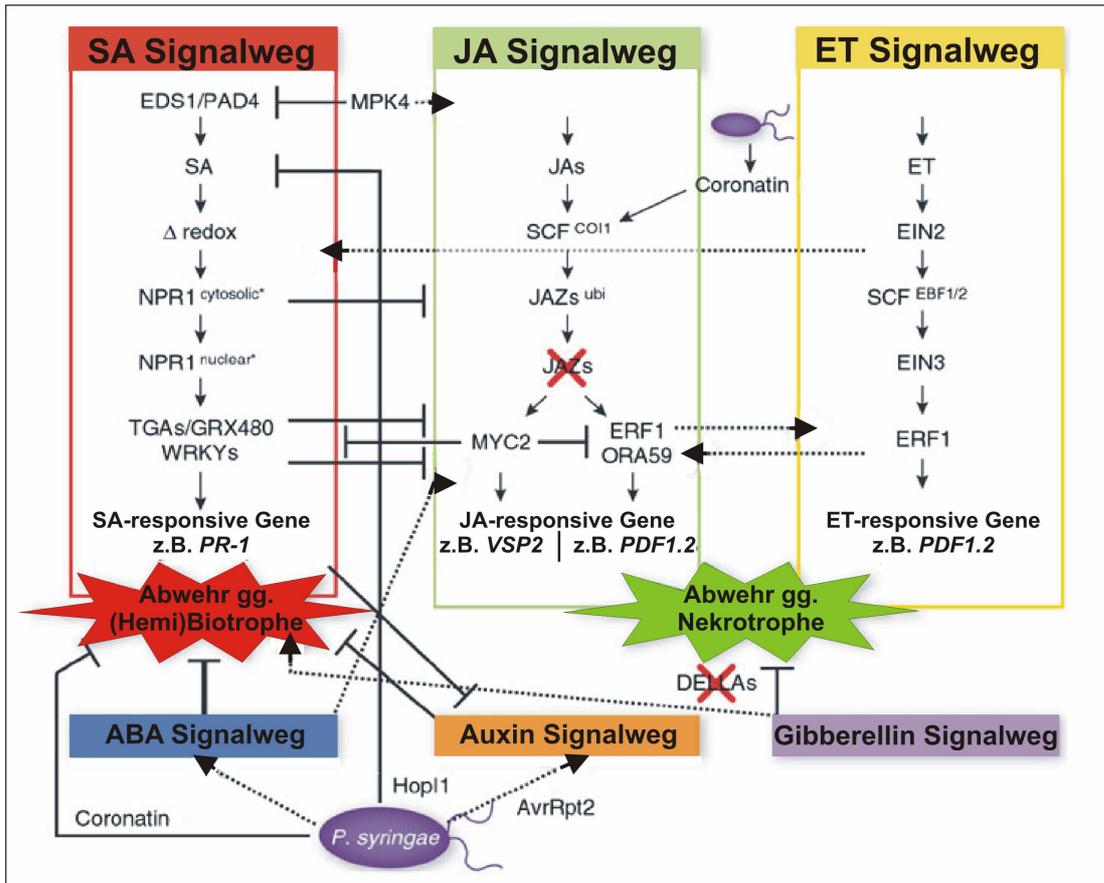


Abb. A-6: Netzwerk der hormonellen Regulation in der pflanzlichen Immunabwehr
(modifiziert, aus Pieterse [2009])

Dargestellt sind der SA-, JA- und ET-Signalweg mit den jeweiligen Hauptsignalkomponenten. Diese drei Wege stellen die zentralen Abwehr-Mechanismen der Pflanze dar. Die wechselseitigen Einflüsse sind mit gestrichelten Pfeilen (positiver Effekt) bzw. blockierenden Linien (negativer Effekt) markiert. Zusätzlich sind die Einflüsse des ABA-, Auxin- und Gibberellin-Weges auf die SA- und JA/ET-regulierten Abwehrmechanismen gezeigt. Als Beispiel für den Eingriff eines Pathogens in dieses Netzwerk dient in der Abbildung das bakterielle Pathogen *P. syringae* mit seinen Effektoren HopI1 und AvrRpt2, sowie dem Phytotoxin Coronatin. Näheres s. Text.

3. Zielsetzung der Arbeit

Die Co-Evolution der pflanzlichen Abwehr und der pathogenen Virulenzstrategien (Jones und Dangl, 2006; Ma und Guttman, 2008) führt zur Ausprägung von molekularen Mechanismen, die nach evolutionären Aspekten in eine Art Abfolge aus PAMP-induzierter Immunität, Effektor-vermittelter Suszeptibilität und Effektor-vermittelter Resistenz gegliedert werden können (s. auch Kap. 2 der Einleitung). Gängige Modelle erklären die Effektor-vermittelte Erkennung der Pathogene durch pflanzliche R-Proteine innerhalb des sog. „Guard“-Modells, das neuerdings durch das „Decoy“-Modell erweitert wird (van der Hoorn und Kamoun, 2008; Zhou und Chai, 2008; Zipfel und Rathjen, 2008). Weiterhin lassen sich die Abwehrmechanismen der Pflanzen in die Abwehr gegen nekrotrophe und biotrophe Pathogene unterteilen (Glazebrook, 2005). Dabei wird JA im Allgemeinen eine Funktion in der pflanzlichen Abwehr gegenüber nekrotrophen Pathogenen zugeschrieben. Dem gegenüber steht die Abwehr gegen biotrophe Pathogene, die hauptsächlich durch SA vermittelt wird. Dieses Modell der antagonistischen Wirkung von JA und SA (Thomma *et al.*, 1998) in der Pathogenabwehr wird jedoch zunehmend hinterfragt, da neuere Daten auf komplexere Regulationsmechanismen hindeuten. Somit kann es von Interesse sein, neben der verbreiteten Modellpflanze Arabidopsis auch weitere Pflanzen und die Interaktion mit deren Pathogenen zu studieren.

Eine häufig untersuchte Interaktion ist die des eukaryotischen Pathogens *P. infestans* mit seinem Wirt, der Kartoffel. Der hemibiotrophe Oomycet *P. infestans* stellt für Kartoffel ein sehr gut adaptiertes Pathogen dar und es lässt sich vermuten, dass dieser Interaktion ein evolutionär langer Anpassungszeitraum zugrunde liegt (Kamoun, 2005; Fry, 2008).

Die Rolle der 13-Oxylipine, im Besonderen von JA, auf diese Interaktion sollte Gegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit sein. Dabei sollte sowohl die kompatible Interaktion zwischen suszeptiblen Kartoffelpflanzen der Sorte Désirée und dem *P. infestans*-Isolat 208m2 (F. Mauch, Universität de Fribourg, Schweiz, (Si-Ammour *et al.*, 2003)), als auch die inkompatible Interaktion zwischen R1-Gen-tragenden Désirée-Kartoffelpflanzen (C. Gebhardt, MPI Köln) und *P. infestans* 208m2 betrachtet werden. Als Strategie zur Aufdeckung möglicher Funktionen der 13-Oxylipine in diesen Interaktionen wurde die Expression von RNAi-Konstrukten gegen die JA-Biosynthesegene *StAOC* und *StOPR3* sowie gegen *StCOII*, das die zentrale Signalkomponente des JA-Weges kodiert, in suszeptiblen und resistenten Kartoffelpflanzen genutzt. In diesen Pflanzen sollte sowohl das Wachstum von *P. infestans* analysiert werden, als auch eine Charakterisierung der Expression von Markergenen der pflanzlichen Abwehr erfolgen.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit sollte in der weiterführenden Analyse der Funktion der Oxylipine in der PAMP-vermittelten Abwehr in Kartoffel bestehen. Als Modell diente dabei Pep-13, ein PAMP von *Phytophthora*-Spezies (Brunner *et al.*, 2002), welches nach Infiltration in Kartoffelblättern die Akkumulation von JA induziert (Halim *et al.*, 2004). Auch für diesen Teil der Arbeit wurden die oben genannten transgenen RNAi-Pflanzen genutzt. Mit diesen wurde die Abhängigkeit der Pep-13-induzierten Antworten, wie z.B. der Bildung der HR und der induzierten Genexpression, von den Signalsubstanzen OPDA und/oder JA, sowie der Signalkomponente StCOI1 analysiert. Ein wichtiger Aspekt lag dabei auf der Durchführung von globalen Expressionsanalysen in Pep-13-behandelten Wildtyp- und RNAi-Pflanzen mit Hilfe von Microarrays. Diese Analysen sollten einerseits Aussagen zu der Reaktion der Wildtyp-Pflanzen ermöglichen, da Expressionsanalysen nach Pep-13-Behandlung bisher nicht in diesem Umfang durchgeführt wurden. Andererseits sollten Octadecanoid-regulierte Kandidatengene der Pep-13-Signalkaskade identifiziert werden.

Zusätzlich sollte die Interaktion von Kartoffelpflanzen mit dem nekrotrophen, pilzlichen Pathogen *B. cinerea* untersucht werden, für das in Arabidopsis eine Abhängigkeit der Abwehr von JA beschrieben wurde (Thomma *et al.*, 1998). Hierfür erfolgte zunächst die Charakterisierung der Interaktion in Wildtyp-Pflanzen, wobei die Akkumulation der Signalsubstanzen SA und JA, sowie die Genexpression von Markergenen der pflanzlichen Abwehr betrachtet wurden. Anschließend wurden Wachstumsassays auf den JA-defizienten bzw. JA-insensitiven RNAi-Pflanzen durchgeführt, um die Rolle der 13-Oxylipine in Kartoffelpflanzen für die Abwehr gegen *B. cinerea* zu ermitteln.

B MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Pflanzen

Für alle Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden Pflanzen der Kartoffelsorte Désirée verwendet (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée). Die Sorte Désirée trägt kein bekanntes R-Gen und ist gegenüber dem verwendeten *P. infestans*-Stamm (s. B 1.3) suszeptibel (r1- Hintergrund).

Als Vektorkontrolle für die Experimente im r1-Hintergrund dienten die Linien B2 und E4, bei denen es sich um Wildtyp Désirée Pflanzen handelte, die mit dem Vektor pGPTV (ohne Insert) transformiert worden waren (A. Weinel).

Neben Wildtyp-Pflanzen und den Vektorkontrollen kamen transgene Pflanzen zum Einsatz. Diese exprimierten im r1-Hintergrund RNAi-Konstrukte (s. Anhang III) gegen die *StAOC* (Linie F1 und Z4), *StOPR3* (Linie A3 und Z2) bzw. *StCOII* (Linie H1 und X5) (Halim *et al.*, 2009).

Weiterhin wurden Désirée-Kartoffelpflanzen verwendet (Linie 10-23), die mit dem R1-Gen transformiert worden waren ((Ballvora *et al.*, 2002), zur Verfügung gestellt von C. Gebhardt, MPIZ Köln). Für die Experimente mit den Désirée-R1-Pflanzen diente die Linie LV-41 als Vektorkontrolle (ebenfalls zur Verfügung gestellt von C. Gebhardt, MPIZ Köln).

Die Linie 10-23 wurde des Weiteren genutzt, um JA-defiziente bzw. –insensitive Pflanzen im resistenten Hintergrund herzustellen (Linien S1-S9, s. Tabelle B-1). Dazu wurde die Linie 10-23 mit dem *A. tumefaciens*-Stamm AGLO transformiert, der die jeweiligen oben genannten RNAi-Konstrukte in einem modifizierten pHELLSGATE8-Vektor exprimierte (Wesley *et al.*, 2001), in dem die Kanamycin-Resistenzkassette durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ausgetauscht worden war (zur Verfügung gestellt von L. Eschen-Lippold; s. Anhang A I-II).

RNAi-Konstrukt	genetischer Hintergrund	Präfix	Linie
StAOC	WT Désirée (r1)	S4	S4
	LV-41 (r1)	S5	D1, E1
	10-23 (R1)	S6	AB1, C4, K8, X1
StOPR3	WT Désirée (r1)	S1	K1, X2
	LV-41 (r1)	S2	-
	10-23 (R1)	S3	V3, W1, Ai2, Z5
StCO11	WT Désirée (r1)	S7	B1, N1 (Q1)
	LV-41 (r1)	S8	C5, E5
	10-23 (R1)	S9	C7, E2, O1, Y1

Tabelle B-1: Übersicht über die verwendeten Linien S1-S9

Die Pflanzen wurden in Gewebekultur als Spross-Stecklinge steril angezogen und vermehrt. Es wurde 2MS-Medium (0,441% (w/v) MS-Salze, 2% (w/v) Saccharose, 0,05% (w/v) MES, 0,6% (w/v) Plant Agar, pH 5,8; Murashige und Skoog, 1962) für die Anzucht verwendet, wobei dem Medium 1 ml einer Vitaminlösung (0,5 mg/ml Nicotinsäure; 0,5 mg/ml Pyridoxin \times HCl; 0,1 mg/ml Thiamin \times HCl; 2 mg/ml Glycin) sowie zur Selektion Kanamycin (50 μ g/ml) und Carbenecillin (250 mg/ml) (r1-Pflanzen) bzw. Hygromycin (3 μ g/ml) und Carbenecillin (R1-Pflanzen) zugegeben wurde. Ca. drei bis vier Wochen nach dem Umsetzen wurden die dann bewurzelten Stecklinge in gedämpftes Erde-Sand-Gemisch (1:1) ausgetopft und in Phytokammern unter konstanten Bedingungen (16 h Licht 22°C, 8 h Dunkelheit 18°C, 200 μ E) ca. drei Wochen bis zur Durchführung der Experimente kultiviert.

Um Pflanzen vollständig (inklusive Wurzeln) ernten zu können, erfolgte in einem Experiment die Anzucht auf Perlite (Kammlott Gärtnereibedarf, Erfurt). Dazu wurden Stecklinge in Perlite getopft, das mit MS-Lösung (0,441% (w/v) MS-Salze mit Vitaminen, (Murashige und Skoog, 1962)) getränkt und in Töpfe gefüllt worden war, die mit Plastiktüten ausgekleidet waren. Je nach Bedarf wurde alle drei bis vier Tage mit MS-Lösung gegossen. Die Anzucht erfolgte, ebenso wie für in Erde angezogene Pflanzen in Phytokammern (s. oben).

1.2 Bakterien

1.2.1 *Escherichia coli*

Für die Klonierungen wurden chemokompetente DH5 α -Zellen verwendet. Diese wurden bei 37°C auf LB-Platten (1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 0,5% Natriumchlorid, 1,5% Agar; 50 μ g/ml Kanamycin bzw. Ampicillin) angezogen.

1.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Es wurde der *A. tumefaciens*-Stamm AGLO verwendet. Die Kultivierung erfolgte auf LB-Platten (s. B 1.2.1) bei 28°C.

1.3 *Phytophthora infestans*

Für die Infektionsexperimente mit *P. infestans* wurde das Isolat 208m2 verwendet, das mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) transformiert worden war (zur Verfügung gestellt von F. Mauch, Universität de Fribourg, Schweiz, (Si-Ammour *et al.*, 2003)). Die Anzucht von *P. infestans* erfolgte auf Schrägagar unter Verwendung von Hafer-Bohne-Medium (3,4% (w/v) Bohnenmehl; 1,7% (w/v) Hafermehl; 8,5% (w/v) Saccharose; 1,5% (w/v) Agarose) in einer Dunkelkammer bei 18°C über 12 Tage.

1.4 *Botrytis cinerea*

Der *Botrytis cinerea* Stamm B05.10 wurde auf PDA-Platten (*potato dextrose agar*, mit 1,25% (w/v) Kartoffelpüree-Pulver) in einem Klimaschrank (20°C, 60% Luftfeuchtigkeit) angezogen.

1.5 Pep-13/W2A

Die Peptide Pep-13 (VWNQPVRGFKVYE) und W2A (VANQPVRGFKVYE) wurden freundlicherweise von S. Krüger hergestellt.

1.6 Liste verwendeter Chemikalien

Acetonitril (HPLC grade)	-	Fluka
SeaKem® LE Agarose	-	Biozym
Ammoniumthiocyanat	-	Carl Roth GmbH+Co
β-Aminobuttersäure	-	Sigma
Cabencillin Disodium	-	Duchefa Biochemie
Chloralhydrat	-	Riedel-de Haen
Chloroform	-	
3,3-Diaminobenzidin	-	Sigma
N,N-Dimethylformamid	-	Sigma

EDTA	-	Carl Roth GmbH+Co
Ethanol		
Ethidiumbromid	-	Carl Roth GmbH+Co
Formaldehyd (min. 37%)	-	Merck
Formamid	-	Calbiochem
Gamborg B5-Medium mit Vitaminen	-	Duchefa Biochemie
Glyzerin	-	Carl Roth GmbH+Co
Guanidininthiocyanat	-	Carl Roth GmbH+Co
Hefe-Extrakt	-	Difco
Hygromycin B	-	Duchefa Biochemie
Kanamycin Monosulfat	-	Duchefa Biochemie
Natriumacetat	-	Merck
Natriumazid	-	Sigma
Natriumchlorid	-	Carl Roth GmbH+Co
Natriumhydroxid	-	Merck
p-Nitrotetrazoliumblausulfat	-	Carl Roth GmbH+Co
MES	-	Carl Roth GmbH+Co
Methanol (HPLC grade)	-	Carl Roth GmbH+Co
Milchsäure	-	Carl Roth GmbH+Co
MOPS	-	Carl Roth GmbH+Co
Murashige & Skoog Medium mit Vitaminen	-	Duchefa Biochemie
Pentafluorbenzylbromid	-	Sigma
Phenol	-	Fluka
Phenol (RNA)	-	Carl Roth GmbH+Co
Plant Agar	-	Duchefa Biochemie
2-Propanol	-	Merck
Saccharose	-	Riedel-de Haen
Salizylsäure	-	Sigma
SDS	-	Serva
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	-	Carl Roth GmbH+Co
Tris	-	Carl Roth GmbH+Co
Trypan-Blau	-	Sigma

2. Methoden

2.1. Klonierung von Konstrukten

Alle Klonierungen der RNAi-Konstrukte wurden unter Verwendung der Gateway®-Technologie (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Die RNAi-Konstrukte (s. Anhang III und IV) wurden über eine Standard-PCR aus cDNA von Kartoffelblättern unter Verwendung von CACC-erweiterten 3'Primern amplifiziert und in pENTRTM kloniert (Invitrogen, Karlsruhe). Der Vektor wurde in Top10-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) oder DH5a-Zellen transformiert. Für die Transformation von Kartoffelpflanzen mit den Konstrukten erfolgte im zweiten Schritt die Klonierung in den binären pHELLSGATE8-Vektor ((Wesley *et al.*, 2001), s. Anhang I und II). Für die Linien S1-S9 (s. B 1.1) wurde ein modifizierter pHELLSGATE8-Vektor mit Hygromycin-Resistenz (zur Verfügung gestellt von L. Eschen-Lippold) verwendet. Die RNAi-Fragmente der Kandidatengene aus den Microarray-Analysen wurden in den ursprünglichen pHELLSGATE8-Vektor (Kanamycin-Resistenz, Genbank-Eintrag AF489904) kloniert.

Das *BcCutA*-Fragment (van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1997) wurde unter Verwendung der Primer *BcCutA_5* und *BcCutA_3_600* (s. Anhang V) amplifiziert und in den Vektor pCR®2.1 (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend dem beiliegenden Protokoll des *TA cloning*® Kit kloniert. Anschließend erfolgte die Transformation von chemokompetenten *E. coli* DH5α-Zellen (zur Verfügung gestellt von A. Weinel/U. Smolka). Dazu wurden 100 µl der DH5α-Zellen mit 4 µl des Ligationsansatzes gemischt und 30 min. auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (30 sec., 42°C) wurden die Zellen 5 min. auf Eis gehalten und dann mit 400 µl SOC-Flüssigmedium (SOB-Medium, + 10 mM MgCl₂, + 10 mM MgSO₄, + 20 mM Glukose [SOB-Medium: s. B 2.2]) versetzt und für 30-60 min. bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden dann auf LB-Platten (s. B 1.2.1) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Transformation von kompetenten *A. tumefaciens*-Zellen (s. B 2.2.2) erfolgte entsprechend einem Protokoll nach Höfgen und Willmitzer (Höfgen und Willmitzer, 1988).

2.2 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

2.2.1 Chemokompetente *E. coli* DH5 α -Zellen

Es wurden 250 ml SOB-Flüssigmedium (2% (w/v) Bacto Trypton, 0,5% Bacto yeast Extrakt (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl; pH 6,8-7,0), dem direkt vor Gebrauch noch steriles MgCl₂ (zu 10 mM) und MgSO₄ (zu 10 mM) zugesetzt wurden, mit 2 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur angeimpft und weiter im Schüttler (150 rpm) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,48-0,6 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur pelletiert (1200 x g, 10 min, 4°C) und nach Abgießen des Überstandes in 15 ml kaltem Transformationspuffer I (35 mM K-Acetat, 45 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15 % [v/v] Glycerin; pH 5,8) resuspendiert. Nach ein bis zwei Stunden Inkubation auf Eis erfolgte die erneute Pelletierung (2000 x g, 5 min, 4°C) und Resuspension in 4 ml Transformationspuffer II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % [v/v] Glycerin, pH 7,0). Die Zellen wurden dann zu Aliquots von 100 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Chemokompetente *A. tumefaciens*-Zellen

Die Herstellung von kompetenten *A. tumefaciens*-Zellen wurde von A. Weinel nach dem Protokoll von Höfgen und Willmitzer (Höfgen und Willmitzer, 1988) durchgeführt.

2.3 *A. tumefaciens*-vermittelte stabile Transformation von Kartoffelpflanzen

Für die Transformation wurden Blätter ca. 3-4 Wochen alter, steril auf 2MS (s. B 1.1) angezogener Kartoffelpflanzen verwendet. Die *A. tumefaciens*-Kulturen wurden zwei Tage in 20 ml LB-Flüssigkultur (s. B 2.4.2) unter Zugabe entsprechender Antibiotika (bei pHELLSGATE8 50 μ g/ml Spectinomycin) bei 28°C kultiviert. Die Bakterienkultur wurde pelletiert (10 min, 2100 x g, 8°C) und anschließend in 20 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Es folgten erneute Pelletierung der Bakterien sowie Resuspension in 10 ml 3MS (0,441% (w/v) MS-Salze, 3% (w/v) Saccharose, 0,05% (w/v) MES, pH 5,8; (Murashige und Skoog, 1962)). Für jede Transformation wurden ca. 12-14 Blätter, die mit einem Skalpell mehrmals verwundet worden waren, mit der Blattoberseite nach unten in eine Petrischale mit 10 ml 3MS gelegt, wobei pro Konstrukt etwa fünf Petrischalen angesetzt wurden. In jede Petrischale wurden dann 100 μ l der *A. tumefaciens*-Kultur pipettiert und durch Schwenken vorsichtig vermischt. Es erfolgte eine zweitägige

Inkubationsphase im Dunkeln (Petrischalen in Alufolie eingewickelt). Danach wurden die Blätter mit der Blattoberseite zur Kallusinduktion auf FG76-Platten (GMS [0,441% (w/v) MS-Salze, 3% (w/v) Saccharose, 0,05% (w/v) MES, 0,6% (w/v) Plant Agar, pH 5,8] + 250 µg/ml Carbenicillin, 0,1 µg/ml BAP, 5 µg/ml NAA, 1,5 µg/ml Hygromycin) gelegt. Nach einer Woche Inkubation erfolgte das Umsetzen der Blätter auf Spross-induzierendes FG75-Medium (GMS [0,441% (w/v) MS-Salze, 3% (w/v) Glucose, 0,05% (w/v) MES, 0,6% (w/v) Plant Agar, pH 5,8] + 250 µg/ml Carbenicillin, 2 µg/ml Zeatinriboside, je 0,02 µg/ml NAA und GA₃, 1,5 µg/ml Hygromycin). Die Blätter wurden dann weiter auf FG75-Platten gehalten und ca. im 14-tägigen Rhythmus umgesetzt bis sich Sprosse bildeten. Diese wurden abgeschnitten und auf 2MS-Medium (mit 250 µg/ml Carbenicillin und 3 µg/ml Hygromycin) kultiviert. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Blätter bzw. Kalli wurden stets in Phytokammern mit 16 h Licht bei 22°C und 8 h Dunkelheit bei 18°C und mit einer Lichtmenge von 200 µE kultiviert.

2.4 Nukleinsäure-Isolation

2.4.1 DNA-Isolation aus Blattmaterial

Für die Isolierung von genomischer DNA für die Southern-Analyse wurde eingefrorenes, gemörsertes Blattmaterial (ca. 200 mg) mit 1 ml Extraktionspuffer versetzt (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1,5 % (v/v) SDS) und 10 min. bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl 5 M Kaliumacetat erfolgte 10-minütige Inkubation auf Eis und anschließende Zentrifugation (19000 x g, 10 min., 4°C). Der Überstand wurde mit 800 µl einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und ca. 30 min. auf einem Schwenker inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 x g, 5 min.) wurde die obere wässrige Phase abgenommen und die DNA mit 800 µl Isopronanol gefällt (RT, 10 min.). Die DNA wurde dann pelletiert (19000 x g, 10 min.) und mit 70% (v/v) kaltem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde abzentrifugiert und nach dem Trocknen in ca. 20 µl destilliertem Wasser gelöst.

Für die Isolierung von genomischer DNA aus den mit *P. infestans* oder *B. cinerea* infizierten Blattproben wurde der DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden) genutzt.

2.4.2 Plasmidpräparation aus *E. coli* Bakterien

Die Bakterien wurden in 2 ml LB-Flüssigmedium (1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 0,5% Natriumchlorid, 50 µg/ml Kanamycin bzw. Ampicillin) über Nacht bei 37°C im Schüttler (150 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (14200 x g, 5 min.) und in 100 µl Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 15% Saccharose) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (0,2 N NaOH, 1% SDS) wurde 5 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden 150 µl Kaliumacetat-Lösung (3 M, pH 4,8) zugegeben und erneut 5 min. im Eisbad inkubiert. Der nach Abzentrifugieren (14200 x g, 10 min., 4°C) erhaltene Überstand wurde abgenommen und die Plasmid-DNA unter Zugabe von 270 µl Isopropanol 10 min. bei RT gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 100 µl 70% (v/v) kaltem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet und in ca. 20 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

Zur Gewinnung von größeren Mengen Plasmid-DNA wurden Bakterien in 50 ml LB-Flüssigkultur (s. oben) angezogen und anschließend die Plasmid-DNA unter Verwendung des QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt.

2.4.3 Plasmidpräparation aus *A. tumefaciens*

A. tumefaciens-Zellen wurden über Nacht bei 28°C und 140 rpm in 2 ml LB-Flüssigmedium (s. B 2.4.2) angezogen und dann pelletiert (13500 x g, 1 min.) Die Pellets wurden in 100 µl Lysispuffer (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM Glucose, 0,4 % [w/v] Lysozym) resuspendiert und 30 min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (1 % [v/v] SDS, 0,2 N NaOH) wurde erneut 30 min. bei RT inkubiert und dann sofort 30 µl alkalisches Phenol (Phenol / 1 M NaOH [25:1,5]) und nach Mischen 150 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) zugegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation (14500 x g, 4°C) wurde der Überstand mit 1 Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und 3 min. zentrifugiert (14500 x g, 4°C). Der resultierende Überstand wurde dann mit 1 Volumen Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert (14500 x g, 2 min., 4°C). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die Plasmid-DNA unter Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt (RT, 5 min.). Die DNA wurde pelletiert (14500 x g, 10 min., 4°C) und mit 70% (v/v) kaltem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

2.4.4 RNA-Isolation (Trizol-Methode)

200 mg gemörseretes Pflanzenmaterial wurden mit 1 ml Trizol-Lösung (87% (v/v) Phenol, 1,4 M Guanidiniumthiocyanat, 0,7 M Ammoniumthiocyanat, 183 mM Na-Acetat pH 5,0, 7% (w/v) Glycerin) versetzt und 1 min. gevortext. Nach 5-minütigem Inkubieren bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben und erneut gevortext (20 sec.). Danach wurde 5 min. bei RT inkubiert und zentrifugiert (12000 x g, 15 min., 4°C). Der Überstand wurde mit 600 µl Isopropanol versetzt und die RNA 10 min. bei RT gefällt. Die RNA wurde dann durch Zentrifugieren pelletiert (12000 x g, 10 min., 4°C) und mit 1 ml 70 % (v/v) kaltem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei 14200 x g 5 min. abzentrifugiert und dann getrocknet, in 20 µl destiliertem, autoklavierten Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Kolonie-PCR

DNA-Fragmente wurden mittels rekombinanter *Taq* DNA Polymerase der Firmen Invitrogen (Karlsruhe) oder Fermentas (St. Leon-Rot) entsprechend den Protokollen der Hersteller amplifiziert. Für die Klonierungen der RNAi-Fragmente wurde eine *Pfu*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) genutzt. Die gewählten Annealing-Temperaturen sind im Anhang (s. Anhang A-VII) verzeichnet. Es wurden 20 µl Ansätze in einem Standard PCR-Programm verwendet.

Für die Kolonie-PCR wurden Einzelkolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt, auf LB-Platten (s. B 1.2.1) ausgestrichen (Masterplate) und dann in das PCR-Reaktionsgefäß überführt.

2.6 Agarosegelelektrophorese

2.6.1 DNA-Gele

DNA-Fragmente aus den PCRs oder aus Plasmidrestriktionen bzw. restringierte genomische DNA für Southern-Analysen wurden in 1-2 %igen Agarosegelen unter Verwendung von 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) zusammen mit einem λ -PstI-Marker (200 µl λ -DNA [Fermentas, St. Leon-Rot] restringiert mit PstI [Fermentas, St. Leon-Rot] in 1 ml; + 200 DNA-Probenpuffer) aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit entsprechendem Volumen

10 x DNA-Probenpuffer (50% (v/v) Glycerin, 120 mM EDTA pH 8,0, 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1% Bromphenolblau) versetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in Ethidiumbromid-Lösung (80 µl 1% Ethidiumbromid auf 500 ml Wasser) ca. 10 min. inkubiert und die Fragmente im UV-Licht analysiert.

2.6.2 RNA-Gele

Die RNA-Proben wurden 10 min. bei 50°C gelöst und anschließend die Konzentration der Proben spektroskopisch ermittelt. Es erfolgte die gleichmäßige Aliquotierung der RNA-Proben zu 10-20 µg/ 10 µl (je nach Experiment, s. einzelne Abb.). Die aliquotierten Proben wurden mit 4 µl RNA-Probenpuffer (42,4 % (v/v) Formamid, 28,2 % (v/v) 10 x MOPS, 13,6 % (v/v) Formaldehyd, 5,6 % (v/v) Wasser, 5,6 % (v/v) Glycerin, 4,5 % (v/v) 10% Bromphenolblau) und 0,3 µl einer 100 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung versetzt und 10 min. bei 65°C denaturiert und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gestellt. Für die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurden 1%ige Agarose-Gele mit 5% Formaldehyd verwendet. Als Gel- und Laufpuffer diente 1 x MEN-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0). Die Elektrophorese erfolgte bei 80V.

2.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden mittels QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

2.8 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau isolierter DNA kamen Enzyme der Firmen Roche (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot) oder Invitrogen (Karlsruhe) zum Einsatz. Die Reaktionen wurden entsprechend der Protokolle der Hersteller-Firmen angesetzt.

2.9 Southern-Hybridisierungen

Für die Southern-Analysen wurde genomische DNA aus Blattmaterial isoliert (s. B 2.4.1) und anschließend über Nacht mit den entsprechenden Enzymen nach Herstellerangaben restringiert (s. B 2.8). Es erfolgte die Gelelektrophorese wie unter B 2.6.1 beschrieben. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 45 min. in ca. 200 ml Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) inkubiert, zweimal in Wasser gewaschen und anschließend

45 min in ca. 200 ml Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH7.0) inkubiert. Die fragmentierte DNA wurde dann über Nacht auf eine Nylonmembran übertragen (s. B 2.11.1). Die Herstellung der Sonden erfolgte analog B 2.10.1.

Die DNA der RNAi-Pflanzen der Linien S1-S9 (s. B 1.1) wurde mit EcoRI/HindIII restringiert. Als Sonde für diese Linien diente das DNA-Fragment der Hygromycin-Kassette, wobei in positiven Pflanzen ein ca. 2,9 kb großes Fragment detektiert wurde.

Für das Screening der StJAZ-RNAi-Pflanzen wurde die genomische DNA mit BamHI restringiert und das BamHI-Fragment des pHG8-R^{Kan} als Sonde genutzt (ca. 1,7 kb-Fragmente erwartet).

2.10 DNaseI-Behandlung von RNA

Der DNaseI-Verdau isolierter RNA für die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des RNase-free DNase Set (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben.

2.11 Transkriptmengen-Quantifizierung

2.11.1 Northern-Hybridisierungen

Die RNA-Gele wurden über Nacht mittels Kapillarkraft geblottet. Dazu wurden ein Stapel Papierhandtücher, sowie in 20 x SSC (3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natrium-tri-Citrat-Dihydrat) getränktes Blottingpapier (550g/m², Sartorius), die Nylonmembran (Roche, in destilliertem Wasser und danach in 20 x SSC getränkt), das Agarosegel und eine weitere Lage 20 x SSC-getränktes Blottingpapier übereinander geschichtet. Die Membran und das Blottingpapier waren auf die Größe des Gels zugeschnitten worden. Der Blot wurde dann mit zwei Lagen von 20 x SSC angefeuchtetem Filterpapier (80g/m², Sartorius) abgedeckt. Die Enden der Filterpapiere tauchten in 20 x SSC-Lösung.

Nach dem Blotten erfolgte das Cross-Linking der Membran im UV-Licht. Im Anschluß wurde ca. eine Stunde bei 42°C mit ca. 15-20 ml Hybridisierungspuffer (0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM EDTA, 0,1 % SDS, 50% Formamid(v/v), 0,2% PVP 40, 0,2% Ficoll 400, 0,2% BSA, >100 µg/ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA) vorhybridisiert.

Die [α -³²P-dATP]-markierten Sonden wurden unter Verwendung des *Megaprime*TM DNA labelling Kits (GE Healthcare, Buckinghamshire UK) entsprechend der Anleitung hergestellt. Vor der Hybridisierung wurde die Sonde über eine Mikrocephadsäule (ProbeQuantTM G-50 Micro-Columns, GE Healthcare, Buckinghamshire UK) gereinigt. Vor Zugabe zur Hybridisierungslösung erfolgte ein 5-minütiger Denaturierungsschritt bei 95°C.

Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte bei 42°C für ca. 20-24 h im Hybridisierungssofen.

Die verwendeten Sonden finden sich im Anhang (s. Anhang A-VII) bzw. sind in den Abbildungslegenden aufgeführt. Für die RNAi-Konstrukte wurden wenn möglich die Fragmente aus dem pENTR-Vektor mittels PCR amplifiziert und nach Elektrophorese aus dem Gel aufgereinigt.

Nach Hybridisierung wurde die Membran dreimal 20 min. mit 3 x SSC, 0,1% (v/v) SDS bei 62-65°C gewaschen.

Die Membranen wurden dann nach Einpacken in Zellophanfolie auf einen *Storage Phosphor Screen* (Molecular Dynamics) gelegt. Nach 1-7 Tagen erfolgte das Auslesen der Signale durch Scannen am Typhoon 9410 Variable Mode Imager (GE Healthcare Bio-Sciences, Buckinghamshire UK). Zur Quantifizierung wurden bei einigen Experimenten die Bandenintensitäten m. H. der Software ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics) gemessen.

2.11.2 Semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (sqRT-PCR)

Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben. Es wurden 1 µg nach der Trizol-Methode (s. B 2.4.4) isolierte und DNaseI-behandelte RNA (s. B 2.10) eingesetzt. Für die Reaktion wurden Oligo-dT-Primer genutzt. Die cDNA wurde für die PCR 1:5 verdünnt und von dieser Verdünnung 5 µl für jede PCR eingesetzt (entspricht 50 ng cDNA). Die verwendeten Annealing Temperaturen und Cyclenzahlen für die einzelnen Primerpaare sind im Anhang aufgelistet (s. Anhang A-VIII). Gewöhnlich wurden für die PCR 20 µl Ansätze verwendet (s. B 2.6).

2.11.3 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die cDNA-Synthese erfolgt analog B 2.11.2, wobei die cDNA für die qRT-PCR 1:10 verdünnt wurde. Die Transkriptmengen-Akkumulation wurde in einem 96-well-Platten qPCR Gerät (Mx3000P oder 3005P QPCR system, Stratagene) mittels SYBR Green gemessen (Quantimix easy SYG Kit including ROX™ reference dye, Biotools B&M Labs, S.A., Madrid). Für jede Reaktion wurden 10 ng cDNA sowie 50 nM Primer in

einem Reaktionsvolumen von 10 µl eingesetzt. Es wurden jeweils die Primer-Paare als Mastermix mit destilliertem Wasser vorgelegt und darauf der SYBR Green-Mastermix, entsprechend den Herstellerangaben, mit der cDNA pipettiert.

Die Expression der Zielgene wurde auf das Expressionslevel von *StEF1α* normalisiert (Nicot *et al.*, 2005). Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet (s. Anhang A-VIII). Die Auswertung erfolgte über die vergleichende Ct-Methode ((Schmittgen und Livak, 2008); auch $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode).

2.11.4 Microarray-Analysen

Für die Microarray-Experimente wurden ca. drei Wochen alte Wildtyp-, *StAOC*-RNAi, *StOPR3*-RNAi sowie *StCOII*-RNAi-Pflanzen mit jeweils 100 µM Pep-13 infiltriert. Als Verwundungskontrolle wurden Kartoffelblätter dieser Pflanzen mit dem inaktiven Analogon W2A behandelt. Die Ernte erfolgte acht Stunden nach Infiltration. Es wurden drei biologische Replikate aus drei unabhängigen Experimenten benutzt, wobei für jede Probe zwei Blätter einer Pflanze zu einem Pool vereinigt wurden. Aus den resultierenden 24 Proben wurde über die Trizol-Methode (s. B 2.4.4) die RNA isoliert und anschließend über den RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, wobei in diesem Schritt auch ein DNase-Verdau der an die Säulenmatrix gebundenen RNA erfolgte (RNase-free DNase Set, Qiagen, Hilden).

Die genutzten Arrays waren die 4x44K 60-mer Oligo Arrays des POCI-Konsortiums (Potato Oligo Chip Initiative, basierend auf der Agilent 60-mer Oligo Synthese Technologie), mit EST-Sequenzdaten aus Kartoffel (Kloosterman *et al.*, 2008). Auf diesem Chip waren ca. 42.000 ESTs aufgetragen, womit dieser Chip die größte derzeit verfügbare Sammlung von Kartoffel-EST-Sequenzen darstellt (Kloosterman *et al.*, 2008). Sämtliche Markierungs- und Hybridisierungsschritte erfolgten an der Universität Erlangen-Nürnberg in der Arbeitsgruppe von Prof. U. Sonnewald. Die RNA wurde am Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn) auf ihre Qualität hin überprüft und die Konzentration der RNA mit einem NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer bestimmt. Die cDNA-Synthese, Synthese der Cy-3-markierten cRNA, Fragmentierung der cRNA sowie Hybridisierung und das anschließende Waschen und Scannen der Arrays erfolgten entsprechend dem „One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protokoll“, Version 5.5, February 2007 (Agilent, Waldbronn; G4140-90040). Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng RNA eingesetzt. Das Scannen der Arrays erfolgte unter Nutzung der Software *Feature Extraction* (FE v. 9.5.1.1, Agilent, Protokoll: GE1-v5_95_Feb07), wobei das Grid 015425_D_F_20061105 verwendet wurde.

Die Datenauswertung erfolgte mittels der Software GeneSpring GX 7.3.1 (Agilent, Waldbronn). Die Normalisierung wurde nach Standardprotokoll (default for 1-color-based experiment analysis) durchgeführt. Dabei enthielt die Normalisierung entsprechend dieses Protokolls drei Schritte. Zuerst wurden alle Intensitätsrohwerte <5 auf 5 gesetzt. Danach erfolgte die Normalisierung über jeden einzelnen Chip auf den Median des Chips (*per chip*). Im dritten Schritt wurde jedes Gen auf seinen Median über alle Chips normalisiert (*per gene*). Für die weitere Datenauswertung wurden dann Filter verwendet, um signifikant differentiell exprimierte Gene zu detektieren. Zunächst wurde der Parameter „*Filter on Flags*“ angewandt, d.h. für den jeweiligen Vergleich wurden nur Gene betrachtet, die mindestens in der Anzahl der Replikate der jeweils betrachteten Experimente von der Scan-Software als *present or marginal* eingestuft worden waren. Im zweiten angewandten Filter wurde auf verlässlich differentiell exprimierte Gene ($p < 0,05$; 3-fach induziert oder reprimiert) gefiltert, wobei dieser Filter auf den *Volcano plots* der Software beruhte. Beim Volcano-Plot wird die Teststatistik (als $-\log(p\text{-Wert})$) gegen die Regulation (als $\log(x\text{-fache Veränderung im Vergleich zur Kontrollbehandlung})$) aufgetragen. Die p-Werte der so erhaltenen differentiell exprimierten Gene wurden mittels der FDR (*false discovery rate*) nach Benjamini-Hochberg korrigiert, wobei eine FDR von 5% angenommen wurde. Differentiell regulierte Gene wurden in der jeweiligen RNAi-Linie im Vergleich zum Wildtyp nach W2A-Behandlung ermittelt (s. C 1.5.1.1). Zum anderen wurde für jeden Genotyp (WT und RNAi-Linien) die Expression nach Behandlung (Pep-13) im Vergleich zur Kontrolle (W2A) betrachtet (s. C 1.5.1.2).

2.12 Pflanzenbehandlung - Bioassays

2.12.1 Verwundung der Blätter

Die Pflanzen wurden ca. drei Wochen auf Erde angezogen (s. B 1.1). Voll entwickelte Blätter (ca. das dritte und vierte von der Spitze aus gezählt) wurden dann mit einer Pinzette, rechts und links der Mittelrippe mehrmals verwundet, wobei die Mittelrippe unverletzt belassen wurde. Die Blätter wurden nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.12.2 Infiltration von Kartoffelblättern mit Pep-13/W2A

Es wurden die voll entwickelten Blätter von ca. drei Wochen alten Pflanzen für die Infiltrationsexperimente verwendet. Pep-13 und W2A wurden als 100 μM -Lösung in Wasser angesetzt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über spektroskopische Messung der OD_{260} der Peptid-Lösungen. Der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm betrug für Pep-13 $E_{280}=6990$ und W2A $E_{280}=1490$, so dass für eine Konzentration von

100 μM eine OD_{280} von 0,699 für Pep-13 und 0,149 für W2A eingestellt wurde. Die Infiltration der Peptidlösungen erfolgte mittels nadellosen 1 ml-Spritzen in die Blattunterseiten der Blätter. Nach der Ernte mit einem scharfen Skalpell wurden die Blätter in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.12.3 Inokulation von Kartoffelblättern mit *P. infestans*

Die Inokulationsexperimente wurden an ca. drei Wochen alten, auf Erde angezogenen Pflanzen oder an ca. drei Wochen *in vitro* gewachsenen Gewebekulturpflanzen (für die Trypan-Blaufärbungen) durchgeführt. Für die Herstellung der Zoosporensuspension von *P. infestans* wurden ca. 11-12 Tage alte, auf Hafer-Bohne-Medium angezogene (s. B 1.3) *P. infestans*-Kulturen mit 8-10 ml sterilem Wasser überschichtet, kurz geschwenkt und zu 4°C gestellt. Nach drei bis vier Stunden erfolgte das Abschwemmen über Gaze (Polyestergewebe 20 μm Porengröße, Durocas [Übach-Palenberg]) und Auszählen der Zoosporen-Zahl mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Es wurde meist eine Konzentration von 1×10^5 Sporen/ml verwendet. Abweichungen sind in den Abbildungslegenden angegeben.

Die Zoosporenkonzentration wurde bis zur Inokulation auf Eis gehalten und regelmäßig vor Entnahme eines Aliquots geschwenkt, um ein Absetzen der Zoosporen zu vermeiden. Jeweils das dritte bis fünfte Blatt einer Pflanze wurde auf der Blattunterseite mit 10 μl Tropfen (10-16 pro Blatt je nach Experiment) inokuliert und anschließend vorsichtig in Kordelzugbeutel (160 x 240 mm, LDPE, 50 μm , Roth, Karlsruhe) eingetütet. Die Ernte erfolgte je nach Experiment nach drei bis vier Tagen. Dafür wurde ein Korkbohrer (6 mm Durchmesser) verwendet, mit dem Blattscheiben ausgestochen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

Für die Knolleninfektionsexperimente wurden Kartoffelknollen in 5 mm dicke Scheiben geschnitten und daraus mit einem Korkbohrer (180 mm Durchmesser) runde Scheiben ausgestanzt. Diese wurden in einer Glaskammer auf ein Gitter aus Glasstäben gelegt und mit je 50 μl einer *P. infestans*-Sporensuspension (s. oben) inokuliert. Um eine hohe Luftfeuchtigkeit in der Glaskammer zu erzielen, wurde der Boden der Glaskammer mit feuchten Papiertüchern ausgelegt. Die Kartoffelknollen wurden nach fünf Tagen in Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet.

2.12.4 Behandlung von Kartoffelpflanzen mit β -Aminobuttersäure

β -Aminobuttersäure (BABA, Sigma-Aldrich) wurde in einer Konzentration von 1 mM in Wasser gelöst und von dieser Lösung 100 ml direkt in die Erde der ca. drei Wochen alten Pflanzen gegossen. Die Behandlung erfolgte bei Vorbehandlung vor einem *P. infestans*-Infektionsexperiment zwei Tage vor Inokulation.

2.12.5 Infektion von Kartoffelpflanzen mit *B. cinerea*

B. cinerea B 05.10 wurde entsprechend B 1.4 ca. sieben bis acht Tage angezogen und zur Herstellung der Sporensuspension mehrere Agarblöcke ausgestochen und in ein 50 ml Falcon mit Gamborg B5 Medium mit 2% Glucose (0,316% (w/v) Gamborg B5 Medium mit Vitaminen, Duchefa, 2% (w/v) Glucose) überführt. Die Bestimmung der Sporenkonzentration erfolgte mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Für die Infektionen wurde meist eine Konzentration von 2×10^4 Sporen eingestellt (Abweichungen wurden in den Abbildungslegenden vermerkt) und mit 1% (v/v) Phosphatpuffer (1 M K_3PO_4 , pH 6,4; Endkonzentration 10 mM) versetzt. Zur Vorkeimung wurde die Sporenkonzentration ein bis eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur belassen.

Blätter von drei Wochen alten Pflanzen wurden auf der Blattunterseite mit 10 μ l Tropfen (10-16 pro Blatt je nach Experiment) inokuliert und dann in Kordelzugbeutel (160 x 240 mm, LDPE, 50 μ m, Roth, Karlsruhe) eingetütet. Jeweils das dritte bis fünfte Blatt einer Pflanze wurde verwendet. Die Blätter wurden nach je nach Experiment nach zwei bis vier Tagen geerntet, wofür mit einem Korkbohrer Blattscheiben von 6 mm Durchmesser ausgestochen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

2.13 Quantitative Real-Time PCR (qPCR) zur Bestimmung der Pathogenbiomasse

2.13.1 Quantifizierung der *P. infestans*-Biomasse

Die quantitative Bestimmung der *P. infestans*-Biomasse in infizierten Kartoffelblättern erfolgte entsprechend (Eschen-Lippold *et al.*, 2007).

2.13.2 Quantifizierung der *B. cinerea*-Biomasse

Aus dem *B. cinerea*-infizierten als Blattscheiben geernteten und eingefroren Material (s. B 2.12.5) wurde nach Zugabe eines externen Standards die DNA mittels des DNeasy®

Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden) (s. B 2.4.1) isoliert. Als externer Standard wurden den Proben vor der DNA-Isolierung 5 µl einer 1:1000 Verdünnung eines Plasmids (pCR2.1) mit einem Fragment der *StRrbohB* (s Anhang A-VI) zugegeben. Die DNA wurde 1:20 oder 1:50 verdünnt und 5 µl dieser Verdünnung pro qPCR eingesetzt. Für die Quantifizierung der *B. cinerea* Biomasse wurde ein 58 bp-Fragment der *BcCutA* (s. Anhang A-V; (van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1997; Gachon und Saindrenan, 2004)) mittels quantitativer Real-Time PCR in einem 96-well-Platten qPCR Gerät (Mx3000P oder 3005P QPCR system, Stratagene) mit dem Quantimix easy SYG Kit (including *ROX*TM reference dye, Biotools B&M Labs, S.A., Madrid) amplifiziert. Es wurden jeweils 20 µl Ansätze mit einer Endkonzentration an Primern von 300 nM verwendet. Die relative Quantifizierung wurde ermöglicht, indem eine Standardkurve eines 600 bp-langen Fragments der *BcCutA* (s Anhang A-V), sowie des externen Standards amplifiziert wurde, auf den später normalisiert werden konnte.

2.14. Färbetechniken

2.14.1 3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung von H₂O₂

Die Anfärbung von H₂O₂ in behandelten Blättern erfolgte nach einem Protokoll aus Thordal-Christensen (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Dazu wurden Blätter eine Stunde im Dunkeln in DAB-Lösung (1mg/ml 3,3-Diaminobenzidin-HCl, Sigma, pH 3,8 mit HCl) inkubiert und anschließend in 96%-igem Ethanol bei 65°C entfärbt.

2.14.2 Trypan-Blau-Färbung

Die Trypan-Blau-Färbung von toten Pflanzenzellen wurde nach einem Protokoll von Peterhänsel durchgeführt (Peterhänsel *et al.*, 1997). Die Blätter wurden in einer Mischung aus ein Teil Lactophenol (25% (v/v) H₂O, 25% (v/v) Phenol, 25% (v/v) Glycerin, 25% (v/v) DL-Milchsäure) mit 0,1% (w/v) Trypan-Blau und zwei Teilen 96%-igem Ethanol gekocht, bis die Blätter ihre grüne Farbe verloren und eine blaue Färbung angenommen haben. Anschließend wurden die Blätter zum Entfärben in Chloralhydrat (2,5 g/ml) geschwenkt. Das Chloralhydrat wurde bei Bedarf mehrmals gewechselt. Die Blätter wurden in 50% (v/v) Glycerin gewaschen und auf Objektträger gebracht.

2.15 Quantifizierung der HR-ähnlichen Zelltodreaktion

Für die Quantifizierung der Nekrose-Fläche der Pep-13- bzw. W2A-behandelten Blätter wurde die Software ImageJ verwendet (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

2.16 Bestimmung des OPDA-, JA- und JA-Ile-Gehalts in Blättern

Die Isolierung und Quantifizierung der Oxylipine OPDA, JA und JA-Ile wurde entsprechend Göbel *et al* (Göbel *et al.*, 2001) durchgeführt.

Zu 500 mg gefrorenem und gemörsertem Blattmaterial wurden in 15 ml-Falconröhrchen 10 ml Methanol, sowie die internen Standards (je 100 ng ($^2\text{H}_6$) JA, ($^2\text{H}_5$) OPDA und (-) JA-($^2\text{H}_3$)-Leu; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von O. Miersch) gegeben und die Mischung mit einem Ultra Turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde filtriert und über eine A-25 DEAE-Sephadex-Säule (Ac^- -Form, Methanol-äquilibriert) (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) gereinigt. Die Säule mit dem aufgegebenen Extrakt wurde mit je 3 ml Methanol und 0,1 N Essigsäure in Methanol gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution in drei Schritten: mit je 3 ml 1 N, 1,5 N und 3 N Essigsäure in Methanol. Das Eluat wurde unter N_2 -Begasung evaporiert, in 110 μl Methanol-Wasser (1:1) aufgenommen, abzentrifugiert und anschließend über eine HPCL aufgereinigt. Für die HPLC wurde das Agilent 1100 HPLC System mit einer Reversed-Phase C18-Säule der Firma Phenomenex (Luna 3 μ C18(2) 150 x 4,60 mm) genutzt. Als Lösungsmittel A diente Methanol, als Lösungsmittel B 0,2 % Essigsäure in Wasser. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min mit einem Gradienten von 40% A zu 100% A in 25 min. Es wurden bei R_t 12,90–14,10 min (JA); 16–17,40 min (JA-Ile) und 21,25–22,50 min (OPDA) Fraktionen gesammelt, wobei die genauen Retentionszeiten vorher durch einen Testlauf mit Standards (zur Verfügung gestellt von O. Miersch) überprüft wurden. Die JA- und OPDA-Fraktionen wurden vereinigt. Alle Proben wurden unter N_2 -Begasung evaporiert. Die Proben wurden dann in 200 μl CHCl_3 /*N,N*-Diisopropylethylamin (1:1, v/v) gelöst und mit 10 μl Pentafluorbenzylbromid (Sigma-Aldrich, München) bei RT über Nacht derivatisiert. Nach Eindampfen unter N_2 -Begasung wurde die JA/OPDA-Fraktion 5 ml n-Hexan und die JA-Ile-Fraktion in 5 ml n-Hexan:Ether (2:1, v/v) gelöst. Die Proben wurden über eine Chromabond-SiOH Säule 500 mg (Machery-Nagel) gereinigt. The Pentafluorobenzylester von JA/OPDA und JA-Ile wurden mit 7 ml n-Hexan/Diethylether (1:1, v/v) bzw. 7 ml n-Hexan/Diethylether (3:1, v/v) eluiert, getrocknet, in 100 μl Acetonitril aufgenommen und über eine GC-MS analysiert (Göbel *et al.*, 2001; Miersch *et al.*, 2008).

2.17 Bestimmung des SA-Gehalts in Blattproben

500 mg gefrorenes und gemörstertes Blattmaterial wurden für die Quantifizierung des Gehalts an SA entsprechend einem Protokoll nach Verbene *et al* (Verberne *et al.*, 2002) genutzt. Die SA-Fraktion wurde in 500 µl mobiler Phase, die SAG-Fraktion in 1000 µl mobiler Phase aufgenommen. Zur Quantifizierung wurde SA (Sigma-Aldrich, München) in Methanol gelöst, daraus eine Standardreihe in mobiler Phase angesetzt und über die HPLC gemessen. Das HPLC System bestand aus einer Phenomenex Säule vom Typ Luna 3µ C18(2) 150 x 4,60 mm. Als mobile Phase diente 60% saures Wasser (pH 2.8, Essigsäure) und 40% Methanol. Es wurden jeweils 20 µl injiziert. Die Flussrate betrug 0,7 ml/min. Die Detektion erfolgt an einem Jasco FP-920 Fluoreszenzdetektor mit einer Anregungswellenlänge von 300 nm und einer Emissionswellenlänge von 410 nm.

2.18 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen wurden mit der GraphPad Prism Software Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) durchgeführt.

Um statistische Signifikanz zu bewerten, wurde hauptsächlich die parameterfreie einfaktorielle Varianzanalyse (wenn die Probenzahl zu gering war, um Normalverteilung anzunehmen, oder wie im Fall der Pathogenassays starke Variationen sichtbar waren) genutzt. Als *post-hoc* Test diente dann der Dunn's Test, bei dem ausgewählte Vergleiche durchgeführt werden. Es wurden jeweils die zusammengefassten Kontrollen (WT und Vektorkontrollen) mit den RNAi-Linien verglichen, also der Einfluss des „Genotyps“ auf die entsprechende Behandlung bestimmt. Für eine parametrische einfaktorielle Varianzanalyse wurde entsprechend Dunnett's *post-hoc* Test genutzt, bei dem alle Gruppen gegen eine Kontrollgruppe (WT) verglichen wurden. Wenn nur zwei Gruppen, also Behandlung gegen Kontrolle, verglichen werden sollten, wurde der t-Test verwendet.

C ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit sollte die Rolle der 13-Oxylipine für die Pathogenabwehr der Kartoffel näher analysieren. Die hierzu durchgeführten Experimente gliedern sich in zwei Teilbereiche.

Im ersten Abschnitt erfolgte die Analyse der PAMP-vermittelten Abwehrantworten, wobei zunächst Wildtyp-Pflanzen auf den zeitlichen Verlauf der Akkumulation der relevanten Signalmoleküle SA und JA untersucht worden sind. Im Anschluß wurden transgene Pflanzen mit RNAi-Konstrukten gegen Komponenten der JA-Biosynthese bzw. der JA-Signalverarbeitung auf ihre Antwort auf den PAMP Pep-13 hin analysiert. Einen weiteren Aspekt dieser Arbeit stellen Microarray-Analysen dar, die das Genexpressionsprofil innerhalb der PAMP-vermittelten Abwehr in Abhängigkeit der 13-Oxylipine erfassen sollten. Im letzten Abschnitt dieses ersten Kapitels wird dann kurz auf die Charakterisierung von Kandidatengen eingegangen, die in den Microarray-Analysen ermittelt wurden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse der Funktion von 13-Oxylipinen innerhalb der kompatiblen und inkompatiblen Interaktion der Kartoffel mit ihrem Pathogen *P. infestans*. Des Weiteren wurde die Interaktion mit dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* untersucht.

1. 13-Lipoxygenase-abgeleitete Oxylipine in der PAMP-induzierten Signaltransduktion in *Solanum tuberosum* L.

Die Erkennung von PAMPs über transmembranständige Rezeptoren stellt die Basis für die PAMP-induzierte Immunität in Pflanzen dar (He *et al.*, 2007; Zipfel, 2008). Die Bedeutung dieser Erkennungsmechanismen für die Resistenz von Pflanzen konnte in verschiedenen Arbeiten belegt werden (Zipfel *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006; Hann und Rathjen, 2007).

Pep-13, ein 13-aa Peptid einer Zellwand-assoziierten Transglutaminase aus *Phytophthora*-Spezies, wurde als PAMP in Pflanzen identifiziert (Brunner *et al.*, 2002; Schwessinger und Zipfel, 2008). Für Kartoffel konnten als Reaktion auf Pep-13-Infiltration das Auftreten einer HR-ähnlichen Zelltodreaktion, ROS-Bildung sowie induzierte Genexpression beschrieben werden (Geiler, 2001; Brunner *et al.*, 2002). Ebenso akkumulieren in Wildtyp-Kartoffelpflanzen nach Behandlung mit Pep-13 die Signalmoleküle SA sowie JA (Halim *et al.*, 2004).

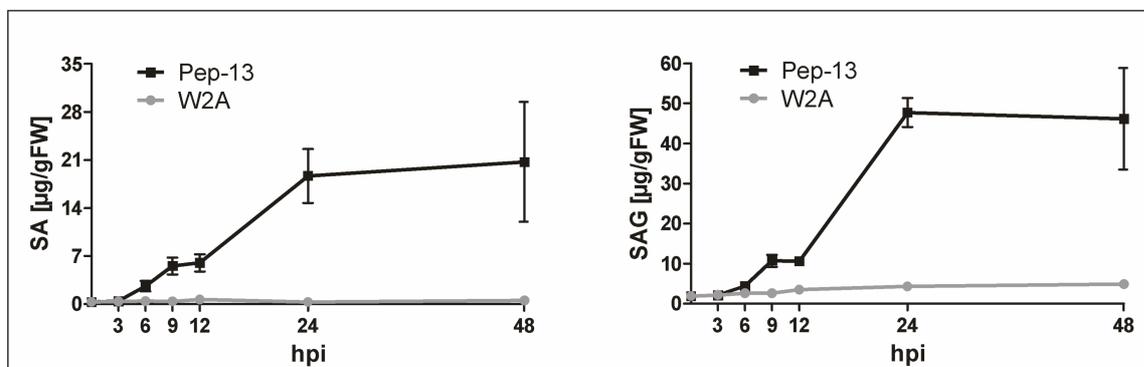
In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion der 13-Lipoxygenase-abgeleiteten Oxylipine JA und OPDA für die Pep-13-induzierten Abwehrantworten in Kartoffel detaillierter untersucht werden.

1.1 PAMP-induzierte Akkumulation von SA, OPDA und JA

Aus den Analysen von V. Halim an transgenen *NahG*-exprimierenden und *StOPR3*-RNAi-Kartoffelpflanzen war bekannt, dass SA nach Pep-13-Behandlung oberhalb von JA akkumuliert. *NahG*-Pflanzen, die durch die Überexpression einer Salizylhydroxylase (Gaffney *et al.*, 1993) keine messbaren Mengen an SA akkumulieren, zeigen 24 h und 48 h nach Pep-13-Infiltration einen Verlust der JA-Akkumulation. Im Gegensatz dazu konnte für die *StOPR3*-RNAi-Pflanzen eine, von der JA-Defizienz unabhängige, SA-Akkumulation 24 h nach Pep-13-Infiltration nachgewiesen werden (Halim *et al.*, 2004; Halim, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der zeitliche Verlauf der Akkumulation der beiden Signalsubstanzen SA und JA nach Behandlung von Wildtyp-Kartoffelpflanzen mit Pep-13 bzw. dem inaktiven Analogon W2A (Brunner *et al.*, 2002) ermittelt (Abb. C-1 und C-2). Da JA in Abhängigkeit von SA akkumuliert, wurde vermutet, dass die SA-Level nach Pep-13-Infiltration schneller ansteigen als die JA-Level.

HPLC-Messungen konnten in Pep-13-behandelten Kartoffeln eine signifikante Akkumulation von SA und auch SAG im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen bereits 6 h ($p < 0,05$; einseitiger t-Test) nach Infiltration nachweisen (Abb. C-1). Zwei unabhängige Experimente zeigten insgesamt einen ähnlichen Verlauf mit einem kontinuierlichen Anstieg der SA- und SAG-Konzentrationen, jedoch mit unterschiedlich starker Akkumulation von SA zum Erntezeitpunkt 24 h (1. Exp. 18,68 $\mu\text{g/gFW}$; 2. Exp.: 10,7 $\mu\text{g/gFW}$) und SAG (1. Exp.: 47,73 $\mu\text{g/gFW}$; 2. Exp.: 35,4 $\mu\text{g/gFW}$).

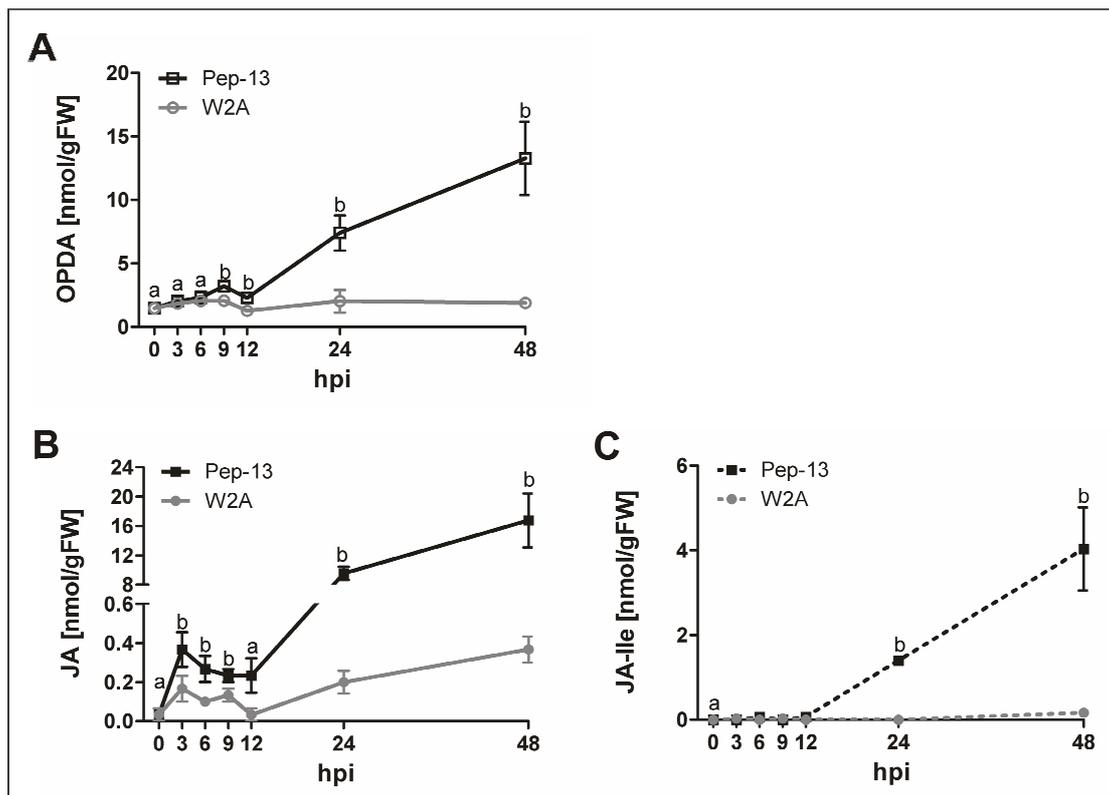


Legende s. nächste Seite

Abb. C-1: Akkumulation von SA und SAG in Kartoffelpflanzen nach Pep-13-Behandlung

Ausgewachsene Blätter von Wildtyp-Kartoffelpflanzen wurden vollständig mit 100 μ M Pep-13 bzw. W2A infiltriert und zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet (hpi). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 biologischen Replikaten eines Experiments. Dieses Experiment wurde einmal wiederholt, wobei ähnliche Resultate erhalten wurden.

Aliquots des Probenmaterials, das für die SA-Bestimmungen verwendet wurde, dienten auch zur Quantifizierung der JA-Konzentration. Die GC-MS-Messungen zwei verschiedener Experimente ergaben zum Zeitpunkt 24 h einen reproduzierbar signifikanten Unterschied der JA-Mengen zwischen Pep-13-behandelten Pflanzen und unbehandelten Kontrollpflanzen (Abb. C-2, Tabelle 1-Anhang). Ebenso ist die Akkumulation von OPDA und JA-Ile 24 h nach Infiltration von Pep-13 nachweisbar. Ein ähnliches Bild ergab sich in der Wiederholung dieser Kinetik, wobei jedoch für JA-Ile erst nach 48 h ein signifikant vom Nullwert verschiedener Gehalt gemessen wurde. Insgesamt ergab die Quantifizierung der Akkumulation der Octadecanoide im zweiten Experiment einen geringeren Maximalwert als im ersten Experiment. Aus den Daten des ersten Experimentes könnte man einen leichten Anstieg der Level an OPDA und JA auch zu früheren Zeitpunkten als 24 h ableiten. Dies ließ sich in einem zweiten Experiment jedoch nicht eindeutig bestätigen.

**Abb. C-2: OPDA-, JA- bzw. JA-Ile-Akkumulation in Pep-13 behandelten Kartoffelpflanzen**

Der Gehalt an OPDA, JA sowie JA-Ile in Pep-13- bzw. W2A-infiltrierten (100 μ M) Blättern von Wildtyp Kartoffelpflanzen wurde mittels GC-MS bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und deren Standardfehler ($n=3$). Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen (einseitiger t-Test, $p<0,05$). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur Signifikanzunterschiede zwischen unbehandelten und Pep-13-behandelten Pflanzen gezeigt. Eine vollständige Übersicht findet sich in Tabelle 1 im Anhang (Tabelle 1-Anhang). Das Experiment wurde einmal wiederholt, wobei ein ähnliches Ergebnis erhalten wurde.

1.2 PAMP-induzierte Expression ausgewählter Biosynthesegene des Octadecanoid-Weges

Häufig kann eine Korrelation zwischen der Akkumulation eines Metaboliten und der vorangegangenen Induktion der Expression der jeweiligen Biosynthese-Gene beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob zu den frühen Zeitpunkten nach Pep-13-Behandlung eine gesteigerte Expression der JA-Biosynthesegene *StLOX3*, *StAOC* und *StOPR3* vorliegt und als Indiz für eine frühe JA-Akkumulation gewertet werden könnte. Hierzu wurde aus einem weiteren Aliquot des Probenmaterials, das bereits für die SA- und JA-Messungen verwendet wurde, die Gesamt-RNA isoliert und einer Northern Blot-Analyse unterzogen (Abb. C-3). Die Transkripte aller drei untersuchten Gene akkumulieren zum frühest gemessenen Zeitpunkt (3 hpi). Diese Akkumulation tritt jedoch auch in den W2A-behandelten Kontrollpflanzen auf, und ist somit nicht spezifisch für die Pep-13-Antwort. Es scheint sich vielmehr um eine Wund-induzierte Akkumulation der Transkripte der JA-Biosynthesegene zu handeln, die bereits aus Literaturdaten bekannt ist (Schaller *et al.*, 2005). Neben der Wund-induzierten Akkumulation konnte zusätzlich eine länger andauernde, für die Pep-13-Behandlung spezifische Expression der *StLOX3* (bis 24 hpi) und *StOPR3* (bis 12 hpi) beobachtet werden.

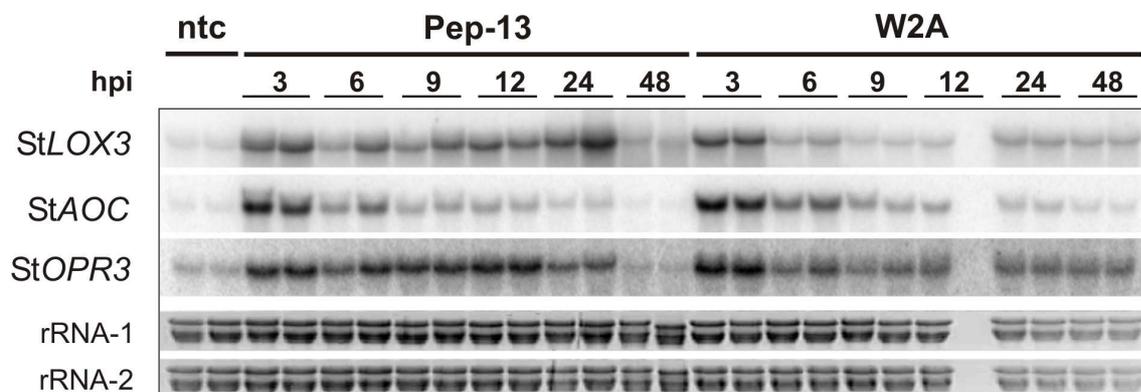


Abb. C-3: Expression von JA-Biosynthesegenen in Kartoffel nach Pep-13-Infiltration

Blätter von Wildtyp Kartoffelpflanzen ($n=2$) wurden mit Pep-13 bzw. W2A ($100\mu\text{M}$) vollständig infiltriert und zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet. Für Northern Blot-Analysen wurden $20\ \mu\text{g}$ RNA im Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembranen geblottet. Die anschließende Hybridisierung erfolgte mit ^{32}P -markierten cDNA-Fragmenten als spezifische Sonde für *StLOX3*, *StAOC* und *StOPR3*. Die Ethidiumbromidfärbung der rRNA diente als Ladekontrolle für gleiche RNA-Mengen (rRNA-1 für *StLOX3* und *StAOC*; rRNA-2 für *StOPR3*). Ntc, unbehandelte Kontrollen.

1.3 RNAi -vermittelte Herabsetzung der JA-Biosynthese und der JA-Perzeption

Aus den Arbeiten von V. Halim war bekannt, dass die verminderte Akkumulation von JA in den *StOPR3*-RNAi-Pflanzen nach Pep-13 zu einer veränderten Abwehrantwort in Form von verminderter Nekrosenbildung führt, woraus geschlussfolgert werden konnte, dass JA oder einer seiner Metaboliten an der Signaltransduktion in Reaktion auf Pep-13 beteiligt ist (Halim, 2006). Da in den *StOPR3*-RNAi-Pflanzen jedoch nur eine Reduktion und kein Verlust der Pep-13-Antwort zu beobachten war, stellte sich die Frage, ob das Vorhandensein von OPDA in den *StOPR3*-RNAi-Pflanzen einen Teil der Pep-13-induzierten Antworten vermittelt. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den *StOPR3*-RNAi-Pflanzen *StAOC*-RNAi-Pflanzen generiert und in die Analysen einbezogen. Des Weiteren konnte in ersten Arbeiten gezeigt werden, dass das F-Box-Protein *StCOI1* für die Pep-13-vermittelte Signaltransduktion in Kartoffel benötigt wird (Wolf, 2005). Auch diese Analysen sollten unter Verwendung der *StCOI1*-RNAi-Kartoffelpflanzen weitergeführt werden.

1.3.1 Nachweis der RNAi-vermittelten Herabsetzung der Expression der Zielgene

Die Transkripte der JA-Biosynthesegene akkumulieren unter anderem nach Verwundung des pflanzlichen Gewebes (Laudert und Weiler, 1998; Royo *et al.*, 1999; Howe *et al.*, 2000; Ziegler *et al.*, 2000; Strassner *et al.*, 2002). Es wurde zunächst ein zeitlicher Verlauf der Transkriptakkumulation nach Verwundung von Wildtyp-Kartoffeln untersucht, um die Expression der Kartoffelgene näher zu charakterisieren und auch, um den geeignetsten Zeitpunkt für den Nachweis des RNAi-Effektes in den transgenen Pflanzen zu ermitteln. Wie erwartet zeigen die analysierten Gene *StAOS2*, *StAOC*, und *StOPR3* eine deutliche transkriptionelle Aktivierung nach Verwundung. Für die jeweiligen Transkripte wurde in Northern-Analysen ein Signal 30 Minuten nach Verwundung beobachtet. Diese wundinduzierte Expression erstreckte sich über einen Zeitraum von ca. acht Stunden für alle untersuchten Gene (Abb. C-4).

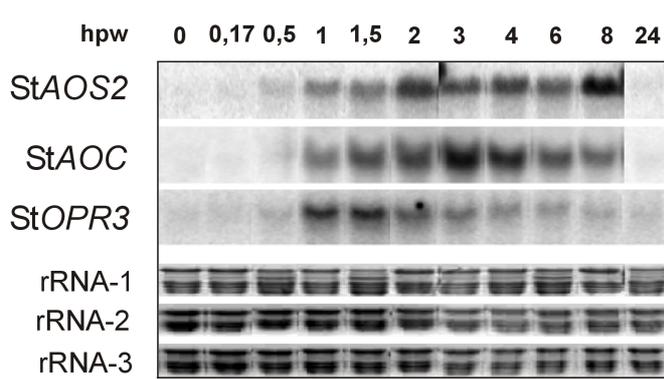
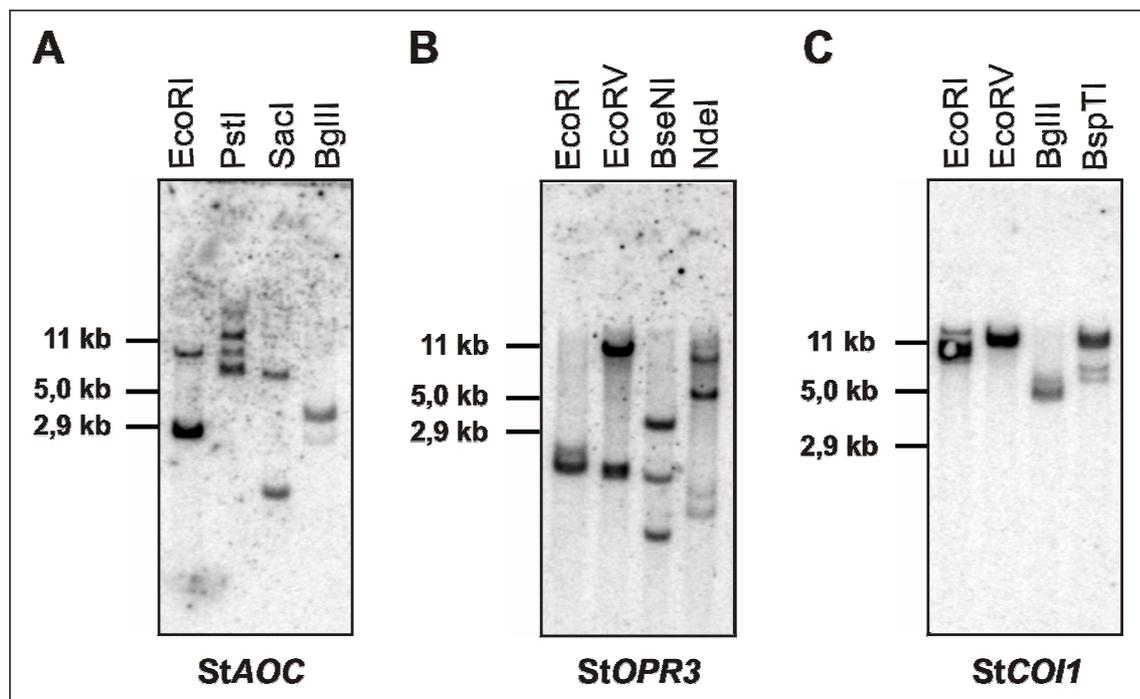


Abb. C-4: Wundinduzierte Expression der JA-Biosynthesegene StAOS2, StAOC und StOPR3

Drei Wochen alte Kartoffelpflanzen wurden mit einer Pinzette rechts und links der Mittelrippe mehrfach verwundet. Die Ernte der Blätter erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten (hpw) (n=3, eine repräsentative Probe gezeigt). 15 µg (StAOS2), 20 µg (StAOC) bzw. 10 µg (StOPR3) RNA wurden für Northern Blot-Analysen eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit ³²P-markierten cDNA-Fragmenten von StAOS2, StAOC und StOPR3. Als Ladekontrolle dienen die Ethidiumbromid-gefärbten rRNA-Banden.

Aus *Arabidopsis* und Tomate sind für die *AOC* vier bzw. ein Gen bekannt (Ziegler *et al.*, 2000; Stenzel *et al.*, 2003). *OPR3* kommt sowohl in *Arabidopsis* als auch in Tomate in einer kleinen Genfamilie mit drei Mitgliedern vor (Schaller *et al.*, 2000; Strassner *et al.*, 2002). Für das F-Box Protein-kodierende Gen *COII* ist jeweils nur ein homologes Gen beschrieben (Xie *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004b). Southern-Analysen der Kartoffelgene sollten zeigen, ob ähnliche Verhältnisse auch in Kartoffel vorliegen. Die mit den gewählten Restriktionsenzymen erhaltenen Bandenmuster (Abb. C-5, DNA-Fragmente nach Behandlung mit den angegebenen Restriktionsenzymen s. Anhang) für die Hybridisierungen mit StAOC-, StOPR3- und StCOII-spezifischen Sonden deuten darauf hin, dass alle drei Gene in Kartoffel als *low copy number* Gene oder Einzelgene vorliegen.



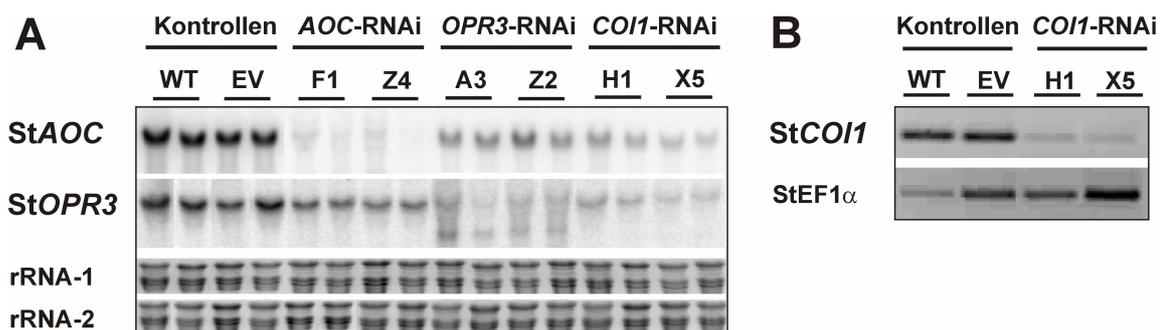
Legende s. nächste Seite

Abb. C-5: Southern-Analysen der StAOC, StOPR3 und StCOI1 in Kartoffel

DNA wurde aus Blättern von Wildtyp-Kartoffelpflanzen isoliert und mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut. Nach Gelaufftrennung erfolgte das Übertragen der Fragmente auf eine Nylonmembran und anschließende Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Sonden für StAOC (A), StOPR3 (B) bzw. StCOI1 (C). Die Größen von PstI-verdauter λ -DNA sind am linken Bildrand als Größenstandard markiert.

Ausgehend von den Ergebnissen hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der wundinduzierten Expression von StAOC und StOPR3 wurden die transgenen RNAi-Pflanzen nach dem Wund-Stimulus auf das Expressionsniveau der JA-Biosynthesegene hin untersucht. Die StAOC-RNAi-Pflanzen F1 und Z4 weisen zwei Stunden nach Verwundung kaum Transkriptakkumulation der StAOC auf. In den StOPR3-RNAi-Linien A3 und Z2 sowie in den StCOI1-RNAi-Linien H1 und X5 ist eine im Vergleich zum Wildtyp stark reduzierte Expression der StAOC nach Verwundung detektierbar (Abb. C-6 A). Ebenso ist die StOPR3-Transkriptakkumulation in den StOPR3-RNAi-Pflanzen A3 und Z2 stark herabgesetzt (Halim, 2006). Wiederum kann für die beiden anderen RNAi-Linien der JA-Biosynthese (StAOC-RNAi) und der JA-Perzeption (StCOI1-RNAi) beobachtet werden, dass sie zwei Stunden nach Verwundung eine Reduktion der StOPR3-Transkriptmengen im Vergleich zum Wildtyp zeigen (Abb. C-6 A).

Für StCOI1 ist eine konstitutive Expression publiziert (Li *et al.*, 2004b). Northern Blot-Analysen von unbehandelten Blättern ca. 3 Wochen alter Kartoffelpflanzen ergaben kein Signal, so dass die Detektion der Genexpression mittels semiquantitativer RT-PCR durchgeführt wurde. In Übereinstimmung mit den Daten von D. Wolf (Wolf, 2005) zeigten die StCOI1-RNAi-Linien H1 und X5 eine stark verringerte Akkumulation des StCOI1-Transkripts (Abb. C-6 B).

**Abb. C-6: Wund-induzierte Genexpression in transgenen RNAi-Pflanzen**

A) Drei Wochen alte Kontroll- und RNAi-Pflanzen wurden mit einer Pinzette rechts und links der Mittelrippe mehrfach verwundet. Zwei Stunden nach der Behandlung wurden die Blätter geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Die Northern Blot Analysen erfolgten mit 20 μ g RNA. 32 P-markierte cDNA-Fragmente von StAOC sowie StOPR3 dienten als Sonde. Als Ladekontrolle sind die Ethidumbromid-gefärbten rRNA-Banden gezeigt.

B) Unbehandelte Blätter von ca. drei Wochen alten Kartoffelpflanzen wurden geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Nach DNaseI-Verdau erfolgte die cDNA-Synthese und anschließende PCR mit Gen-spezifischen Primern für StCOI1 sowie StEF1 α .

1.3.2 Untersuchung der OPDA- und JA-Akkumulation in den RNAi-Pflanzen

Aus der nachgewiesenen verringerten Expression der JA-Biosynthesegene *StAOC* und *StOPR3* bzw. des F-Box Protein-kodierenden Gens *StCOII* allein können keine Rückschlüsse auf die endogenen Mengen der entsprechenden Octadecanoide OPDA und JA in den RNAi-Pflanzen gezogen werden. Aus diesem Grund wurden die RNAi-Pflanzen verwundet – eine Behandlung, die bekanntermaßen in Wildtyp-Pflanzen zu rapidem Anstieg der Jasmonatmengen führt (Howe, 2004; Schaller *et al.*, 2005) – und auf den Gehalt des gebildeten OPDA und JA im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen und Vektorkontrollen untersucht.

Für die *StAOC*-RNAi-Pflanzen konnte eine signifikante Reduktion der Mengen an gebildetem OPDA, JA und JA-Ile 30 min. nach Verwundung nachgewiesen werden (Abb. C-7 A). Im Gegensatz dazu scheint der Verlust der *StOPR3*-Expression in den RNAi-Pflanzen nur zu einer verringerten Akkumulation des JA, nicht aber des OPDA zu führen. Möglicherweise sind die Level an OPDA nach Verwundung in den RNAi-Pflanzen sogar höher als in den Kontrollen. Um dies eindeutig nachzuweisen, müßte die Bestimmung der OPDA-Mengen jedoch mit mehr Pflanzen und möglicherweise weiteren Linien wiederholt werden, worauf hier aus Zeitgründen verzichtet werden mußte. Ein anderes Bild ergab sich für die *StCOII*-RNAi-Pflanzen. Obwohl die herabgesetzte Expression der *StCOII* eine im Vergleich zu den Kontrollpflanzen stark erniedrigte Transkriptakkumulation der JA-Biosynthesegene *AOC* und *OPR3* zur Folge hat, konnte in zwei unabhängigen Experimenten keine signifikant veränderte Akkumulation von OPDA, JA oder JA-Ile (nur ein Experiment) gemessen werden (Abb. C-7 C und D).

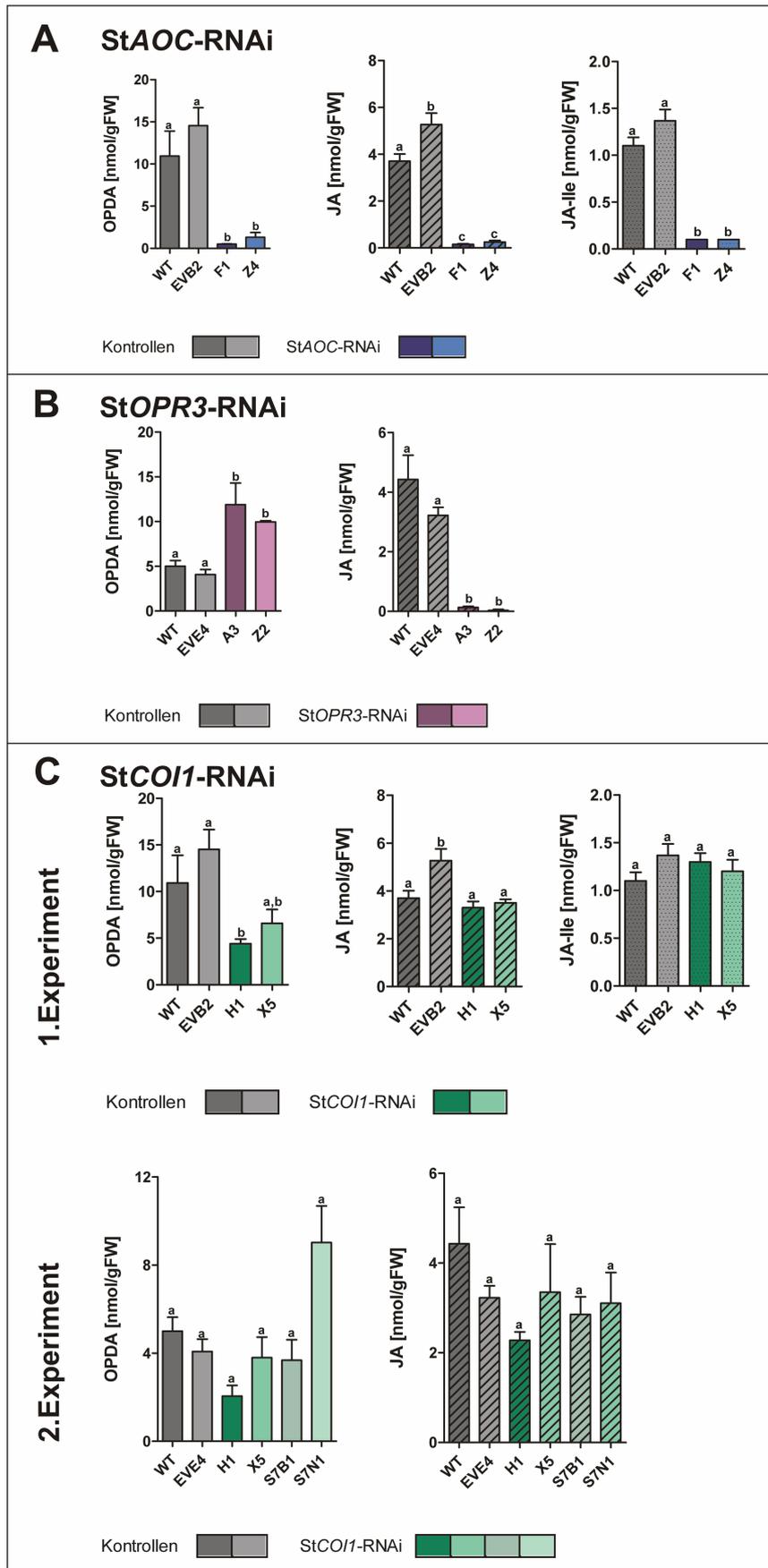


Abb. C-7:
Gehalt an OPDA, JA und JA-Ile in verwundeten RNAi-Pflanzen

Blätter von 3 Wochen alten Kartoffelpflanzen wurden mit einer Pinzette verwundet und nach 30 min. geerntet. Die Menge an JA, OPDA und JA-Ile in den jeweiligen Linien wurde mit Hilfe von GC-MS-Messungen bestimmt.

A) StAOC-RNAi F1 und Z4; Wildtyp WT; Vektorkontrolle EVB2

B) StOPR3-RNAi A3 und Z2; Wildtyp WT und Vektorkontrolle EVE4

C)

1. Experiment:
 StCOI1-RNAi H1, X5; Wildtyp WT; Vektorkontrolle EVB2

2. Experiment:
 StCOI1-RNAi H1, X5, S7B1 und S7N1; Wildtyp WT; Vektorkontrolle EVE4.

Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte (n=4; für EVB2, StOPR3-RNAi A3 und Z2 n=3) und Standardfehler.

Verschiedene Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Linien (einfaktorielle Varianzanalyse, Dunnett's *post-hoc* Test, $p < 0,05$).

1.4 Pep-13-induzierte Abwehrantworten in den StAOC- StOPR3- und StCOII-RNAi-Pflanzen

Die transgenen RNAi-Pflanzen mit herabgesetzter Expression der StAOC, StOPR3 und StCOII wurden genutzt, um die Rolle der Octadecanoide OPDA und JA während der Pep-13-induzierten Signalkaskade in Kartoffelpflanzen näher zu analysieren.

1.4.1 Nekrosenbildung und ROS-Akkumulation

Nach Infiltration der Blätter mit dem Peptid-Elicitor Pep-13 kommt es zur Ausprägung einer starken Nekrose. Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass diese Reaktion von der Akkumulation der Signalsubstanz SA abhängt. Außerdem geht die Bildung der Nekrose mit DNA-Fragmentierung einher (Halim *et al.*, 2004), und weist somit Charakteristika einer HR auf.

Im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen und Vektorkontrollen B2 und E4 sind die Nekrosen in allen getesteten RNAi-Linien nach Pep-13-Behandlung deutlich geringer ausgeprägt. Während in den Kontrollpflanzen die gesamte infiltrierte Fläche die Nekrose ausbildet, ist in den StAOC-, StOPR3 und StCOII-RNAi-Pflanzen meist nur ein kleiner Gewebereich direkt um die Infiltrationsstelle von der HR betroffen (Abb. C-8). Dies ist in Abb. C-8 sowohl anhand von Fotos beispielhafter Nekrosen aus je drei verschiedenen Experimenten verdeutlicht, als auch in einem Diagramm, für das die nekrotische Fläche nach Pep-13-Infiltration der einzelnen Linien mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware quantifiziert wurde.

In allen Linien konnte, wie schon in vorherigen Arbeiten, gezeigt werden, dass Infiltration mit dem inaktiven Analogon des Pep-13, W2A, zu keiner Reaktion führt. Die Experimente bestätigen damit Arbeiten von V. Halim und D. Wolf, in denen nach Pep-13-Infiltration ebenfalls eine deutlich reduzierte Nekrosenbildung für die StOPR3-RNAi bzw. die StCOII-RNAi-Pflanzen beobachtet wurde (Wolf, 2005; Halim, 2006).

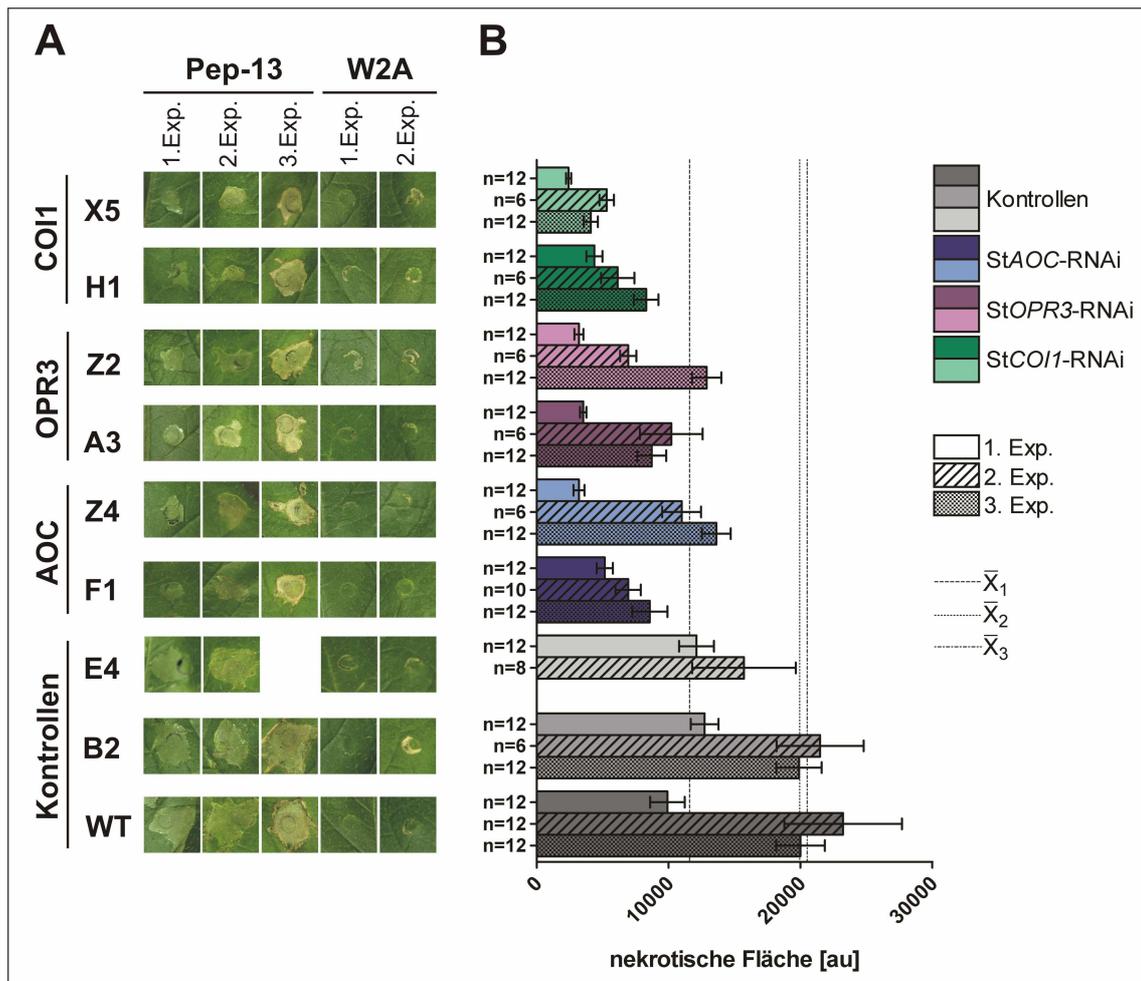


Abb. C-8: HR-ähnliche Zelltodreaktion nach Pep-13-Infiltration in RNAi-Pflanzen

A) Blätter von ca. 3 Wochen alten Pflanzen wurden mit Pep-13 oder W2A (je 100 μ M) infiltriert. Die HR wurde mit einer Kamera 24 h (1. = Exp. 1), 72 h (2. = Exp. 2) bzw. sechs Tage (3. = Exp. 3) nach Infiltration fotografiert. Gezeigt ist jeweils ein Blattausschnitt mit einer für die Linie typischen Nekrose. Im dritten Experiment fehlt die W2A-Kontrolle.

B) Für die Quantifizierung mit der Software ImageJ wurden mehrere Nekrosen von ein bis zwei Pep-13-behandelten (100 μ M) Blättern gemessen, wobei die Anzahl der Nekrosen links neben dem Balken im Diagramm aufgeführt ist. Dargestellt werden die Mittelwerte und ihr Standardfehler. Die Linien im Diagramm markieren den Mittelwert der nekrotischen Fläche der Kontrollpflanzen für das jeweilige Experiment (\bar{x}_1 , \bar{x}_2 , \bar{x}_3). Eine statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der einfaktoriellem Varianzanalyse mit Dunnett's *post-hoc* Test. Die Ergebnisse der Varianzanalyse sind in Tabelle 2 im Anhang aufgelistet

Neben der Ausbildung einer HR kann im Bereich der Pep-13-Infiltration zeitgleich auch eine Akkumulation von ROS beobachtet werden (Halim *et al.*, 2004). Es konnte mittels DAB-Färbung gezeigt werden, dass der Verlust der JA-Akkumulation in den StAOC-, StOPR3-, sowie StCOI1-RNAi-Pflanzen zu einer deutlich verminderten Bildung von H₂O₂ nach Pep-13-Behandlung führt (Abb. C-9). Diese tritt in den RNAi-Pflanzen nur im direkten Bereich der Infiltrationsstelle auf (dort wo die Spritze angesetzt wurde) und nicht, wie in den Kontrollpflanzen, über den gesamten infiltrierten Gewebereich. Somit weist die ROS-Akkumulation sowohl eine zeitliche als auch lokale Korrelation mit der HR auf. Infiltration des inaktiven Analogons W2A führt in keiner der Pflanzenlinien zu einer H₂O₂-Bildung. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit vorangegangenen

Untersuchungen an den *StOPR3*-RNAi- sowie *StCOII*-RNAi-Pflanzen durch V. Halim und D. Ellinger (Wolf, 2005; Halim, 2006).

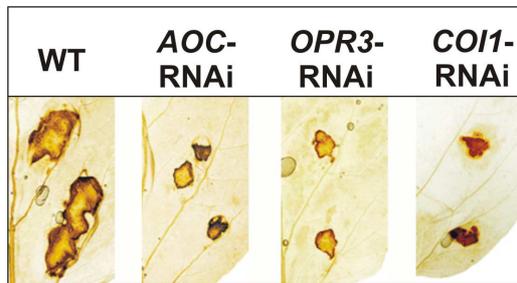


Abb. C-9: H₂O₂-Akkumulation in den RNAi-Pflanzen nach Pep-13-Behandlung

Ein Blatt einer Wildtyp-Kartoffel (WT), einer *StAOC*-RNAi-Pflanze (Linie F1), einer *StOPR3*-RNAi-Pflanze (Linie A3) sowie einer *StCOII*-RNAi-Pflanze (Linie X5) wurde mit 100 μ M Pep-13 an 6 Stellen infiltriert. 24 h nach der Infiltration wurden die Blätter einer DAB-Färbung für H₂O₂ unterzogen und anschließend mit Ethanol entfärbt. Gezeigt ist ein beispielhafter Blattausschnitt. Das Experiment wurde wiederholt, wobei ähnliche Ergebnisse erhalten wurden.

1.4.2 Akkumulation der Signalsubstanzen SA und JA

Eine weitere Teil der Pep-13-induzierten Abwehrantworten der Kartoffel ist die Akkumulation der Signalsubstanzen SA und JA (Halim *et al.*, 2004). Die RNAi-Linien mit herabgesetzter *AOC*- und *OPR3*-Transkriptakkumulation zeigen einen Verlust der OPDA- und JA-Akkumulation bzw. der JA-Akkumulation nach Verwundung. Daher wurde untersucht, ob diese Pflanzen ebenso in ihrer Fähigkeit auf die Pep-13-Behandlung mit JA-Akkumulation zu reagieren, eingeschränkt sind.

Messungen des Gehaltes an OPDA und JA 24 h nach Infiltration von Pep-13 bzw. W2A ergaben, dass es in den *StAOC*-RNAi-Linien F1 und Z4, ebenso wie in den *StOPR3*-RNAi-Linien A3 und Z2 zu einem Verlust der JA-Akkumulation kommt (Abb. C-10). Damit wurden Daten von V. Halim für die *StOPR3*-RNAi-Linien bestätigt, die ebenso einen Verlust der JA-Akkumulation nach Pep-13 zeigen (Halim, 2006).

Im Gegensatz zur Reaktion auf Verwundung sind nach Pep-13-Behandlung die *StCOII*-RNAi-Linien H1 und X5 nicht in der Lage, JA zu akkumulieren. In der Arbeit von D. Wolf war dies für die *StCOII*-RNAi-Linie H1 ebenso gezeigt worden (Wolf, 2005). Die eingeschränkte *COII*-Transkriptakkumulation, und damit die vermutlich reduzierte JA-vermittelte Signaltransduktion, führt also zum Verlust der JA-Biosynthese nach Pep-13 nicht aber nach Verwundung (Abb. C-10 und C-7).

Die Akkumulation von OPDA wies im gezeigten Experiment keine Unterschiede zwischen der Pep-13- und W2A-Behandlung auf, obwohl in zwei Kinetiken nach Pep-13-Behandlung eine signifikante Akkumulation von OPDA in Wildtyp-Kartoffelpflanzen beobachtet werden konnte (vgl. Abb. C-2). Trotz dieser Nicht-Induktion in den Kontrollpflanzen kann eine verminderte OPDA-Akkumulation in den RNAi-Pflanzen detektiert werden.

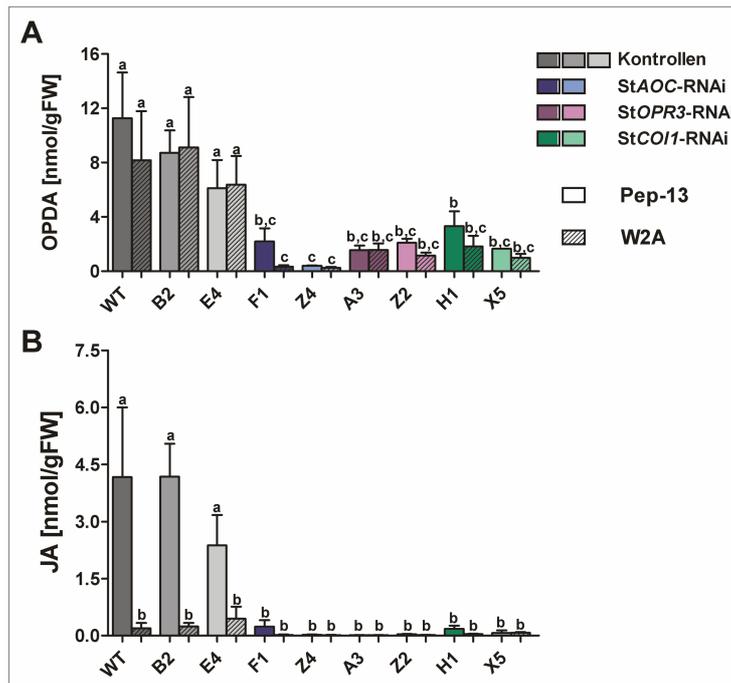


Abb. C-10: JA- und OPDA-Level in den RNAi-Pflanzen nach Pep-13-Behandlung

Blätter von ca. drei Wochen alten transgenen Pflanzen (StAOC-RNAi F1/Z4, StOPR3-RNAi A3/Z2, StCOI1-RNAi H1/X5) und Kontrollpflanzen (Wildtyp WT, Vektorkontrolle B2/E4) wurden vollständig mit 100 μ M Pep-13 bzw. 100 μ M W2A infiltriert. Der Gehalt an OPDA bzw. JA 24 h nach der Behandlung wurde mit einer GC-MS-basierten Methode bestimmt ($n=3$). Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte durch eine einfaktorische Varianzanalyse mit Dunnett's *post hoc* Test (Vergleich gegen WT Pep-13). Verschiedene Buchstaben stehen für verschiedene Signifikanzklassen.

Für die StOPR3-RNAi-Pflanzen und ebenso für die StCOI1-RNAi-Linie H1 wurde in oben genannten Arbeiten gezeigt, dass der Verlust der JA-Biosynthesekapazität bzw. der JA-Signalkomponente COI1 die SA-Akkumulation nach Pep-13-Infiltration nicht unterdrückt (Wolf, 2005; Halim, 2006).

In dieser Arbeit wurde daher der Gehalt an freier SA und glycosylierter SA in allen sechs RNAi-Linien innerhalb eines Experiments gemessen, um dieses Ergebnis mit den StAOC-RNAi-Pflanzen zu bestätigen bzw. zu sehen, ob Unterschiede in der akkumulierten Menge auftreten.

Wie in Abb. C-11 verdeutlicht, ergaben HPLC-Messungen zweier unabhängiger Experimente einen deutlichen Anstieg der SA und SAG-Level nach Pep-13-Behandlung im Vergleich zur W2A-Kontrollbehandlung. Die akkumulierte Menge an SA und SAG unterscheidet sich nicht zwischen den Wildtyp- bzw. Vektorkontrollen und den RNAi-Linien, noch zeigen sich Unterschiede innerhalb der RNAi-Linien.

Zusammen mit publizierten Daten zu transgenen *NahG*-exprimierenden Pflanzen (Halim *et al.*, 2004) kann daraus der Schluss gezogen werden, dass die SA-Akkumulation in der Pep-13-induzierten Signalkaskade oberhalb der JA-Akkumulation liegt.

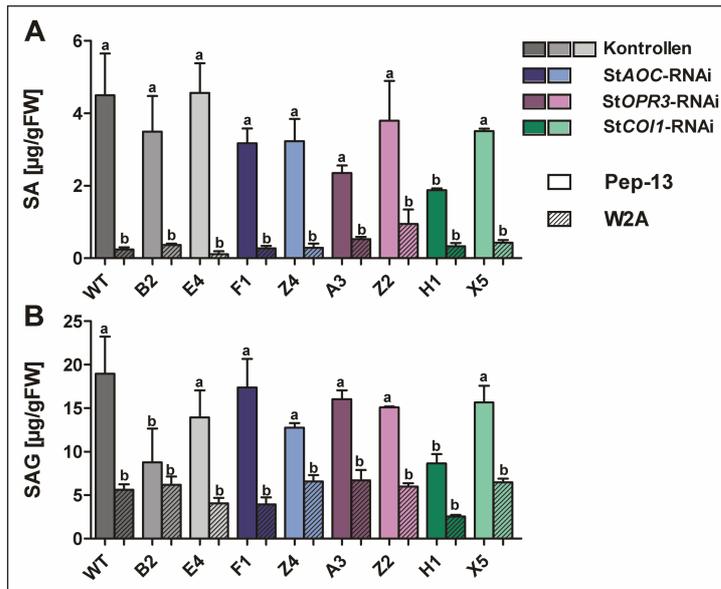


Abb. C-11: Pep-13 induzierte Akkumulation von SA und SAG in JA-defizienten RNAi-Pflanzen

Pep-13 bzw. W2A-infiltrierte (je 100 µM) Pflanzen wurden 24 h nach Behandlung auf die Akkumulation von SA (A) und SAG (B) hin untersucht. Die transgenen Pflanzen (*StAOC*-RNAi F1/Z4, *StOPR3*-RNAi A3/Z2, *StCOI1*-RNAi H1/X5) und Kontrollpflanzen (Wildtyp WT, Vektorkontrolle B2/E4) wurden jeweils als Triplikate analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte mit einfaktorieller Varianzanalyse und Dunnett's *post hoc* Test ($p < 0,05$). Unterschiedliche Buchstaben zeigen verschiedene Signifikanzklassen an. Dieses Experiment wurde einmal wiederholt.

1.4.3 Pep-13-induzierte Genexpression

Veränderungen im Genexpressionsmuster treten in allen Pflanzen als Teil der Abwehrantwort auf Pathogene und auch PAMPs auf. Sie ermöglichen es der Pflanze auf diese Stresssituation mit geeigneten Abwehrmaßnahmen zu reagieren.

Aus Literaturdaten sind eine Reihe von Abwehrgenen bekannt, deren Expression nach Pep-13 aktiviert ist (Geiler, 2001; Brunner *et al.*, 2002). Dazu gehören u.a. die *PR*-Gene *StPRI*, *StPR5* sowie die 9-Lipoxygenase *StLOX1*. Diese wurden auch in der vorliegenden Arbeit auf ihre Akkumulation nach Behandlung mit Pep-13 in den JA-defizienten bzw. JA-insensitiven RNAi-Pflanzen hin untersucht. Die Transkripte dieser drei Gene akkumulieren in den RNAi-Pflanzen ebenso wie in den Kontrollpflanzen nach Pep-13-Infiltration, nicht aber in der Kontrollbehandlung mit W2A (s. Abb. C-12 A). Diese Gene werden also in der Pep-13-Antwort JA-unabhängig reguliert (s. auch (Wolf, 2005).

Im Gegensatz dazu ergaben Northern Analysen von *StPIN2* sowie der Kupfer-Aminoxidase *StCAO* eine deutliche Reduktion der Transkriptmengen dieser Gene in allen JA-reduzierten RNAi-Linien (Abb. C-12 B und C). Ein Teil der Pep-13-induzierten Abwehrgene wird somit in Abhängigkeit einer funktionalen JA-Signaltransduktionskette reguliert.

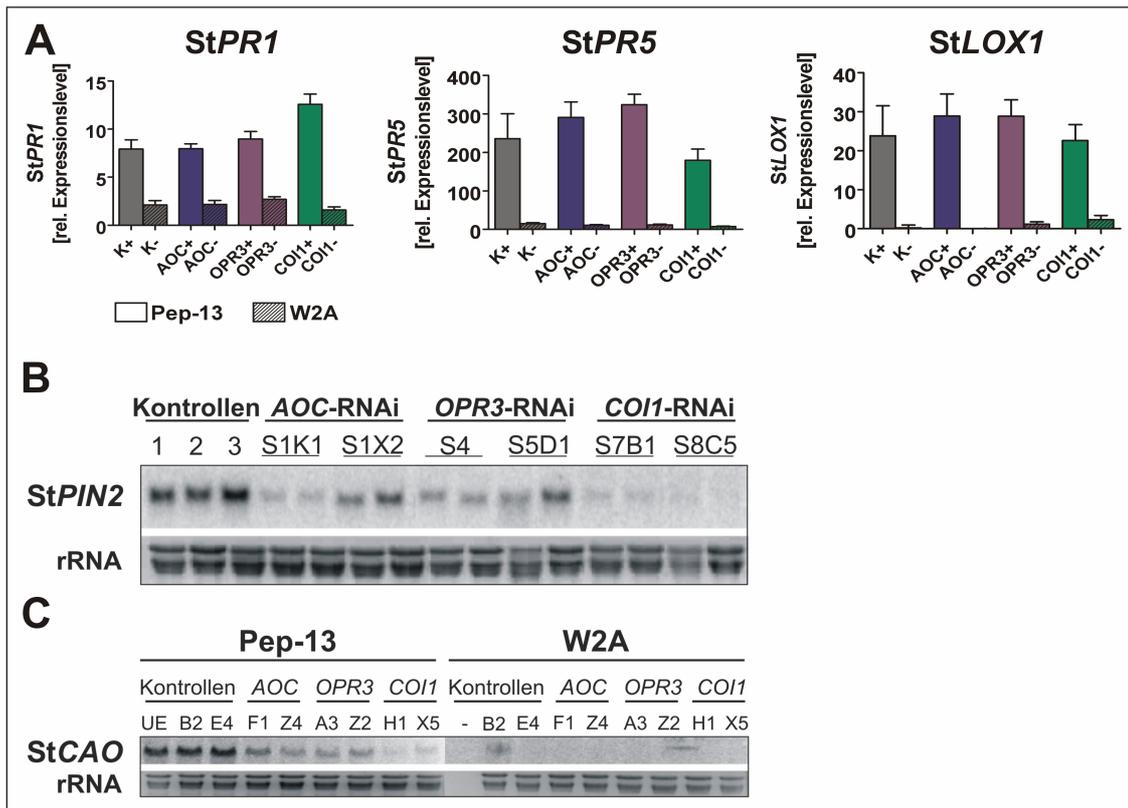


Abb. C-12: Abwehrgenexpression in mit Pep-13 infiltrierten RNAi-Pflanzen

24 h nach Pep-13- oder W2A-Behandlung wurde aus den transgenen RNAi- sowie Kontrollpflanzen RNA isoliert und einer Northern Blot-Analyse unterzogen.

A) Die Hybridisierung der Membranen (20 µg eingesetzter RNA) erfolgte mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten des *StPR1*, des *StPR5* und der *StLOX1*. Die Bandenintensitäten wurden mit der Software ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics) gemessen und auf die Ethidiumbromid-gefärbte rRNA normalisiert. + Pep-13 (100 µM), - W2A (100 µM); K, Kontrollpflanzen (Wildtyp, Vektorkontrollen Linie B2/E4; n=9); AOC, *StAOC*-RNAi-Pflanzen (Linie F1/Z4, n=6); OPR3, *StOPR3*-RNAi-Pflanzen (Linie A3/Z2, n=6); COI1, *StCOI1*-RNAi-Pflanzen (Linie H1/X5, n=6). Die statistische Auswertung erfolgte als parameterfreie Varianzanalyse mit Dunn's *post hoc* Test, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und RNAi-Pflanzen erkennbar waren.

B) *StPIN2*-Transkriptakkumulation in Kontrollpflanzen (1=Wildtyp Désirée r1; 2=Vektorkontrolle LV-41; 3=Désirée 10-23 R1) und transgenen RNAi-Pflanzen (s. Kapitel C-2.3.) 24 h nach Pep-13-Infiltration. Als Sonde diente radioaktiv-markierte cDNA. 15 µg RNA wurden eingesetzt.

C) *StCAO*-Transkriptakkumulation in Kontrollpflanzen, sowie *StAOC*-, *StOPR3*- und *StCOI1*-RNAi-Pflanzen. Es wurden 15 µg RNA für die Northern Blot-Analysen eingesetzt. Ein ³²P-markiertes cDNA-Fragment der *StCAO* diente als Sonde.

Für B) und C) ist die rRNA im Ethidiumbromid-gefärbten Gel als Ladekontrolle gezeigt.

1.5 Microarray-Analysen nach Pep-13-Behandlung

Northern-Analysen können nur einen kleinen Einblick in die Veränderungen des Transkriptom nach einem definierten Stimulus geben. Dagegen ermöglichen Microarray-Analysen die Erfassung globaler Trends der transkriptionellen Antwort auf eine Behandlung, in einem definierten genetischen Hintergrund oder in einer Kombination von beidem. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit U. Sonnwald (Universität Erlangen-Nürnberg) und L. Eschen-Lippold (IPB, Halle (Saale)) Microarray-Experimente durchgeführt, um die PAMP-induzierten Veränderungen im

Genexpressionsmuster von Kartoffelpflanzen zu erfassen. Gleichzeitig wurden durch die Verwendung der RNAi-Pflanzen in den Experimenten die Oxylin-abhängigen transkriptionellen Antworten auf die PAMP-Behandlung untersucht.

Neben einem Überblick über generelle Muster in den Veränderungen des Transkriptom der JA-defizienten bzw. -insensitiven Kartoffelpflanzen nach Behandlung mit dem Peptidelicitor Pep-13 sollten die Microarray-Daten auch genutzt werden, um Kandidaten für Oxylin-regulierte Gene in der Pep-13-Antwort zu erhalten, worauf in Abschnitt 1.5.2 näher eingegangen wird.

1.5.1 Oxylin-abhängige Veränderungen im Genexpressionsmuster nach Pep-13-Behandlung

Für die Microarray-Experimente wurden die Expressionsprofile von Wildtyp-, *StAOC*-RNAi, *StOPR3*-RNAi sowie *StCOII*-RNAi-Pflanzen acht Stunden nach Behandlung mit dem PAMP Pep-13 bzw. der inaktiven Kontrolle W2A miteinander verglichen. Für sämtliche Auswertungen muß beachtet werden, dass es sich bei den Sonden auf dem Chip um EST-Sequenzen handelt, die zur Vereinfachung im Folgenden als „Gene“ bezeichnet werden. Da Kartoffel jedoch noch nicht sequenziert ist, sollte beachtet werden, dass die *Identifier* des Chips nur Genfragmente darstellen und es zu Überschneidungen bzw. Doppelt-Nennungen kommen kann.

1.5.1.1 Vergleich der W2A-behandelten RNAi- und Wildtyp-Pflanzen

Zunächst wurde betrachtet, welchen Einfluss die Herabsetzung der OPDA- bzw. JA-Gehalte auf die basale Genexpression in Kartoffelblättern hat. Für die Experimente dienten W2A-infiltrierte Blätter als Kontrolle für den bei der Infiltration auftretenden Verwundungs-Stimulus und somit liegen keine Expressionsdaten für unbehandelte Kartoffelblätter vor. Deshalb wurden als Näherung paarweise Vergleiche der W2A-behandelten RNAi-Proben mit den W2A-behandelten Wildtyp-Proben durchgeführt und die Anzahl der mindestens dreifach differentiell exprimierten Gene in diesen Behandlungen ermittelt (s. Abb. C-13 A). Es zeigt sich, dass in den *StAOC*-RNAi-Pflanzen 68 Gene, in den *StOPR3*-RNAi-Pflanzen 68 Gene und in den *StCOII*-RNAi-Pflanzen 86 Gene im Verhältnis zum Wildtyp 3-fach verändert reguliert werden. Von diesen vergleichsweise wenigen Genen weist der größere Anteil eine Reduktion der Genexpression im Vergleich zum Wildtyp auf. In der Gruppe dieser reduziert exprimierten Gene finden sich auch die Gene, gegen die sich die RNAi-Konstrukte richten, wobei mit Hilfe der Microarray-Daten eine 76-fache Reduktion der *StAOC*-Expression in den *StAOC*-RNAi-Pflanzen, eine 56-fache Reduktion der *StOPR3*-

Expression in den *StOPR3*-RNAi-Pflanzen, sowie eine 16-fache Reduktion der *StCOII*-Expression in den *StCOII*-RNAi-Pflanzen nachweisbar war. Viele, der in ihrer Expression reduzierten Gene weisen Ähnlichkeit zu bekannten Verwundungs-responsiven Genen auf (Proteinase- oder Protease-Inhibitor-Vorläufer, Polyphenoloxidase-Vorläufer oder Polygalacturonase-Vorläufer) und könnten somit Teil einer leichten JA-abhängigen Wundantwort nach Infiltration sein. Die geringen Veränderungen im Expressionsprofil der RNAi-Pflanzen nach Kontrollbehandlung deuten auf einen relativ kleinen Einfluss der RNAi-Konstrukte auf das Transkriptom in ungestressten Blättern hin.

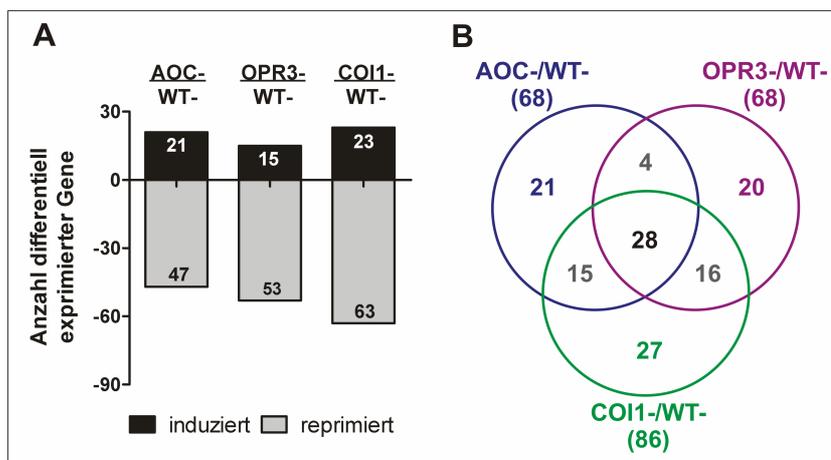


Abb. C-13: Anzahl der nach W2A-Behandlung in RNAi-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen differenziell regulierten Gene

Die Microarray-Analysen erfolgten nach W2A-Behandlung von Wildtyp- bzw. RNAi-Pflanzen (8hpi, je drei biologische Replikate).

A) Graphisch dargestellt wird die Gesamtzahl der in RNAi-Pflanzen im Verhältnis zu Wildtyp-Pflanzen mindestens

dreifach differenziell exprimierten Gene. Die Berechnung erfolgte mit den normalisierten Intensitätswerten in GeneSpring GX 7.3.1 der Firma Agilent ($p < 0,05$, parametrischer Test, keine homogenen Varianzen angenommen). WT, Wildtyp-Pflanzen; AOC, *StAOC*-RNAi-Pflanzen, OPR3, *StOPR3*-RNAi-Pflanzen, COI1, *StCOI1*-RNAi-Pflanzen

B) Vergleich der nach W2A-Kontrollbehandlung in RNAi-Pflanzen im Verhältnis zu Wildtyp-Pflanzen differenziell exprimierten Gene im Venn-Diagramm

1.5.1.2 Analyse der Pep-13-behandelten Wildtyp- und RNAi-Pflanzen

Die Infiltration des Peptidelicitors Pep-13 in Kartoffelblätter führt makroskopisch nach ca. 24 Stunden zur Ausprägung einer HR, was auf starke Pep-13-induzierte Änderungen im Genexpressionsmuster der Kartoffel hindeuten könnte. Eine Analyse der Expressionsprofile zeigt, dass in Wildtyp-Pflanzen nach Pep-13-Behandlung im Vergleich zur W2A-Kontrolle ca. 1200 Gene mindestens dreifach differenziell exprimiert werden. Dabei sind mehr Gene nach Pep-13-Behandlung aktiviert als reprimiert (s. Abb. C-14 A). In den RNAi-Pflanzen ist die Anzahl der nach Pep-13-Infiltration mindestens dreifach differenziell exprimierten Gene deutlich reduziert (im Schnitt um 50%) (s. Abb. C-14 A). In den *StAOC*-RNAi-Pflanzen können noch 463 Gene, in den *StOPR3*-RNAi-Pflanzen noch 612 Gene und in den *StCOII*-RNAi-Pflanzen noch 728 Gene mit veränderter Genexpression nachgewiesen werden.

Um eine Aussage zur Abhängigkeit der in Wildtyp-Pflanzen differentiell regulierten Gene von dem Vorhandensein der Signalmoleküle JA und/oder OPDA bzw. von einem intakten JA-Signalweg treffen zu können, wurden die in Wildtyp- bzw. RNAi-Pflanzen differentiell exprimierten Gene einem paarweisen Vergleich unterzogen (s. Abb. C-14 B-D). Aus diesen Einzelvergleichen resultierten jeweils Gene, deren Expression in Wildtyp-Pflanzen durch Pep-13-induzierte Signalwege verändert ist, die jedoch in der entsprechenden RNAi-Linie nicht differentiell reguliert sind. Die Expression dieser Gene nach Pep-13-Behandlung ist also abhängig von JA, OPDA und/oder StCOI1 (s. Abb. C-14 B-D).

Über den paarweisen Vergleich wurden Gengruppen erhalten, die nach Pep-13-Infiltration in den RNAi-Linien differentiell reguliert sind, in Wildtyp-Pflanzen jedoch nicht differentiell exprimiert werden (s. Abb. C-14, B-D). Diese Gene weisen somit vermutlich eine durch die RNAi-Konstrukte induzierte Fehlregulation auf.

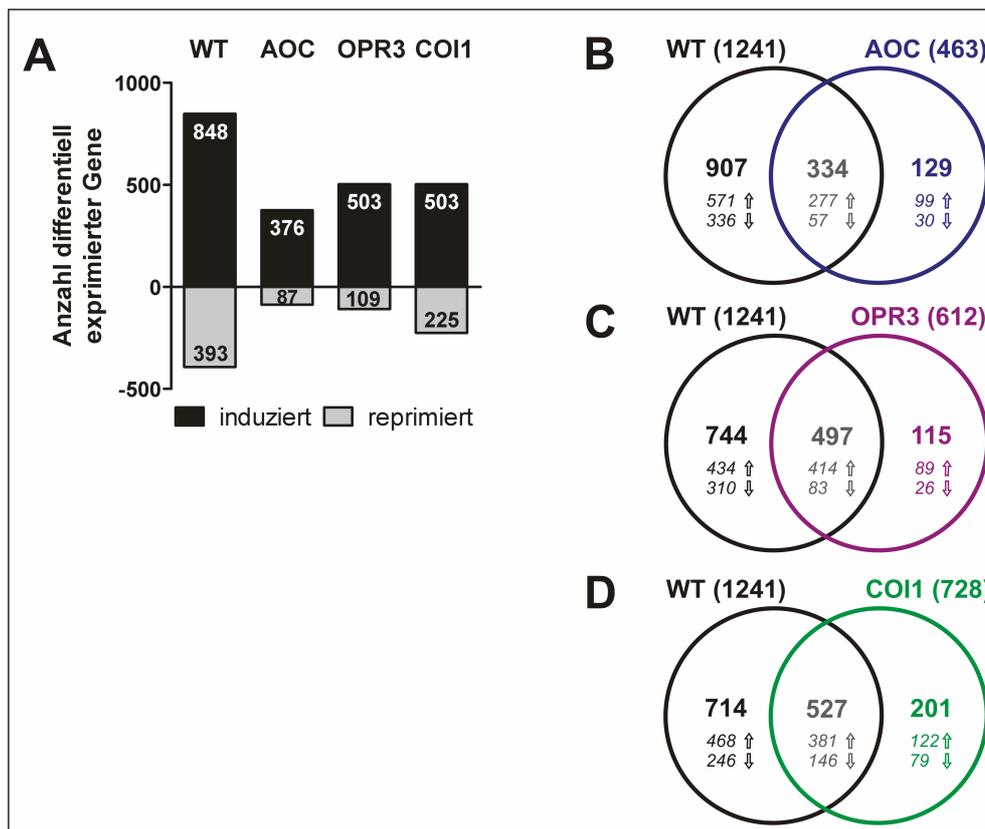


Abb. C-14: Anzahl differentiell exprimierter Gene in Wildtyp- und RNAi-Kartoffelpflanzen nach Pep-13-Infiltration

Kartoffelpflanzen wurden mit Pep-13 bzw. W2A (100 μ M) infiltriert und nach acht Stunden geerntet. Die RNA dieser Pflanzen wurde für eine globale Genexpressionsanalyse m. H. v. Microarray-Hybridisierungen genutzt (drei biologische Replikate). Aus den normalisierten Intensitätswerten wurde für jedes Gen die x-fache Expression nach Pep-13-Behandlung im Vergleich zur W2A-behandelten Kontrolle berechnet.

A) Die Gesamtzahl mindestens dreifach differentiell exprimierter Gene ist im Diagramm für jede Linie dargestellt. WT, Wildtyp-Pflanzen; AOC, StAOC-RNAi-Pflanzen, OPR3, StOPR3-RNAi-Pflanzen, COI1, StCOI1-RNAi-Pflanzen ($p < 0,05$, parametrischer Test, nicht homogene Varianzen angenommen; Auswertung mit GeneSpring GX 7.3.1, Agilent).

B)-D) Paarweise Vergleiche der mindestens dreifach differentiell exprimierten Gene im Venn-Diagramm. Es wurden jeweils die Gesamtzahl der regulierten Gene (in Klammern neben dem Linien-Kürzel) von Wildtyp-

Pflanzen (linke Seite) mit der der RNAi-Pflanzen (rechte Seite) verglichen. Daraus resultierten Mengen von differenziell in Wildtyp-Pflanzen, und nicht differenziell in der jeweiligen RNAi Linie exprimierten Genen (linke Seite der Venn-Diagramme), sowie Gene die in den jeweiligen RNAi-Linien aber nicht in Wildtyp-Pflanzen differenziell exprimiert werden (rechte Seite der Venn-Diagramme). Nach oben bzw. nach unten gerichtete Pfeile kennzeichnen die Anzahl der induzierten bzw. reprimierten Gene.

Für die Fragestellung nach der Rolle der Oxylipine in der Pep-13-induzierten Signalverarbeitung in Kartoffel sind die RNAi-abhängig exprimierten Gene von besonderem Interesse, da die Expression dieser Gene von JA und/oder OPDA bzw. StCOI1 beeinflusst wird. Diese 907 StAOC-abhängig, 744 StOPR3-abhängig und 714 StCOI1-abhängig exprimierten Gene (s. Abb. C-14 B-D) wurden daher einem zweiten Vergleich mittels Venn-Diagramm unterzogen (s. Abb. C-15). Für die verschiedenen erhaltenen Gengruppen lassen sich unterschiedliche Regulationsmechanismen postulieren.

Die Expression der 492 Gene in der gemeinsamen Menge XYZ (s. Abb. C-15) ist vermutlich in Abhängigkeit von JA über StCOI1 reguliert, da diese Gene in allen drei RNAi-Linien nicht differenziell, im Wildtyp aber differenziell nach Pep-13-Behandlung exprimiert werden (Vgl. Abb. C-14 B-D).

Die 127 Gene der Teilmenge X (s. Abb. C-15) werden im Wildtyp nur in Abhängigkeit von StAOC nicht aber StOPR3 oder StCOI1 reguliert. Sie sind somit OPDA-abhängig und StCOI1-unabhängig reguliert. OPDA- und StCOI1-abhängig regulierte Gene sollten sich in der Teilmenge XZ (131 Gene, s. Abb. C-15) befinden. Die 53 Gene der Teilmenge Y und die 157 Gene der Teilmengen XY (s. Abb. C-15) müßten ein StCOI1-unabhängiges JA-abhängiges Expressionsprofil aufweisen.

Für die 49 Gene in der Teilmenge Z (s. Abb. C-15) könnte postuliert werden, dass deren Regulation nur StCOI1-abhängig verändert ist. Betrachtet man auch hier die Verhältnisse der Expressionsdaten (Pep-13-Behandlung im Verhältnis zu W2A-Behandlung) zeigt sich jedoch, dass die Gene dieser Gruppe im Allgemeinen in den RNAi- und Wildtyp-Pflanzen den gleichen Trend hinsichtlich ihres Expressionsprofils zeigen. Hauptsächlich aufgrund eines nicht signifikanten p-Wertes wurden diese Gene in den RNAi-Linien als nicht differenziell gruppiert. Da sich daraus keine echte, biologisch relevante Abhängigkeit ausschließlich von StCOI1 ableiten lässt, sind diese Gene weniger interessant für die folgenden Auswertungen. Solche Beispiele sind auch unter den Expressionsprofilen der anderen Gruppen zu finden, aber dort nur zu einem geringeren Anteil.

Die 42 Gene der Teilmenge YZ sollten aus biologischer Sicht nicht existieren, da es sich theoretisch um JA-abhängig und StCOI1-abhängig regulierte Gene handelt, die jedoch nicht in Abhängigkeit von StAOC reguliert werden. Betrachtet man den OPDA/JA-Biosyntheseweg, in dem StAOC oberhalb von StOPR3 liegt, dann sollten alle JA-abhängig regulierten Gene in den StAOC-RNAi-Pflanzen, die kein JA mehr

synthetisieren ebenso differentiell reguliert sein. Diese Gene scheinen demnach Falsch-Positive des Testverfahrens darzustellen.

Damit wird auch ein Problem der auf Venn-Diagrammen beruhenden Vergleiche deutlich. Die Gruppierung der Gene erfolgt qualitativ nach dem Ja-Nein-Prinzip: Gene werden nach x-facher Expressionsänderung mit einem bestimmten p-Wert sortiert. Es könnten aber Gene existieren, die in den RNAi-Pflanzen eine ähnliche x-fache Induktion oder Reprimierung der Genexpression wie die in den Wildtyp-Pflanzen zeigen, den p-Wert von 0,05 jedoch nicht unterschreiten und daher als „Nicht-in-dieser-Gruppe“ klassifiziert werden, obwohl die Expression dieser Gene sich nicht wesentlich vom Wildtyp unterscheidet. Oder aber Gene sind in der gleichen Gruppe als x-fach differentiell eingeordnet, wobei die Grenze x überschritten wird, aber rein quantitativ liegt eine deutliche Reduktion der Expression im Verhältnis zum Wildtyp vor. Die Einteilung der Gene basierend auf diesen Venn-Diagrammen ist daher nur ein Hinweis auf einen Trend im Genexpressionsmuster, der einer Verifizierung für jedes einzelne Gen bedürfte. Dennoch kann man aus diesen Listen Kandidaten ableiten, die für den betrachteten biologischen Prozeß relevant sein könnten.

Der Vollständigkeit halber ist auch der Vergleich der Genlisten mit den in den RNAi-Linien fehlregulierten Genen aufgeführt (s. Anhang A-XI). Diese Gene wurden jedoch in den folgenden Auswertungen nicht näher betrachtet. Die meisten Gene dieser Gruppen enthielten keine auf den ersten Blick relevanten Informationen, sondern waren häufig, eine Folge der rein mathematischen Gruppierung aufgrund mangelnder Signifikanz in den Wildtyp-Proben (p-Wert >0,05).

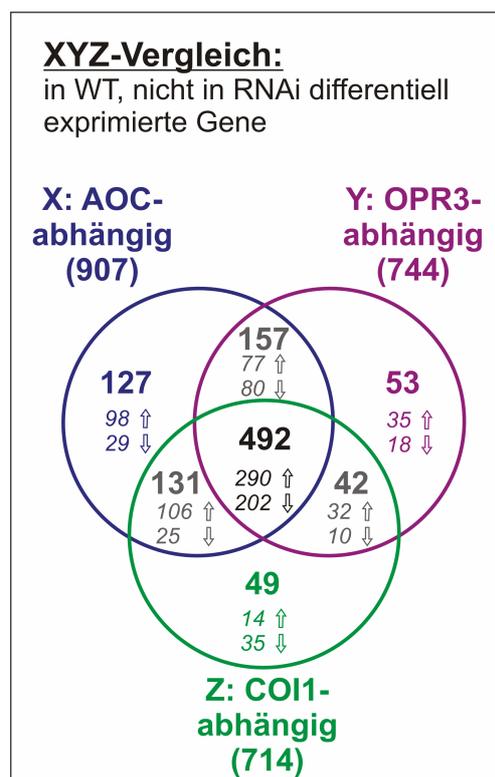


Abb. C-15: Vergleich der RNAi-abhängig nach Pep-13-Behandlung differentiell regulierten Gene

Zugrunde liegen die Genlisten mit den nach Pep13-Behandlung dreifach differentiell exprimierten Genen (s. Abb. C-14). Die Auswertung erfolgte mit GeneSpring GX 7.3.1, Agilent. WT, Wildtyp-Pflanzen; AOC, StAOC-RNAi-Pflanzen, OPR3, StOPR3-RNAi-Pflanzen, COI1, StCOI1-RNAi-Pflanzen

Die Mengen X, Y und Z der differentiell exprimierten Gene im Wildtyp, aber nicht differentiell in der jeweiligen RNAi Linie wurden in einem Venn-Diagramm miteinander verglichen. Nach oben bzw. nach unten gerichtete Pfeile kennzeichnen die Anzahl der induzierten bzw. reprimierten Gene.

1.5.2 Oxylin-regulierte Kandidatengene in der Pep-13-Signalverarbeitung

Für erste weiterführende Analysen der Pep-13-Signalverarbeitung in Kartoffel wurden Gene ausgewählt, deren Expression in den *StAOC*-, *StOPR3*- sowie *StCOI1*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle reduziert war (s. Tabelle C-1). Diese wurden zum großen Teil der Liste der Gene XYZ (Vgl. Abb. C-15), deren Expression in Abhängigkeit von allen drei RNAi-Konstrukten im Wildtyp nach Pep-13-Behandlung differentiell exprimiert war, entnommen. Zusätzlich wurde die Liste der im Wildtyp nach Pep-13-Infiltration mehr als dreifach verändert exprimierten Gene auf in RNAi-Pflanzen stark reduzierte Gene untersucht, da diese teilweise in den Schnittmengen des Vergleichs der Wildtyp-Expression mit der, der RNAi-Linien (Vgl. Abb. C-14 B-D) anzutreffen waren und somit nicht in der Liste XYZ auftauchten.

Als Kandidaten wurden ein JAZ-Homologes ausgewählt, da JAZ-Proteinen eine fundamentale Rolle im JA-Signalweg zukommt (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007), weiterhin ein putativer Transkriptionsfaktor mit AP2/ERF-Domänen (*StAP2TF*), sowie mit *StTUBBY* ein möglicher transkriptioneller Regulator. Ferner wurde ein Gen mit Ähnlichkeit zu einer MAPK-Kinase-Kinase (*StMAPKKK*) ausgewählt, da MAPK-Kaskaden Signalfunktionen besitzen und eine MAPK-Kaskade als Signalkomponente für die HR-Antwort in Tabak diskutiert wird (Liu *et al.*, 2007). *StUBOX* wurde in die Kandidatenliste aufgenommen, da U-Box-Proteine als E3-Ubiquitin-Ligasen im 26S-Proteasom-Weg fungieren, über den vermutlich negative Regulatoren der Immunabwehr degradiert werden, um so eine schnelle Antwort auszulösen (Dreher und Callis, 2007). *StMYH19* war zunächst als unbekannt annotiert und *StMYST1* könnte eine Funktion in der Chromatin-Modifikation besitzen. *StABC* ist als ABC-Transporter annotiert und wurde unter dem Gesichtspunkt ausgewählt, dass gerichtete Sekretionsmechanismen für eine Abwehr nach PAMP-Erkennung wichtig sind (Thilmony *et al.*, 2006).

Kandidatengenen	WT			StAOC-RNAi		StOPR3-RNAi		StCOI1-RNAi		Homologie
	x-fache Veränderung	p-Wert	q-Wert	x-fache Veränderung	p-Wert	x-fache Veränderung	p-Wert	x-fache Veränderung	p-Wert	
<i>StJAZ</i>	12,63	0,02	0,031	1,12	0,78	0,96	0,96	0,83	0,77	AtJAZ8
<i>StAP2TF</i>	5,91	0,01	0,027	1,62	0,37	1,17	0,78	0,90	0,80	Transkriptionsfaktor mit AP2/ERF-Domänen
<i>StABC</i>	14,56	0,01	0,029	2,11	0,16	1,58	0,40	1,25	0,60	ABC-Transporter
<i>StUBOX</i>	27,40	0,01	0,026	5,64	0,01	9,12	0,00	6,43	0,01	Protein mit U-Box-Domäne
<i>StTUBBY</i>	6,54	0,01	0,029	1,60	0,05	0,97	0,94	0,77	0,74	Tubby Familie von Transkriptionsfaktoren
<i>StMAPKKK</i>	4,43	0,01	0,029	2,11	0,03	2,20	0,05	2,38	0,10	ATP-Bindung; Protein Kinase (<i>MAPKKK19</i>)
<i>StMYH19</i>	11,25	0,00	0,025	3,22	0,16	2,87	0,10	2,79	0,06	unbekannt, AtMYH19. 8-ähnlich
<i>StMYST1</i>	7,86	0,02	0,031	3,15	0,01	2,24	0,26	2,97	0,03	<i>myst</i> Familie der Histone Acetyltransferasen

Tabelle C-1: Intensitätswerte der Kandidatengene nach Infiltration von Pep-13 bzw. W2A
 Angegeben sind die Verhältnisse der normalisierten Intensitätswerte der Pep-13-behandelten Probe zur W2A-behandelten Kontrolle. Die Kandidatengene weisen in Wildtyp-Pflanzen nach Pep-13-Behandlung eine >3-fach-induzierte Expression auf ($p < 0,05$). Die p-Werte geben die Signifikanzschwelle an, mit der das Gen in der jeweiligen Linie nach Pep-13-Infiltration x-fach induziert vorliegt (parametrischer Test, inhomogene

Varianzen angenommen; Auswertung m. H. v. GeneSpring 7.3.1 der Firma Agilent). Für die Intensitätswerte in Wildtyp-Pflanzen wurde der p-Wert in den 1241 differentiell exprimierten Genen (s. Abb. C-13) nach Benjamini-Hochberg FDR korrigiert (*q-value*).

Die Daten aus den Microarray-Hybridisierungen hinsichtlich der Pep-13-spezifisch regulierten Genexpression der Kandidaten sollten zunächst mit Hilfe der quantitativen Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) verifiziert werden.

Dazu wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen die Pflanzen, wie bereits für die Arrays, acht Stunden nach Infiltration von Pep-13 bzw. W2A geerntet wurden. Aus den Ct-Werten der qRT-PCR-Messungen wurde die relative Expression ausgewählter Kandidatengene über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ermittelt. Dabei gibt der $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ -Wert das Verhältnis der Expression eines Zielgens in der behandelten Probe (Pep-13) zur Kontrolle (W2A), normalisiert auf ein Referenzgen, wieder (Schmittgen und Livak, 2008). Als Referenzgen wurde *StEF1 α* gewählt, von dem nach Literaturdaten in Kartoffel eine unter verschiedenen experimentellen Bedingungen stabile Expression erwartet werden konnte (Nicot *et al.*, 2005).

Das Pep-13-induzierte Genexpressionsmuster konnte für die Kandidaten *StJAZ*, *StAP2TF*, *StABC*, *StUBOX* und *StTUBBY* verifiziert werden (s. Abb. C-16). Alle fünf Kandidaten zeigen eine deutliche Aktivierung der Genexpression acht Stunden nach Pep-13-Behandlung in Wildtyp-Pflanzen und der Vektorkontrolle. Diese ist deutlich herabgesetzt in den *StAOC*-, *StOPR3*- sowie *StCOII*-RNAi-Pflanzen. Für die Expression von *StABC* und *StTUBBY* war dieses Muster im zweiten Experiment nicht statistisch abgesichert. Hier war nur die Expression in den *StCOII*-RNAi-Linien signifikant herabgesetzt.

Für drei weitere Kandidaten, *StMYST1*, *StMAPKKK* und *StMYH19* wurden die Transkriptmengen bislang nur für eines der Experimente mittels qRT-PCR bestimmt. Dabei zeigte sich, dass zwar die Pep-13-abhängige Expression in Wildtyp- bzw. Kontrollpflanzen bestätigt werden konnte, nicht aber die differentielle Expression in den JA-defizienten bzw. -insensitiven RNAi-Linien (Daten nicht gezeigt).

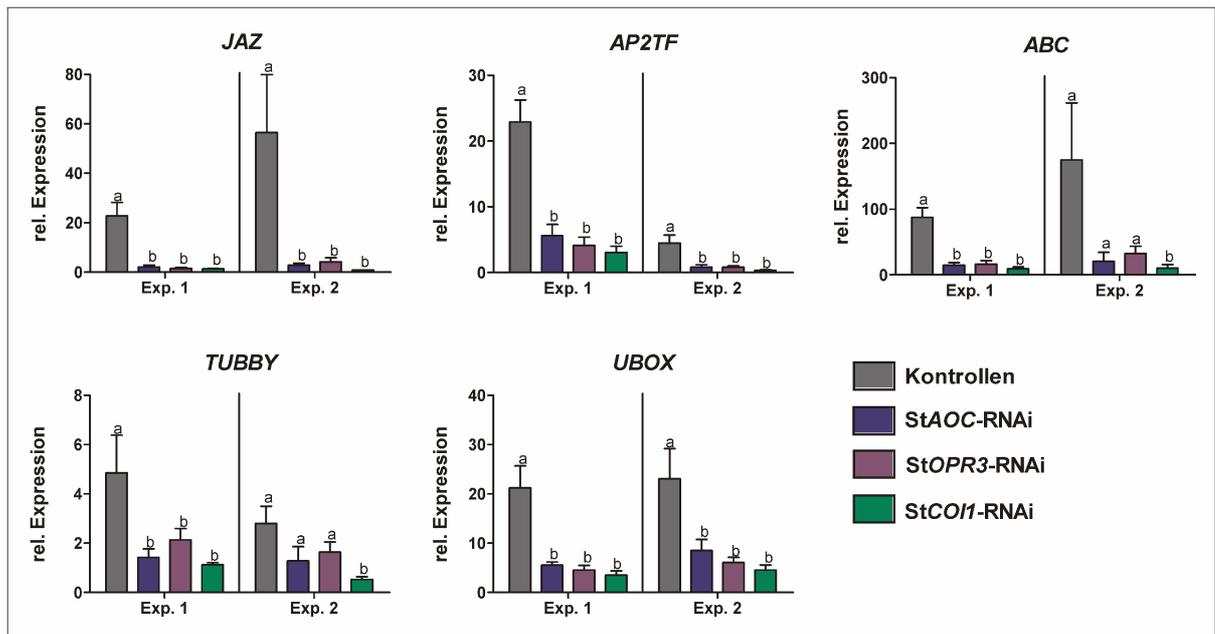


Abb. C-16: Pep-13 induzierte Expression ausgewählter Kandidatengene in StAOC-, StOPR3- und StCOI1-RNAi-Pflanzen

3 Wochen alte Kartoffelpflanzen wurden mit Pep-13 bzw. W2A (100 μ M) infiltriert und nach acht Stunden geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und 1 μ g RNA mit (dT)_n-Primern in cDNA umgeschrieben. Die Transkriptmenge der angegebenen Gene wurde mit Hilfe einer qRT-PCR bestimmt. Als Referenzgen diente *StEF1 α* . Es wurden je drei biologische Replikate in zwei unabhängigen Experimenten verwendet. Gezeigt ist der $\Delta\Delta C_T$ -Wert als Mittelwert aus sechs Proben (Kontrollen = WT und EVB2; StAOC-RNAi = F1 und Z4; StOPR3-RNAi = A3 und Z2; StCOI1-RNAi = H1 und X5) sowie deren Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über eine einfaktorielles Varianzanalyse mit Dunnett's post-hoc Test; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Für die Microarray-Analysen, wie auch für die Verifizierung über qRT-PCR wurde bislang nur ein Zeitpunkt nach Pep-13-Behandlung betrachtet. Eine weitergehende Charakterisierung der Kandidatengene beinhaltete daher die Analyse des zeitlichen Verlaufs ihrer Pep-13-induzierten Expression.

Semiquantitative RT-PCR-Analysen in Abb. C-17 A zeigen, dass die Expression der sieben untersuchten Kandidaten bereits drei Stunden nach Pep-13-Infiltration, meist aber auch nach Infiltration des inaktiven Analogon W2A induziert ist. Zu diesem frühen Zeitpunkt handelt es sich somit vermutlich nicht um eine Pep-13-spezifische Antwort, sondern um einen allgemeinen Verwundungseffekt. Lediglich *StMYH19* scheint nicht Wund-responsiv zu reagieren, jedoch sind hier auch nur geringe Transkriptmengen detektiert worden. Zu späteren Zeitpunkten zeigen alle Kandidatengene einen Anstieg der Transkriptakkumulation, wobei dieser in den Pep-13-behandelten Proben stärker auftritt und auch bei 12 und 24 Stunden noch detektierbar ist. Für den Zeitpunkt 48 Stunden ist die Aussage schwieriger, da dort nur 1 Replikate vorliegt. Jedoch scheint zu diesem Zeitpunkt die Genexpression schwächer zu sein.

Die Expression des Kandidatengens *StMYST1* ist in Abb. C-17 B in einer Northern-Analyse gezeigt. Für diesen Kandidaten scheint eine Expression erst bei sechs bis neun Stunden nach Pep-13-Behandlung einzusetzen. Diese hält dann lang, bis 48 Stunden nach Infiltration an. Da bei 48 Stunden noch deutliche Signale detektierbar sind, und spätere Zeitpunkte nicht analysiert wurden, kann eine weiter andauernde Expression des *StMYST1* vermutet werden.

Für alle betrachteten Kandidatengene zeigt sich jedoch, dass keine Expression in unbehandelten Blättern vorliegt. Da jedoch bisher der Verlauf der Genexpression nur in einem Experiment mit zwei biologischen Replikaten angesehen wurde, muss dieses Experiment wiederholt werden.

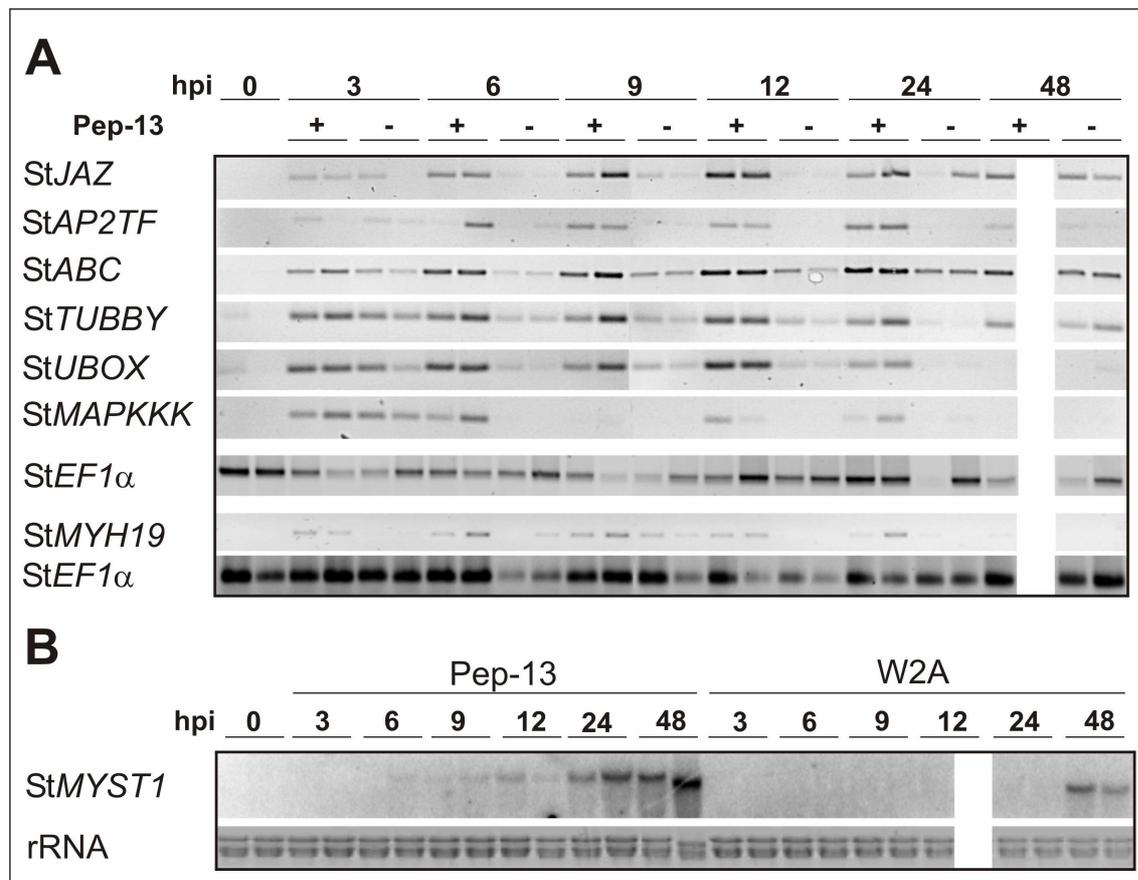


Abb. C-17: Zeitlicher Verlauf der Pep-13-induzierten Genexpression für ausgewählte Kandidatengene

Je drei Blätter von Wildtyp Kartoffelpflanzen ($n=2$) wurden vollständig mit Pep-13 (+) bzw. W2A (-) (100 μ M) infiltriert und zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet.

A) sqRT-PCR-Detektion von *StJAZ*, *StAP2TF*, *StABC*, *StTUBBY*, *StUBOX*, *StMAPKKK*, *StMYH19* und *StEF1 α*

Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus behandelten Blättern erfolgte die cDNA-Synthese aus 1 μ g RNA mit (dT)_n-Primern. Die Transkripte der Kandidaten wurden mit spezifischen Primern in einer PCR amplifiziert und im Agarosegel aufgetrennt. Pep-13 +, W2A -. Die *StMYH19*-Transkripte wurden aus einem anderen Ansatz cDNA als die Transkripte der übrigen Kandidatengene amplifiziert und ist daher mit separater *StEF1 α* -Kontrolle gezeigt.

B) Northern-Blot-Analyse von *StMYST1*

20 μ g Gesamt-RNA wurden im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit einem ³²P-markierten cDNA-Fragment. Als Ladekontrolle diente Ethidiumbromid-gefärbte RNA.

Eine weitere Fragestellung einer ersten Charakterisierung der Kandidatengene war die Untersuchung ihrer basalen Expression in verschiedenen Pflanzenorganen. Hierzu wurden Kartoffelpflanzen auf Perlit angezogen und in einem Stadium geerntet, das in etwa dem der Pflanzen entsprach, die drei Wochen auf Erde gewachsen waren. Die verschiedenen Organe wurden separat eingefroren, die darin enthaltene RNA isoliert und einer sqRT-PCR unterzogen. Da aus Literaturdaten bekannt ist, dass die Expression zahlreicher JA-abhängig regulierter Gene auch Wund-induzierbar ist und die im Gewächshaus geernteten Blüten Thrips-Befall zeigten, wurde parallel zur Organ-spezifischen Expression auch der zeitliche Verlauf der wundinduzierten Genexpression der Kandidaten in Kartoffelblättern mit Hilfe einer sqRT-PCR-Analyse betrachtet. In Abbildung C-18 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt.

Die Transkripte des *StJAZ*-Kandidatengens zeigen keine basale Expression in Blättern oder anderen Organen, akkumulieren aber ca. 30 min. nach Verwundung mit maximaler Expression nach ca. zwei Stunden. Die schwache Akkumulation der *StJAZ*-Transkripte in je einer von zwei Wurzel- bzw. Blütenproben könnte somit auf Verwundung beim Ernten der Wurzeln oder durch Thrips-Fraß an den Blüten zurückzuführen sein.

Für *StAP2TF* konnte keine Verwundungsinduzierte Expression beobachtet werden. Dieser putative Transkriptionsfaktor scheint aber konstitutiv in Blüten exprimiert zu sein. Sowohl *StABC* als auch *StUBOX* weisen starke Transkriptakkumulation nach Verletzung der Blätter auf, wobei *StABC* über einen deutlich längeren Zeitraum nach Verwundung exprimiert wird. Zusätzlich sind die Transkripte dieser Gene in Stängel, Blattstiel und Wurzel nachweisbar. *StABC* wird außerdem in Blüten und *StTUBBY* spezifisch in jungen, nicht ausgewachsenen Blättern konstitutiv exprimiert.

Auch *StMYSTI*-Transkripte scheinen nach Verwundung zu akkumulieren. Weiterhin konnte die Transkriptakkumulation dieses Kandidatengens in Wurzeln und möglicherweise auch in Blüten gezeigt werden. Wie auch bei *StABC* ist die Blüten-spezifische Genexpression unter dem Vorbehalt anzunehmen, dass sie auch von Verwundung durch Thrips-Fraß herrühren könnte.

StMYH19 ist weder konstitutiv, noch Wund-abhängig exprimiert (Daten nicht gezeigt). Das Kandidatengen mit Ähnlichkeit zu einer MAPKKK, *StMAPKKK*, weist keine basale Expression auf, ist aber nach Verwundung stark und transient exprimiert. Wie schon in der Pep-13-Kinetik beobachtet, zeigt bis auf *StTUBBY* keines der Kandidatengene eine deutliche basale Expression in Blättern.

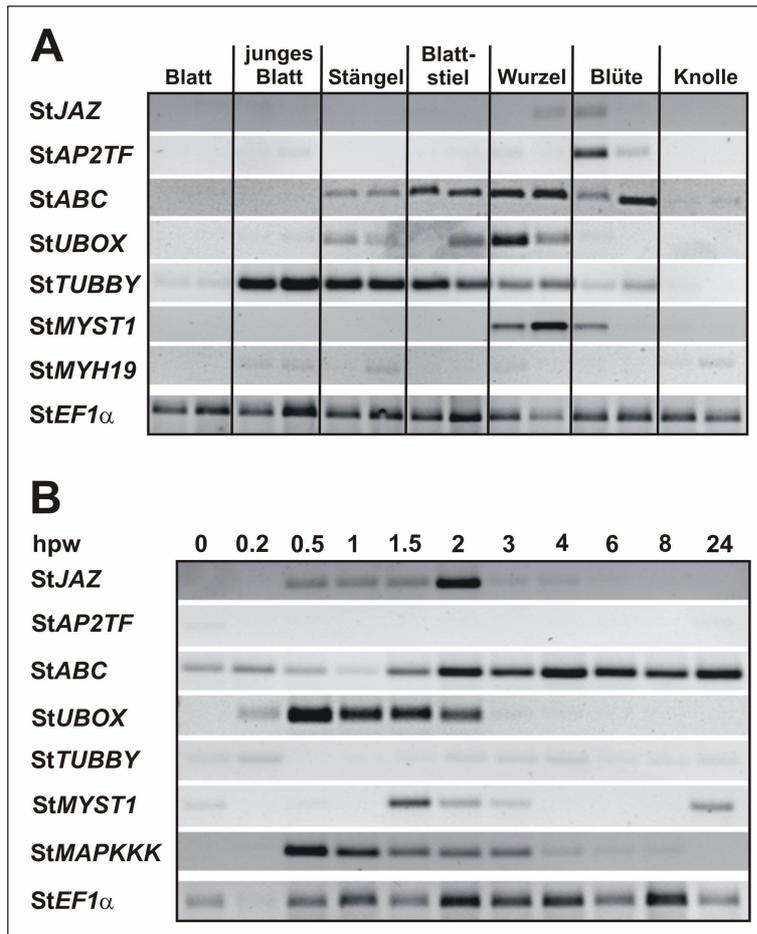


Abb. C-18: Basale bzw. Verwundungs-induzierte Expression der Kandidatengene

A: Expression in verschiedenen Organen der Kartoffel

Wildtyp-Pflanzen wurden auf Perlit angezogen und als adulte Pflanze geerntet. Ein μg Gesamt-RNA aus den verschiedenen Organen wurde einer cDNA-Synthese unterzogen. Gen-spezifische Primer dienten der semiquantitativen Bestimmung der Transkriptlevel der Kandidatengene in jeweils zwei biologischen Replikaten. *StEF1a* wurde als Kontrolle amplifiziert.

B: Wundinduzierte Genexpression der Kandidatengene im zeitlichen Verlauf

Ausgewachsene Wildtyp-Blätter wurden mit einer Pinzette verwundet und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung (hpw, Stunden nach Verwundung) geerntet. Die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA erfolgte mit 1 μg RNA. Die PCR erfolgte mit Gen-spezifischen Primern.

1.5.3 Das Kandidatengene *StJAZ*

Aus den Microarray-Analysen mit den Pep-13-behandelten, JA-defizienten bzw. JA-insensitiven RNAi-Pflanzen wurde *StJAZ* als differentiell exprimiert identifiziert. Annotiert wurde dieses Gen als JAZ-ähnlich mit einer starken Homologie zu *AtJAZ8*. Das differentielle Expressionsmuster der Microarray-Analysen konnte in qRT-PCR-Analysen bestätigt werden (s. Abb. C-17). *StJAZ* weist keine Expression in unbehandelten Pflanzen auf (s. Abb. C-18, A), ist aber, wie viele andere JA-regulierte Gene, nach Verwundung aktiviert (s. Abb. C-18 B). Für eine funktionelle Analyse dieses Kandidatengens wurde ein RNAi-Ansatz zur Herabsetzung der *StJAZ*-Transkriptakkumulation gewählt. Diese *StJAZ*-RNAi-Pflanzen konnten im Rahmen dieser Arbeit in einem ersten Experiment analysiert werden.

Zunächst wurde jedoch eine Southern-Analyse durchgeführt, um abschätzen zu können, ob *StJAZ* als Einzelgen oder, wie seine Arabidopsishomologen, als Mitglied einer Genfamilie vorliegt. In diesen Southern-Analysen zeigte sich nach Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen ein multiples Bandenmuster (s. Abb. C-19). Dieses kann als Hinweis auf das Vorliegen mehrerer *StJAZ*-Homologe, und somit einer Genfamilie, im Genom der Kartoffel gewertet werden.

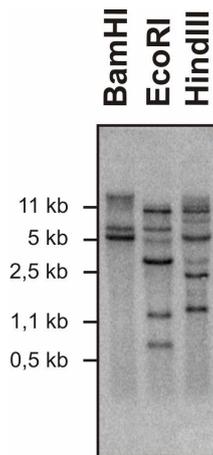


Abb. C-19: Southern-Analyse des StJAZ aus Kartoffel

Aus Wildtyp-Kartoffelblättern isolierte DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut. Die im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde auf eine Nylonmembran übertragen und anschließend mit einer ^{32}P -markierten Sonde für StJAZ hybridisiert. Am linken Bildrand sind die Größen von PstI-verdauter λ -DNA als Größenstandard markiert.

Ein 361 bp langes Fragment aus der in der POCI-Datenbank (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci>) veröffentlichten Sequenz des StJAZ wurde in pHELLSGATE8 kloniert und stabil in Kartoffelpflanzen transformiert. Die Transformanten wurden mittels Southern-Analyse auf den Einbau der T-DNA hin selektiert und in einem ersten Experiment auf ihren Phänotyp sowie StJAZ-Transkriptakkumulation nach Pep-13-Behandlung untersucht. In Abb. C-20 A sind die Blätter von vier der neun getesteten StJAZ-RNAi-Linien 24 Stunden nach Pep-13-Infiltration gezeigt. Diese wiesen acht Stunden nach Pep-13-Infiltration reduzierte StJAZ-Transkriptmengen auf und konnten somit als RNAi-positiv bestätigt werden. Keine der in diesem Experiment untersuchten Linien weist einen im Vergleich zum Wildtyp veränderten Phänotyp auf.

Da die JAZ-Proteine aus Arabidopsis und Tomate als putative transkriptionelle Regulatoren charakterisiert sind (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Browse, 2008), wurde in den StJAZ-RNAi-Pflanzen auch die Pep-13-responsive Genexpression analysiert. Dafür wurden die StJAZ-RNAi-Linien B3, G3, H1 sowie I1 verwendet (s. Abb. C-20 A). Pep-13-behandeltes Blattmaterial konnte für erste sqRT-PCR-Analysen der Expression der JA-Biosynthesegene genutzt werden. Dabei zeigte sich, dass die Expression von StLOX3, StAOC sowie StOPR3 in den StJAZ-Pflanzen unverändert stattfinden kann (s. Abb. C-20 A). Weiterhin wurde die Expression des JA-abhängig Pep-13-aktivierten Gens StPIN2 untersucht. Eine Northern Analyse der StPIN2-Expression in den StJAZ-RNAi-Pflanzen 24 Stunden nach Pep-13-Infiltration wies ebenso keine Veränderung zum Wildtyplevel auf, das in diesem Experiment jedoch stark schwankte (s. Abb. C-20 B).

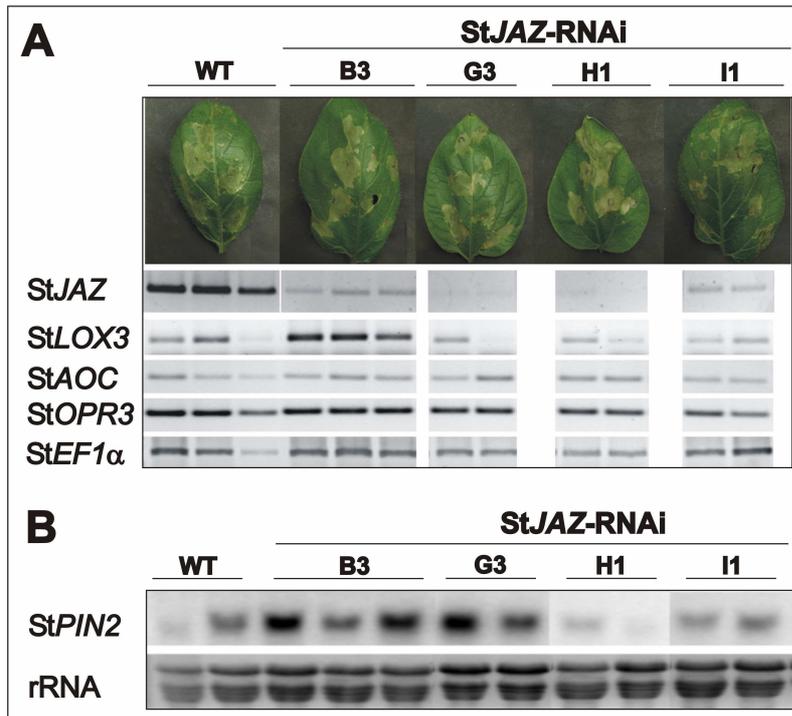


Abb. C-20: Pep-13-Antwort der StJAZ-RNAi-Pflanzen:

Ca. drei Wochen alte StJAZ-RNAi- und Wildtyp-Pflanzen wurden mit Pep-13 (100 µM) infiltriert und je ein Blatt nach acht Stunden bzw. nach 24 Stunden geerntet.

A) Nekrosen-Bildung 24 Stunden und Gen-expression acht Stunden nach Pep-13-Infiltration

Gezeigt sind die Ausprägung der Nekrosen 24 hpi (oberste Reihe) sowie die Expression von StJAZ, StLOX3, StAOC, StOPR3 und StEF1α acht Stunden nach Pep-13-Infiltration. Hierfür wurde eine sqRT-PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Für StJAZ wurde ein 3'-Primer außerhalb der RNAi-Region gewählt. Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

B) StPIN2-Expression in StJAZ-RNAi-Pflanzen

Die Detektion der StPIN2-Expression erfolgte für den Zeitpunkt 24 Stunden nach Pep-13-Infiltration mittels Northern-Analyse. 20 µg RNA wurden im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einem StPIN2-spezifischen ³²P-markierten cDNA-Fragment hybridisiert. Die Ethidiumbromid-gefärbte rRNA diente als Kontrolle für gleichmäßige Beladung des Gels.

Da eine verwundungsinduzierte Expression des StJAZ nachgewiesen werden konnte (s. Abb. C-18 B), wurde untersucht, ob die reduzierte StJAZ-Transkriptmenge in den RNAi-Pflanzen einen Einfluss auf die Wundantwort hat.

Auch hierfür wurde die Genexpression der wundinduzierten JA-Biosynthesegene StLOX3 und StAOC sowie des Markergens StPIN2 mit Hilfe von Northern-Analysen untersucht (s. Abb. C-21). Alle vier betrachteten StJAZ-RNAi-Linien verhielten sich in diesem Experiment wie die Wildtyp-Kontrollen.

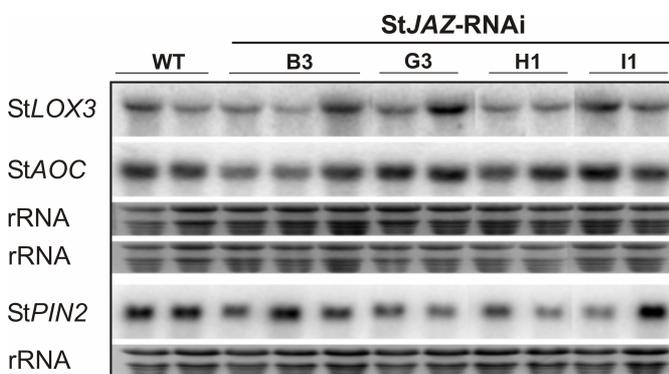


Abb. C-21: Wundantwort in StJAZ-RNAi-Pflanzen

Blätter ausgewachsener Pflanzen wurden mit einer Pinzette rechts und links der Mittelrippe mehrmals gequetscht. Zwei Stunden (StLOX3 und StAOC) bzw. 24 Stunden (StPIN2) nach Verwundung wurden die Blätter geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. 15 µg RNA wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und die Transkripte mittels radioaktiv-markierten cDNA-Fragmenten nachgewiesen. Ethidiumbromid-gefärbte RNA diente als Kontrolle für gleichmäßige Beladung des Gels.

2. 13-Lipoxygenase-abgeleitete Oxylipine in der Pathogenantwort von *Solanum tuberosum* L.

2.1. Rolle der 13-LOX-Oxylipine in der kompatiblen Interaktion zwischen Kartoffel und *P. infestans*

Infiltration des PAMP Pep-13 in Kartoffelblätter führt zu einer Signalkaskade, an deren Ende eine Reihe induzierter Abwehrantworten stehen, wie die HR und Veränderungen im Genexpressionsmuster (Brunner *et al.*, 2002; Halim *et al.*, 2004). Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit konnten Daten von V. Halim (Halim, 2006; Halim *et al.*, 2009) bestätigt und erweitert werden, wonach JA in der Pep-13-induzierten Signalkaskade in Kartoffel unterhalb von SA liegt. Die JA-defizienten bzw. –insensitiven RNAi-Pflanzen weisen im Vergleich zu Kontrollpflanzen reduzierte Nekrosenbildung sowie eine veränderte Genexpression auf.

Für den bakteriellen PAMP flg22 konnte 2004 der Nachweis erbracht werden, dass das Fehlen der flg22-induzierten Abwehrantworten in Arabidopsis zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber *P. syringae* führt und die Vorbehandlung von Arabidopsis-Pflanzen mit flg22 eine Resistenz-induzierende Wirkung hat (Zipfel *et al.*, 2004). Ein ähnlicher Effekt wurde auch für andere PAMPs, wie CBEL (Mateos *et al.*, 1997) und Pep-13 (Halim, 2006), sowie für den generellen Elicitor INF1 (Kawamura *et al.*, 2009) gezeigt.

Daher sollte als ein weiterer Aspekt dieser Arbeit die Interaktion der StAOC-, StOPR3- und StCOII-RNAi-Pflanzen mit dem Oomyceten *P. infestans* untersucht werden, der wie zahlreiche andere Mitglieder der Gattung *Phytophthora* die Pep-13-tragende Transglutaminase besitzt. Zunächst wurde die kompatible Interaktion im suszeptiblen Hintergrund betrachtet, da die RNAi-Konstrukte in die Kartoffelsorte Désirée transformiert worden waren, die kein bekanntes R-Gen trägt (r1-Hintergrund).

Eine Übersicht über die Infektionsexperimente mit *P. infestans* gibt Abbildung C-22. Das Wachstum von *P. infestans* auf Kartoffelblättern wurde in mehreren unabhängigen Experimenten mit verschiedenen RNAi-Linien makroskopisch (Bildung der Läsionen, s. Abb. C-22 A und B) und quantitativ, über eine Real-Time PCR-basierte Methode (Eschen-Lippold *et al.*, 2007); s. Abb. C-22 C), untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Wachstum von *P. infestans* auf den Kontrollpflanzen im Vergleich zu den JA-defizienten bzw. den JA-insensitiven RNAi-Pflanzen.

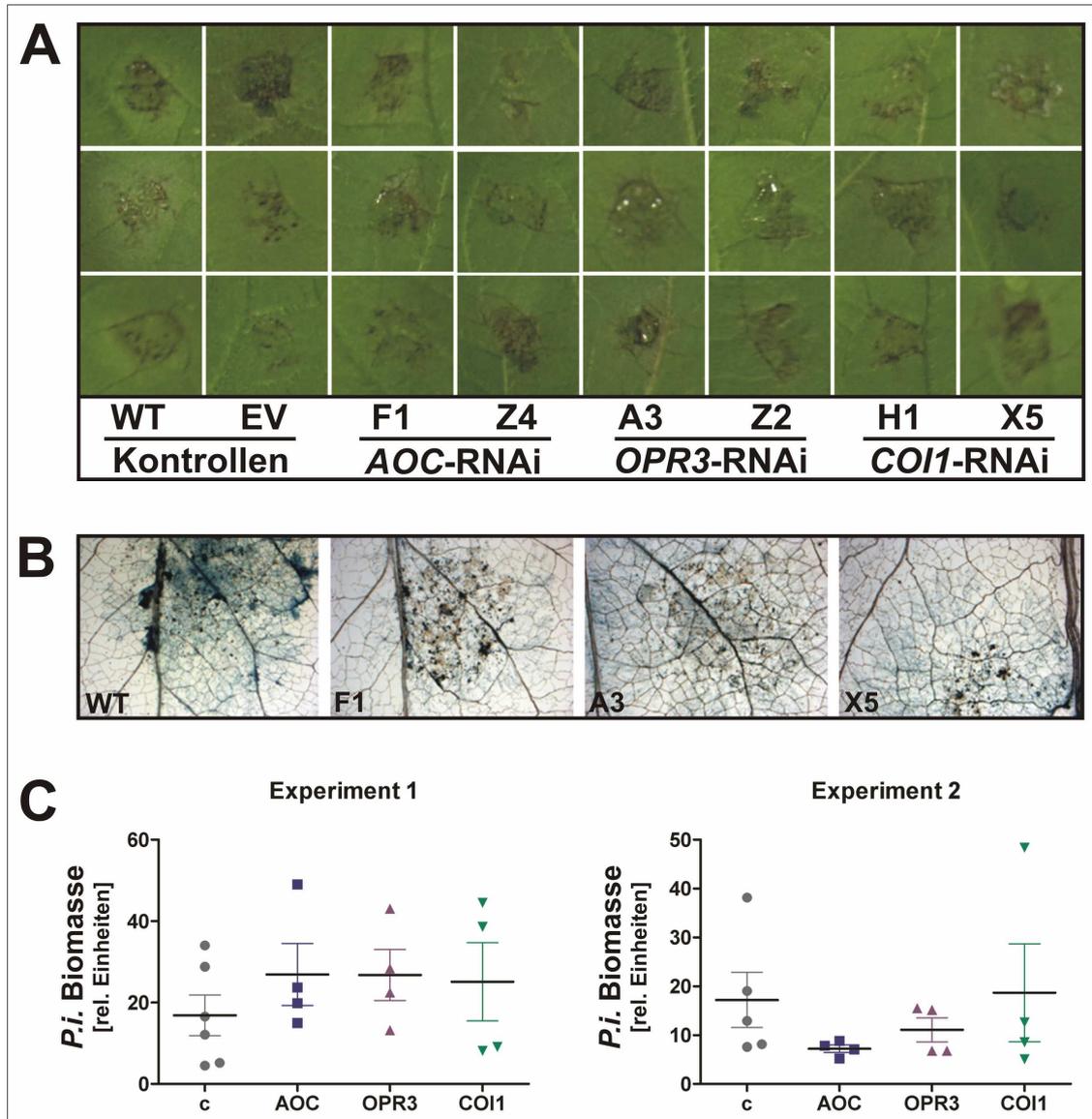


Abb. C-22: *P. infestans* Infektion von transgenen RNAi-Kartoffelpflanzen (StAOC-, StOPR3- und StCOI1-RNAi-Konstrukte im r1-Hintergrund)

A) Läsionen von infizierten Kartoffelblättern ($1,5 \times 10^5$ Sporen/ml, $10 \mu\text{l}$ /Inokulation, 3dpi). Die Fotos zeigen je eine Inokulationsstelle auf der Blattunterseite von drei verschiedenen Kontrollpflanzen (WT und EV), StAOC-RNAi- (F1 und Z4), StOPR3-RNAi- (A3 und Z2) bzw. StCOI1-RNAi-Pflanzen (H1 und X5).

B) Trypan-Blau-Färbung von *P. infestans*-infizierten Kartoffelblättern. Die Pflanzen wurden in Sterilkultur angezogen und mit einer Sporensuspension von 1×10^5 Sporen/ml infiziert. Zwei Tage nach Inokulation erfolgte die Ernte der Blätter und anschließende Trypan-Blau-Färbung. Kontrolle WT, StAOC-RNAi F1, StOPR3-RNAi A3, StCOI1-RNAi X5.

C) Quantifizierung des Wachstums von *P. infestans* in den RNAi-Pflanzen. Je zwei ausgewachsene Blätter von Kartoffelpflanzen wurden auf der Blattunterseite mit *P. infestans* infiziert ($10 \mu\text{l} \times 1 \times 10^5$ Sporen/ml). Infiziertes Blattgewebe aus der Infektionsstelle wurde nach drei Tagen mit einem Korkbohrer geerntet und die DNA isoliert. Die Quantifizierung der *P. infestans*-Biomasse erfolgte mittels qPCR (Eschen-Lippold *et al.*, 2007). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler in relativen Einheiten. C: Kontrollpflanzen (WT, EVB2 und EVE4), AOC: StAOC-RNAi-Pflanzen (F1 und Z4), OPR3: StOPR3-RNAi-Pflanzen (A3 und Z2), COI1: StCOI1-RNAi-Pflanzen (H1 und X5); Gezeigt sind zwei unabhängige Experimente ($n=4$, bzw. 6 für die Kontrollen). Dieses Experiment wurde in 5 Experimenten wiederholt, in denen sich ähnliche Ergebnisse zeigten. Die statistische Auswertung erfolgte über eine parameterfreie, einfaktorische Varianzanalyse und Dunn's *post hoc* Test.

Um die Reaktion der RNAi-Pflanzen auf *P. infestans* weiter zu analysieren, wurden zusätzlich Kartoffelknollen der jeweiligen RNAi-Linien in *P. infestans*-Wachstumsassays untersucht, wobei die Quantifizierung wie in Blättern über qPCR erfolgte. Die *StCOII*-RNAi-Linien wiesen eine starke Streuung auf, wobei die Linie X5 ein erhöhtes Wachstum zuließ. Da eine weitere *StCOII*-RNAi-Linie (H1) jedoch kein signifikant erhöhtes Wachstum zeigte, wird davon ausgegangen, dass die Expression des *StCOII*-Konstruktes keinen Einfluss auf das Wachstum des Oomyceten in Knollen hat. Ebenso konnte auf Knollen der *StAOC*- und der *StOPR3*-RNAi-Pflanzen kein verändertes *P. infestans*-Wachstum detektiert werden (s. Abb. C-23).

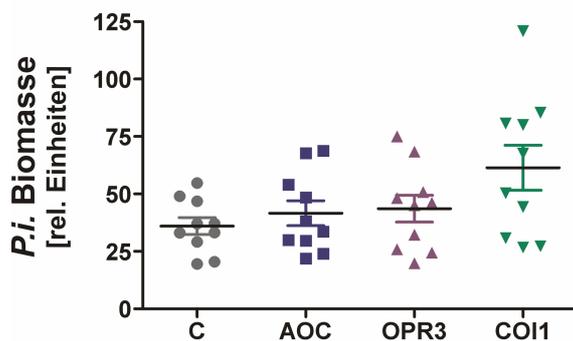


Abb. C-23: *P. infestans*-Wachstum auf Knollen transgener RNAi-Pflanzen

Knollenscheiben von *StAOC*-, *StOPR3*- und *StCOI1*-RNAi-Pflanzen wurden mit einer *P. infestans*-Sporensuspension (1×10^5 Sporen/ml) infiziert. Fünf Tage nach der Inokulation wurden die Knollenscheiben eingefroren und lyophilisiert. Die daraus isolierte DNA wurde in qPCR-Analysen zur Quantifizierung der *P. infestans* Biomasse genutzt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler von 10 biologischen Replikaten aus fünf unabhängigen Experimenten. Ein Replikat entspricht dabei vier bis fünf Knollenscheiben je einer Knolle. In den Experimenten wurden pro Konstrukt zwei RNAi-Linien verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer parameterfreien einfaktoriellen Varianzanalyse und Dunn's *post hoc* Test.

Trotz des unveränderten Wachstums von *P. infestans* war nicht vollständig auszuschließen, dass das Fehlen der JA-Biosynthese oder JA-Perzeption in den RNAi-Pflanzen einen Effekt auf die Pathogen-induzierte Genexpression haben könnte, da dies auch für die PAMP-induzierte Genexpression gezeigt wurde. Um einen solchen Effekt aufzudecken, wurden Northern-Analysen durchgeführt, in denen die Transkriptakkumulation verschiedener Markergene der Abwehr näher untersucht wurde. Abb. C-24 zeigt die Ergebnisse dieser Northern-Analysen für je zwei Kontroll-, *StAOC*-, *StOPR3*- sowie *StCOI1*-RNAi-Linien drei Tage nach Infektion. Die 9-Lipoxygenase *StLOX1*, ebenso wie die 13-Lipoxygenase *StLOX3* weisen drei Tage nach der *P. infestans*-Infektion eine deutliche Transkriptakkumulation auf, die aber in allen RNAi-Linien im Vergleich zu den Kontrollen unverändert sind. Auch die Abwehrgene *StPRI* und *StPRI0* sowie die *P. infestans*-aktivierte Kupferaminoxidase *StCAO* zeigen unter diesen Bedingungen in allen Linien eine vergleichbare Transkriptakkumulation. Lediglich für das PR-Gen *StPR5* ist möglicherweise eine leicht reduzierte Transkriptakkumulation in den RNAi-Linien im Vergleich zu den Kontrollen feststellbar, so dass hierfür ein partieller Einfluss des JA-Weges auf die Genexpression vermutet werden kann.

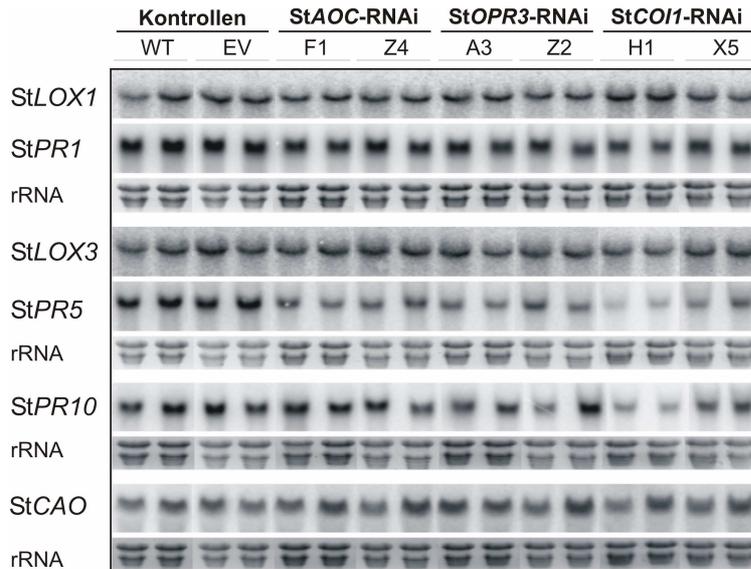


Abb. C-24:
Genexpression in transgenen RNAi-Pflanzen nach Inokulation mit *P. infestans*

RNA wurde aus *P. infestans*-infizierten (1×10^5 Sporen/ml) Blättern (3dpi) isoliert und 20 μ g in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung mit 32 P-markierten cDNA-Fragmenten, spezifisch für die einzelnen Gene. Als Ladekontrolle ist die Ethidiumbromid-gefärbte rRNA gezeigt. Für die Proben wurden je 12 Blattscheiben aus der Infektionsstelle von zwei verschiedenen Pflanzen gepoolt. In einem weiteren Experiment zeigte sich ein ähnliches Ergebnis.

2.2 Rolle der 13-LOX-Oxylipine in der chemisch-induzierten Resistenz gegen *P. infestans*

Die nicht-proteinogene Aminosäure β -Aminobuttersäure (BABA) ist in der Lage, in einer großen Anzahl von Pflanzenspezies Resistenz gegen sehr verschiedene Stressstimuli wie Pathogene (Jakab *et al.*, 2001; Cohen, 2002) sowie Hitze- und Salzstress (Jakab *et al.*, 2005; Zimmerli *et al.*, 2008) zu induzieren. Der genaue Mechanismus dieser xenobiotischen Substanz ist vielfach noch nicht genau geklärt.

Der Einfluss des JA-Signalweges auf diese chemisch-induzierbare Resistenzantwort der Pflanzen sollte mit Hilfe der StAOC, StOPR3- und StCOI1-RNAi-Pflanzen untersucht werden. Hierfür wurden zunächst Wildtyp-Kartoffelpflanzen mit 100 ml 1 mM BABA gegossen und über zwei (1. Experiment) bzw. vier Tage (2. Experiment) zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen. Anschließend wurde der Gehalt an SA und SAG, OPDA und JA, sowie die Akkumulation von Abwehrgen-Transkripten in diesen Proben analysiert. Die Behandlung der Pflanzen mit BABA führt weder zu erhöhter Akkumulation der Signalsubstanzen SA und SAG bzw. OPDA und JA noch zu einer Expression der Abwehrgene StPR1, StPR5, StLOX1 oder StLOX3 (Daten nicht gezeigt).

Die durch BABA induzierte Resistenz wurde in den Kontroll- und RNAi-Linien durch Messung des *P. infestans*-Wachstums analysiert. Dabei zeigte sich, dass weder die reduzierte JA-Biosynthese in StAOC- und StOPR3-RNAi-Pflanzen, noch die verminderte JA-Perzeption in den StCOI1-RNAi-Pflanzen zu einem Verlust der BABA-induzierten Resistenz führt (s. Abb. C-25). In allen untersuchten Linien ist drei Tage nach Infektion in den BABA-vorbehandelten Proben eine deutlich geringere Entwicklung der

P. infestans-Biomasse im Vergleich zu den jeweiligen Wasser-behandelten Kontrollproben erkennbar ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test). Wie schon in Abb. C-22 gezeigt, war auch in diesen Experimenten kein statistisch signifikanter Unterschied im Wachstum von *P. infestans* zwischen den Kontrollpflanzen und den RNAi-Linien messbar (innerhalb der Gruppe der Wasser- bzw. BABA-vorbehandelten Pflanzen).

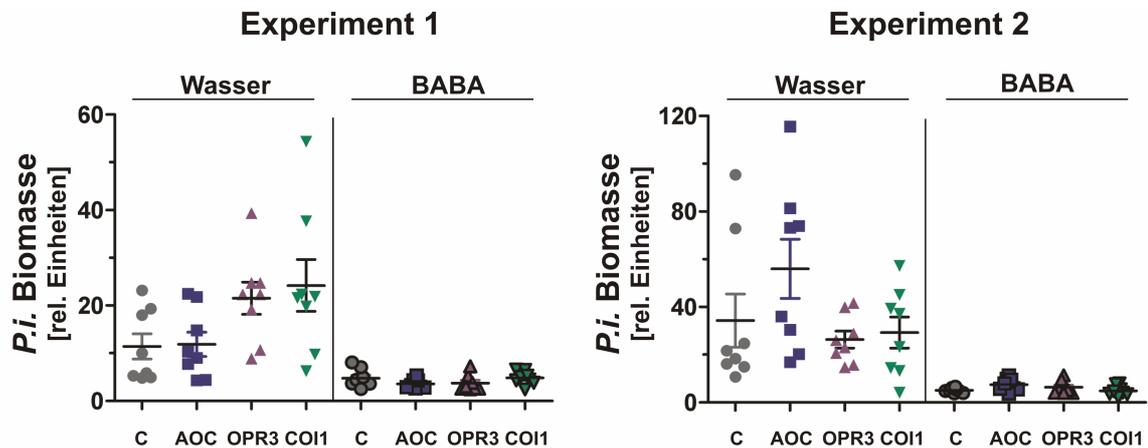


Abb. C-25: BABA-induzierte chemische Resistenz - Wachstum von *P. infestans* in transgenen RNAi-Linien

Kartoffelpflanzen wurden mit 100 ml Wasser (-) bzw. 1 mM BABA (+) gegossen. Einen Tag nach der Vorbehandlung erfolgte die Inokulation mit je 10 μ l einer *P. infestans*-Sporensuspension auf der Blattunterseite (Experiment 1: 1×10^5 Sporen/ml, 8 Inokulationsstellen/Blatt; Experiment 2: 2×10^5 Sporen/ml, 16 Inokulationsstellen/Blatt). Drei Tage nach Infektion wurde infiziertes Blattgewebe mit einem Korkbohrer geerntet, wobei zwei Blätter einer Pflanze zu einem Pool vereinigt wurden. Die Quantifizierung der *P. infestans* Biomasse erfolgte mittels qPCR. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler für zwei unabhängige Experimente ($n=8$). AOC=StAOC-RNAi (Linien F1 und Z4); OPR3=StOPR3-RNAi (Linien A3 und Z2); COI1=StCOI1-RNAi (Linien H1 und X5).

Auch für die BABA-induzierte Resistenz wurde die Expression von Abwehrgenen nach *P. infestans*-Infektion in den RNAi-Pflanzen mit der Genexpression in den Kontrollpflanzen verglichen. Das verminderte Wachstum von *P. infestans* (s. Abb. C-25) führt in den BABA-behandelten Pflanzen zu einer verminderten Transkriptakkumulation der Abwehrgene *StPR1*, *StPR5*, *StLOX1*, *StLOX3* sowie *StCAO* (s. Abb. C-26). Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch das verminderte Mycelwachstum im Blattgewebe weniger Zellen mit dem Oomyceten in Kontakt kommen und eine Abwehr auslösen. Umgekehrt wächst *P. infestans* in den Wasser-behandelten Kontrollen stärker, so dass mehr Zellen mit einer Aktivierung der Transkriptakkumulation reagieren. Auch hier zeigten die RNAi-Pflanzen insgesamt die gleiche Reaktion wie die Kontrollpflanzen.

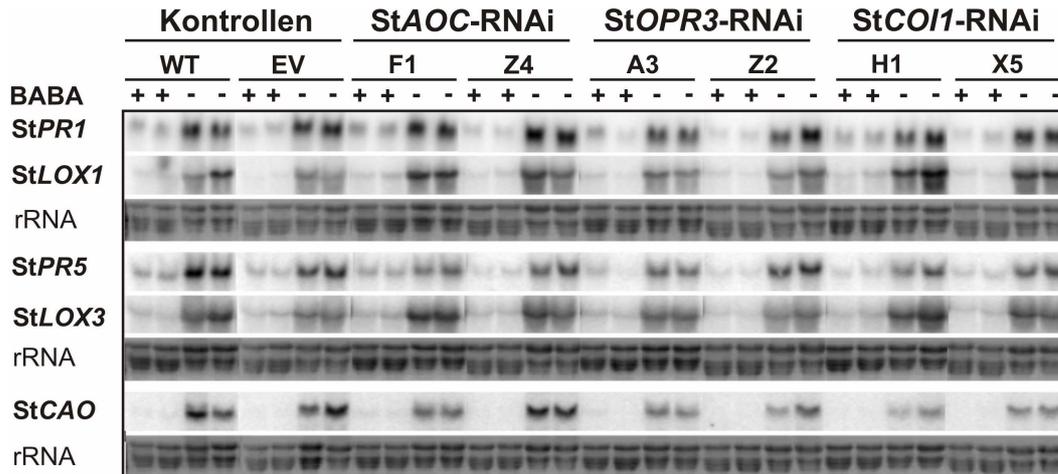


Abb. C-26: Genexpression in transgenen RNAi-Pflanzen in der BABA-induzierten Resistenz

Ausgewachsene Kartoffelpflanzen wurden einen Tag nach Vorbehandlung mit Wasser (-) bzw. 1 mM BABA (+) mit $10 \mu\text{l}$ einer *P. infestans*-Sporensuspension (2×10^5 Sporen/ml) infiziert (16 Inokulationspunkte). Nach drei Tagen wurden die Inokulationsstellen mit einem Korkbohrer ausgestochen, wobei die Blattscheiben von jeweils zwei Pflanzen für eine Probe vereinigt wurden. Aus dem Blattmaterial wurde die Gesamt-RNA isoliert, je $20 \mu\text{g}$ in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Hybridisiert wurde mit radioaktiv-markierten cDNA-Fragmenten. Als Ladekontrolle diente die Ethidiumbromid-gefärbte rRNA. Ein zweites Experiment lieferte ähnliche Ergebnisse.

2.3 Die inkompatible Interaktion zwischen *P. infestans* und den R1-Gen-tragenden Kartoffeln – Rolle der 13-Oxylipine

Nachdem in Abschnitt 2.1 gezeigt werden konnte, dass die Oxylipine des 13-LOX-Weges in der kompatiblen Interaktion zwischen der suszeptiblen Kartoffelsorte Désirée und *P. infestans* keine Rolle für den Verlauf der Infektion zu spielen scheinen, sollte nun untersucht werden, ob den 13-Oxylipinen in einer inkompatiblen Interaktion eine Funktion zukommt.

2.3.1 Generierung der JA-defizienten und JA-insensitiven RNAi-Pflanzen im R1-Hintergrund

Für die Untersuchung der Rolle der 13-Oxylipine in der inkompatiblen Interaktion von Kartoffel und *P. infestans* wurden die RNAi-Konstrukte für StAOC, StOPR3 sowie StCOI1 (s. Anhang A-III) in R1-Gen-tragende Kartoffeln der Sorte Désirée transferiert (zur Verfügung gestellt von C. Gebhardt, MPI Köln, (Ballvora *et al.*, 2002)). Zur Kontrolle erfolgte die Transformation der Konstrukte auch in die isogene Désirée-Pflanze

(r1) sowie die Vektorkontrolle LV41 (r1 Hintergrund, transformiert mit einem Vektor ohne Insert) (beide ebenfalls vom MPI in Köln).

In Abb. C-27 sind die Ergebnisse der Charakterisierung der RNAi-Pflanzen zusammengefasst. Pflanzen, die laut Southern-Analyse für den Einbau des jeweiligen RNAi-Konstruktes positiv waren (Daten nicht gezeigt), wurden auf die Transkriptakkumulation des jeweiligen Gens nach Verwundung (*StAOC* und *StOPR3*) bzw. in unbehandelten Blättern (*StCOI1*) geprüft. Pflanzen mit verminderter Transkriptakkumulation konnten als RNAi-positiv eingestuft werden. Für diese Pflanzen wurde auch die Akkumulation der *StPIN2*-Transkripte (Marker für den JA-Signalweg) untersucht (Abb. C-27 A, C und E). Anschließend wurde für die RNAi-Pflanzen, der Gehalt an Jasmonaten nach Pep-13-Infiltration analysiert (Abb. C-27 B, D und F). Die *StAOC*- und *StOPR3*-RNAi-Pflanzen wiesen eine gute Korrelation zwischen der Reduktion der *StAOC*- und *StOPR3*-Transkriptmengen und dem jeweiligen Level an Jasmonaten auf. Für die *StCOI1*-RNAi-Linien scheint die Menge an OPDA und JA-Ile nicht reduziert zu sein. Der Gehalt an JA ist für die Linien S7B1, S9C7 und S9Y1 in diesem Experiment signifikant reduziert (t-Test, $p < 0,05$). Die Linie S7Q1 konnte in diesen Analysen als nicht RNAi-positiv aussortiert werden.

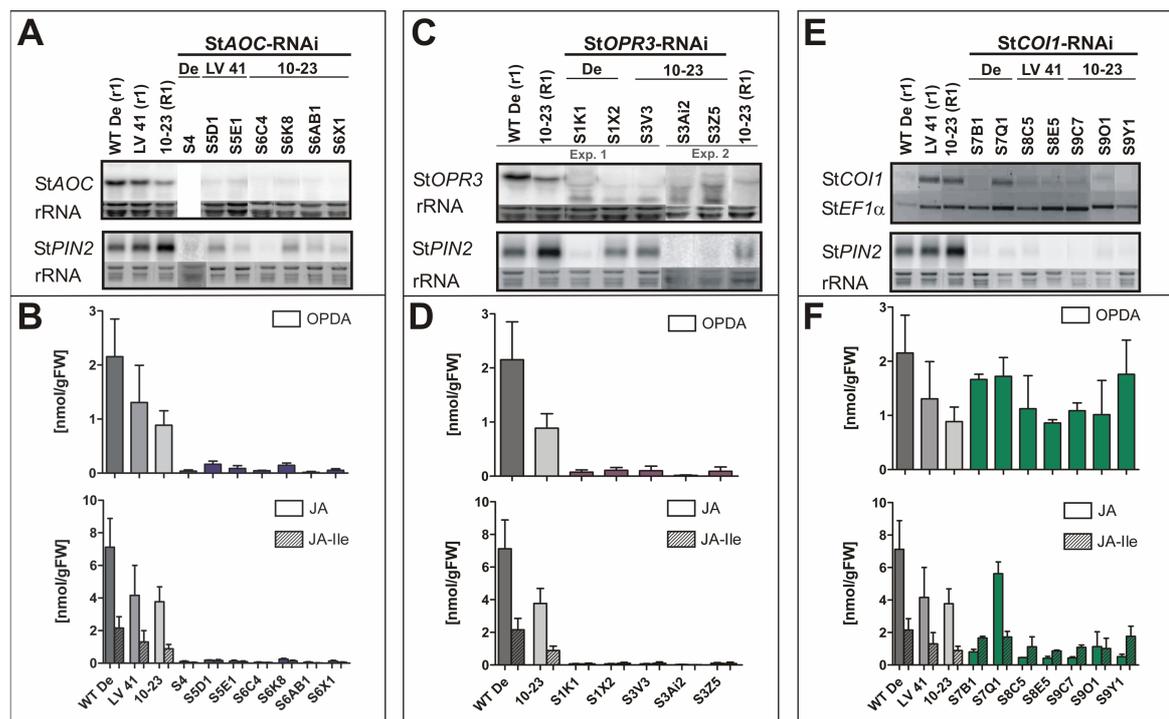


Abb. C-27: Beschreibung der *StAOC*-, *StOPR3*- und *StCOI1*-RNAi-Pflanzen im R1-Hintergrund

A, C, E) Genexpression in den RNAi-Pflanzen nach Verwundung

Blätter der RNAi-Pflanzen wurden mit einer Pinzette mehrmals rechts und links der Mittelrippe gequetscht. Es wurden zu 1,5 Stunden (für die *StAOC*- bzw. *StOPR3*-Sonde) und 24 Stunden (für die *PIN2*-Sonde) Proben geerntet. Je 15 μ g RNA wurden im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran gebロットet und mit 32 P-markierten cDNA-Fragmenten spezifisch für die *StAOC*, *StOPR3* bzw. *StPIN2* hybridisiert. Die Ethidiumbromid-gefärbte rRNA ist als Ladekontrolle gezeigt.

Für die Quantifizierung der *StCO11*-Transkriptmengen in den *StCO11*-RNAi-Linien (E) wurde 1 µg RNA unbehandelter Blätter in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die PCR mit spezifischen Primern für *StCO11* und *StEF1α*.

Die Bezeichnungen De (Désirée, r1), LV41 (Vektorkontrolle, r1) und 10-23 (R1 in Désirée) über den RNAi-Linien markieren den Hintergrund, in den das jeweilige Konstrukt eingebracht wurde.

B, D, F Akkumulation von OPDA, JA und JA-Ile in den RNAi-Pflanzen nach Pep-13-Behandlung
Blätter von je drei Pflanzen pro RNAi-Linie wurden mit 100 µM Pep-13 infiltriert und nach 24 Stunden geerntet. Der Gehalt an OPDA, JA und JA-Ile wurde mittels GC-MS-Messungen bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler (n=3).

2.3.2 Einfluss der JA-Defizienz und JA-Insensitivität auf das *P. infestans* Wachstum

Die Infektion der resistenten R1-Pflanzen (Linie 10-23) mit *P. infestans* führt zur Ausbildung einer HR, die lokal begrenzt d.h. nur im Bereich des infizierten Blattgewebes abläuft. Im Unterschied dazu zeigen sich in suszeptiblen r1-Pflanzen deutliche braune Läsionen, die nach einigen Tagen auch über die Infektionsstelle hinaus sichtbar werden und sich durch unregelmäßige Abgrenzung zum nicht-infizierten Gewebe auszeichnen.

Diese rein äußerliche Unterscheidung zwischen kompatibler und inkompatibler Interaktion ist auch für die RNAi-Konstrukt-tragenden Pflanzen möglich. Die Expression der RNAi-Konstrukte im R1-Hintergrund der Linie 10-23 führt nach Infektion mit *P. infestans* auch weiterhin zur Bildung einer HR. Daraus kann geschlußfolgert werden, dass das Fehlen eines funktionalen JA-Signalweges in den *StAOC*-, *StOPR3*- bzw. *StCO11*-RNAi-Pflanzen nicht zu einem Verlust der R1-Gen-vermittelten Resistenz gegen *P. infestans* führt (s. Abb. C-28 A).

Zusätzlich zu der phänotypischen Bewertung der Läsionen bzw. der HR, wurde die Biomasse von *P. infestans* im infizierten Blattgewebe mittels qPCR bestimmt. Für die *StAOC*-RNAi-Pflanzen liegen zwei, für die *StOPR3*-RNAi-Pflanzen ein und für die *StCO11*-RNAi-Pflanzen drei Datensätze zum Zeitpunkt 3 dpi vor. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (r1 bzw. R1) die RNAi-Pflanzen kein verändertes Wachstum von *P. infestans* zulassen (s. Abb. C-28 B).

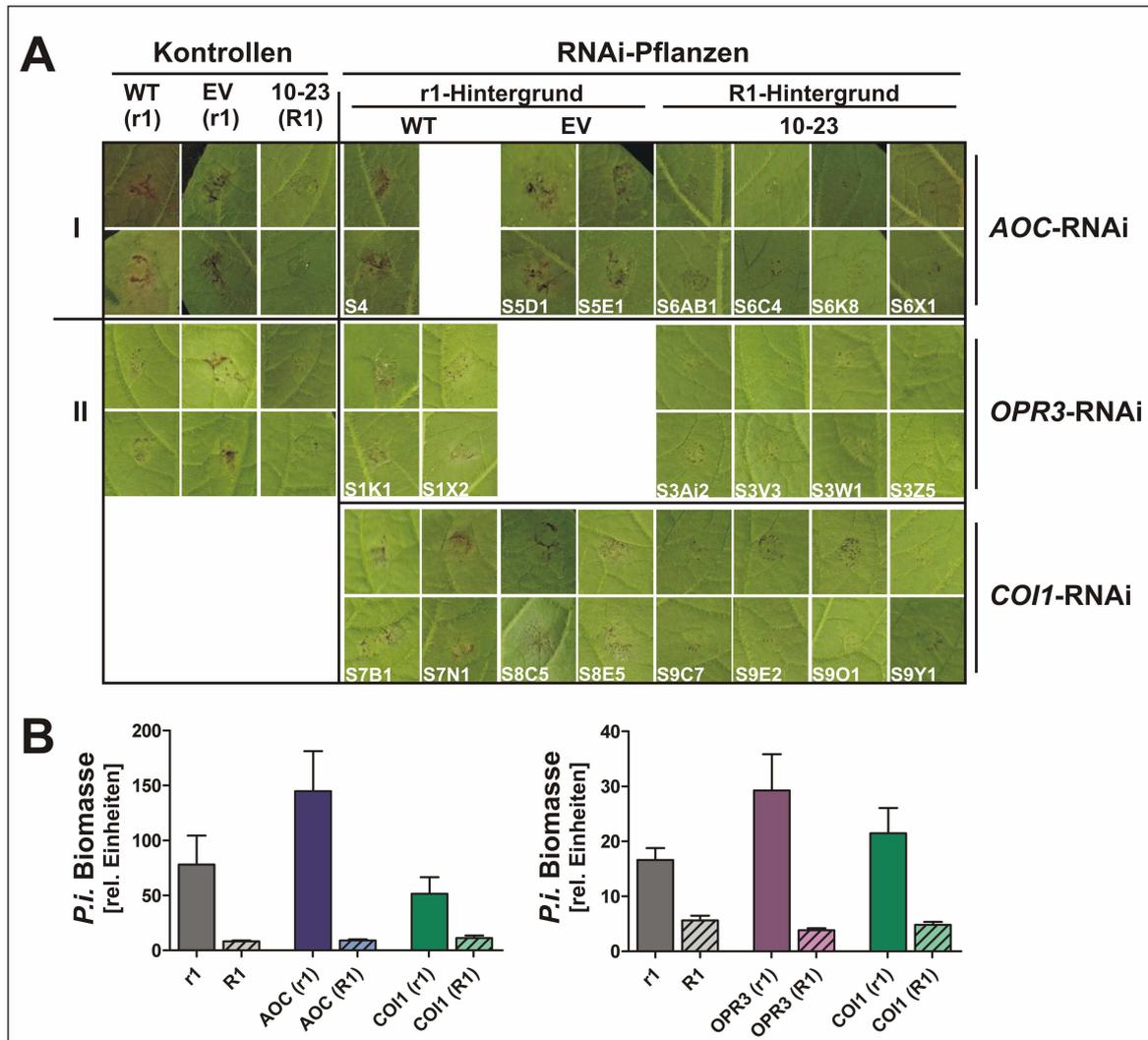


Abb. C-28: Inkompatible Interaktion zwischen *P. infestans* und den transgenen RNAi-Pflanzen (R1-Hintergrund)

Kartoffelblätter der RNAi-Pflanzen und Kontrollen wurden an mehreren Stellen mit *P. infestans* Sporen infiziert ($\approx 10 \mu\text{l}$, 1×10^5 Sporen/ml) und die Blätter nach drei Tagen geerntet.

A) Ausbildung der Läsionen bzw. HR. Je zwei Inokulationspunkte pro Linie (von verschiedenen Pflanzen) sind gezeigt.

B) Bestimmung der *P. infestans*-Biomasse

Je 10 (linkes Diagramm) bzw. 12 (rechtes Diagramm) Blattscheiben pro Blatt wurden geerntet und je zwei Blätter gepoolt. Aus dem Material wurde DNA isoliert und über qPCR quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte ($n=8$) und Standardfehler für die einzelnen Konstrukte.

2.4 13-Oxylipine in der Interaktion mit dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea*

Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Antwort der Kartoffelpflanze auf den hemibiotrophen Oomyceten *P. infestans* nicht vom Vorhandensein eines funktionellen JA-Biosynthese- bzw. Signal-Wegs abhängig zu sein scheint. Bei der *Brassicaceae Arabidopsis thaliana* ist für die Abwehr des Oomyceten *Pythium irregulare* (Adie *et al.*, 2007) sowie der nekrotrophen Pilze *A. brassicicola* und *B. cinerea* (Thomma

et al., 1998) eine Abhängigkeit von einem intakten JA-Signalweg nachgewiesen worden. Zudem führt in *Arabidopsis* eine Infektion mit *B. cinerea* zu starker JA-Akkumulation (Yang *et al.*, 2007) innerhalb von 24 Stunden nach der Infektion.

Aufgrund dieser Daten sollte untersucht werden, wie die JA-defizienten bzw. JA-insensitiven RNAi-Kartoffelpflanzen auf nekrotrophe Pathogene reagieren.

Zunächst wurde die *B. cinerea*-Infektion von Wildtyp-Pflanzen beobachtet und bestimmt, ob sich eine Akkumulation der Signalsubstanzen SA bzw. JA zeigt. Dafür wurden Pflanzen über einen Zeitraum von drei Tagen nach Infektion geerntet und analysiert. In Abb. C-29 A wird deutlich, dass die Infektion nach ca. zwei Tagen soweit voran geschritten ist, dass sichtbare Symptome in Form von braunen, wässrigen Läsionen auf den Blättern ausgebildet sind. Etwa zeitgleich konnte ein Anstieg der Octadecanoide OPDA, JA und JA-Ile in den infizierten Blättern gemessen werden (s. Abb. C-29 B). Die SA- und SAG-Level zeigen im Verlauf der Infektion keine Veränderung (s. Abb. C-29 C).

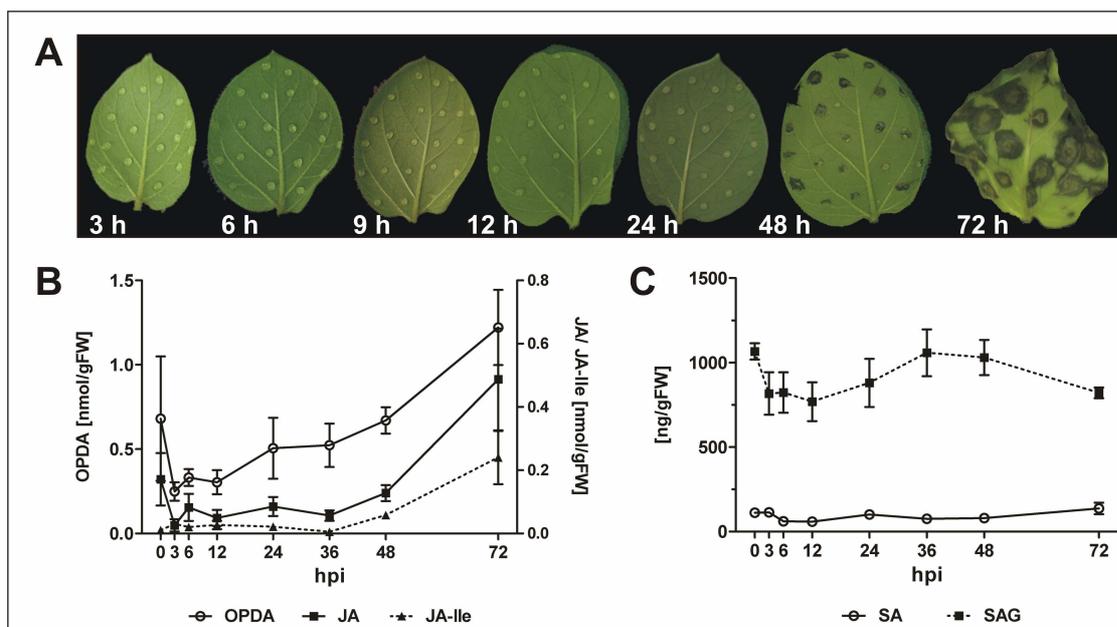


Abb. C-29: Zeitlicher Verlauf einer Infektion von Wildtyp-Kartoffelpflanzen mit *B. cinerea*

Wildtyp-Kartoffelpflanzen wurden mit einer Sporensuspension von *B. cinerea* ($1,6 \times 10^4$ Sporen/ml) auf der Blattunterseite infiziert. Je drei Pflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet.

A) Symptome der Kartoffelblätter nach *B. cinerea*-Infektion.

B) OPDA-, JA- und JA-Ile-Gehalt in *B. cinerea*-infizierten Kartoffelpflanzen

Nach der Ernte wurden die Blätter in flüssigem Stickstoff eingefroren, und nach Extraktion der Gehalt der Oxylypine mittels GC-MS ermittelt. Es sind die Mittelwerte und Standardfehler gezeigt (n=3). Das Experiment einmal wiederholt, wobei ähnliche Ergebnisse erhalten wurden.

C) Akkumulation von SA und SAG nach *B. cinerea*-Infektion

Die Menge an SA und SAG wurde mit Hilfe einer HPLC-basierten Methode in Triplikaten bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler. Ein zweites Experiment ergab gleiche Ergebnisse.

Im nächsten Schritt wurde das Wachstum von *B. cinerea* auf den RNAi-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen analysiert. Für die Quantifizierung fand erneut die Methode der qPCR Verwendung, wobei das *BcCutA*-Gen (Gachon und Saindrenan, 2004) als Zielamplikon genutzt wurde.

In mehreren Experimenten konnte dabei zwei bzw. drei Tage nach der Infektion kein signifikant verändertes Wachstum in den *StAOC*-, *StOPR3*- oder *StCOII*-RNAi-Linien gemessen werden (s. Abb. C-30).

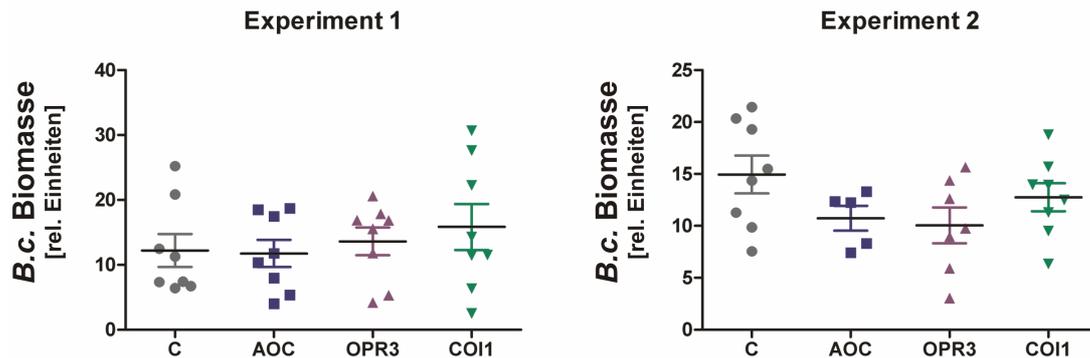


Abb. C-30: Wachstum von *B. cinerea* auf transgenen RNAi-Pflanzen

Kartoffelpflanzen wurden auf der Blattunterseite mit einer *B. cinerea* Sporensuspension infiziert (Experiment 1: $2,5 \times 10^4$ bzw. Experiment 2: 2×10^4 Sporen/ml; $10 \mu\text{l}$ je Inokulationstropfen). Nach drei (Experiment 1) bzw. zwei (Experiment 2) Tagen wurden Blattscheiben der Inokulationsstellen ausgestochen. In Experiment 1 wurden 10 Blattscheiben von einem Blatt gepoolt. Im Experiment 2 wurde ein Pool von 20 Blattscheiben von zwei Blättern verwendet. Aus dem Blattmaterial wurde die DNA isoliert. Die Quantifizierung der *B. cinerea* Biomasse erfolgte mittels qPCR über Amplifizierung eines *BcCutA*-Genfragments. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=4$) und deren Standardfehler aus zwei von vier Experimenten. Für die statistische Auswertung wurde eine parameterfreie, einfaktorische Varianzanalyse und Dunn's post hoc Test (Vergleich gegen die Kontrollen) genutzt.

B. cinerea induziert in Arabidopsis die Expression verschiedener Abwehrgene, wobei als klassisches Beispiel das Defensin *PDF1.2* und das *hevein-like protein HEL* zu nennen sind, die beide JA-abhängig induziert werden (AbuQamar *et al.*, 2006; Pre *et al.*, 2008). Auch in der Interaktion Kartoffel – *B. cinerea* sollte daher untersucht werden, welche Abwehrgene in Abhängigkeit vom JA-Signalweg exprimiert werden. Der zeitliche Verlauf der Transkriptakkumulation verschiedener Abwehrgene nach Infektion von Wildtyp-Kartoffelpflanzen mit *B. cinerea* ist in Abb. C-31 gezeigt. Sowohl die Transkripte der 9-LOX, *StLOX1*, als auch der 13-LOX des JA-Biosyntheseweges, *StLOX3*, waren in Wildtyp-Pflanzen ca. ein bis zwei Tage nach Infektion detektierbar. Ebenso weist das PR-Gen *StPR5* eine starke Induzierbarkeit nach *Botrytis*-Infektion auf. Für *StPR1* ist keine Akkumulation über die leicht variierende basale Expression hinaus feststellbar.

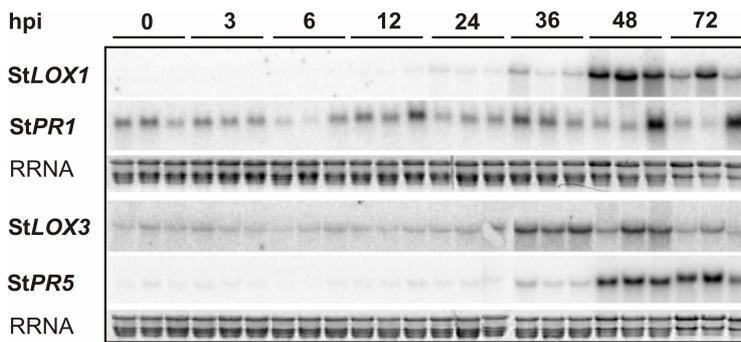


Abb. C-31: Abwehrgenexpression in Wildtyp-Pflanzen nach Infektion mit *B. cinerea*

Je drei Wildtyp-Kartoffelpflanzen wurden mit einer Sporensuspension von *B. cinerea* ($1,6 \times 10^4$ Sporen/ml) auf der Blattunterseite infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi, Stunden nach Infektion) geerntet. Für die Northern-Analysen wurden je 15 μg RNA in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion der Transkripte erfolgte mit spezifischen ^{32}P -markierten cDNA-Fragmenten. Ethidiumbromid-gefärbte rRNA diente als Ladekontrolle.

Die Expression der oben genannten Abwehrgene nach *Botrytis*-Infektion wurde daraufhin auch in den RNAi-Pflanzen untersucht, wobei hierfür nur ein Experiment vorlag. Als vorläufiges Ergebnis kann daher nur vermutet werden, dass die Akkumulation der *StLOX1*-Transkripte in den RNAi-Pflanzen nicht verändert ist. Dagegen könnte die *Botrytis*-responsive Expression des *StPR5* in diesen Pflanzen leicht reduziert sein (s. Abb. C-32). Für die *StLOX3* war die Detektionsgrenze in diesem Experiment nicht erreicht.

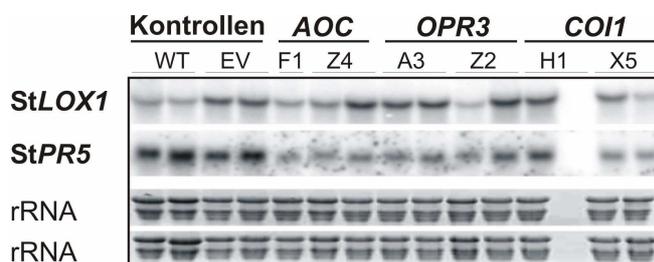


Abb. C-32: Expression von Abwehrgenen in transgenen RNAi-Pflanzen nach *B. cinerea*-Infektion

Blätter von Kartoffelpflanzen wurden auf der Blattunterseite mit einer *B. cinerea* Sporensuspension infiziert (2×10^4 Sporen/ml) und zwei Tage nach Infektion geerntet, wobei für jede Probe zwei Pflanzen zu einem Pool vereinigt wurden. Jeweils 15 μg RNA wurden für die Northern-Analysen in einem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend erfolgte das Übertragen auf eine Nylonmembran und die Hybridisierung mit radioaktiv-markierten cDNA-Fragmenten spezifisch für die *StLOX1* bzw. *StPR5*. Als Ladekontrolle diente die Ethidiumbromid-gefärbte rRNA.

Somit lässt sich feststellen, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Interaktion zwischen transgenen Kartoffelpflanzen mit beeinträchtigtem JA-Weg und dem hemibiotrophen Pathogen *P. infestans* sowie dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* keinen Hinweis auf eine Funktion der Octadecanoide in beiden Interaktionen geben. Eine Rolle des JA-Signalweges für die vollständige Induktion der Pep-13-vermittelten Abwehr und Genexpression konnte jedoch etabliert werden.

D DISKUSSION

1. PAMP-induzierte Abwehrantworten in *Solanum tuberosum* L. - Rolle der 13-Oxylipine

1.1 Die Pep-13 induzierte HR – eine atypische PAMP-Antwort?

Pflanzen sind in ihrem Leben einer „[...] Vielzahl von potentiellen mikrobiellen Pathogenen ausgesetzt und doch ist die Welt noch immer grün.“ (Boller und He, 2009). Zwar besitzen Pflanzen keine adaptive Immunabwehr wie tierische Organismen, doch ist jede Einzelzelle des pflanzlichen Organismus in der Lage Mikroorganismen, die potentielle Pathogene darstellen könnten, zu erkennen. Dafür werden mikrobielle hochkonservierte Molekülstrukturen genutzt, die sogenannten PAMPs. Mit den Arbeiten von Zipfel und später auch Hann und Rathjen wurde die Bedeutung der PAMP-Erkennung für die Abwehr von Pflanzen nachgewiesen (Zipfel *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006; Hann und Rathjen, 2007). Die Erkennung der Pathogene über diese verbreiteten Eigenschaften ermöglicht eine effiziente Abwehrantwort, da mit vergleichsweise wenigen Rezeptoren jeweils große Gruppen von Angreifern wahrgenommen werden und entsprechende Abwehrmechanismen induziert werden können (Zipfel, 2008; Boller und Felix, 2009; Nürnberger und Kemmerling, 2009).

Es wird angenommen, dass adaptierte Pathogene diese Abwehrmechanismen der Pflanzen erfolgreich überwinden können, indem sie ein Set von Effektormolekülen (Virulenzfaktoren) in die Pflanze injizieren (Kamoun, 2006, 2007; Speth *et al.*, 2007; Göhre und Robatzek, 2008). Neben Funktionen in der Unterdrückung von pflanzlichen Abwehrmechanismen können Effektoren auch die PAMP-vermittelte Erkennung der Pathogene durch die Pflanze verhindern. Die Effektoren AvrPto und AvrPtoB aus *P. syringae* beispielsweise inhibieren die PAMP-vermittelte Abwehr in Arabidopsis, indem sie PAMP-Rezeptoren modifizieren oder blockieren (Göhre *et al.*, 2008; Shan *et al.*, 2008; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Abwehr-Antworten der Kartoffel auf den *Phytophthora* PAMP Pep-13 untersucht. Pep-13 erfüllt dabei die allgemeine PAMP-Definition (Brunner *et al.*, 2002; Jones und Dangl, 2006; Göhre und Robatzek, 2008) und zeigt zusätzlich eine Resistenz-induzierende Wirkung in Kartoffelpflanzen (Halim, 2006). Diese häufig an PAMPs beobachtete Eigenschaft (Zipfel *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*,

2006) könnte u.a. auf die Aktivierung zahlreicher PRR- und R-Gene nach PAMP-Behandlung zurückgeführt werden (Navarro *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004).

Bereits in der Arbeit von C. Geiler konnte die Induktion einer nekrotischen Zelltodreaktion in Pep-13-behandelten Kartoffelblättern nachgewiesen werden (Geiler, 2001). Diese lokal begrenzte, schnelle Zelltodreaktion weist mit DNA-Fragmentierung (Halim *et al.*, 2004) Merkmale einer HR auf (Mur *et al.*, 2008). Das Auftreten einer HR-ähnlichen Reaktion nach Pep-13-Behandlung in Kartoffelblättern ist jedoch keineswegs eine typische Reaktion. Petersilie, eine Nicht-Wirts-Pflanze für *Phytophthora sojae*, besitzt eine spezifische Bindestelle für Pep-13 und reagiert auf Pep-13-Behandlung mit Abwehrantworten. So konnten in Petersilien-Zellkulturen die Synthese von Phytoalexinen oder eine induzierte Expression von Abwehrgenen beobachtet werden (Nürnberger *et al.*, 1994; Jabs *et al.*, 1997; Kroj *et al.*, 2003). Die Ausbildung einer HR-ähnlichen Reaktion wurde in diesem System jedoch nicht beobachtet (Halim *et al.*, 2004). Nach dem gängigen Modell der Evolution von Pflanze-Pathogen-Interaktionen (Chisholm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006) wird zudem davon ausgegangen, dass die durch PAMPs induzierten Abwehrantworten in der Pflanze zwar ausreichend für eine erfolgreiche Immunabwehr in Pflanzen sein können, jedoch nicht zur Ausprägung einer HR führen.

Dennoch sind neben Pep-13 weitere Beispiele beschrieben, in denen die Erkennung des PAMPs in der Pflanze zu einer Zelltodreaktion führt. So ist das Zellwand-assoziierte Glycoprotein CBEL (*cellulose binding elicitor lectin*) aus *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in der Lage, in der Wirtspflanze Tabak die Bildung von Nekrosen sowie die Expression von Abwehrgenen zu induzieren, sowie eine induzierte Resistenz gegen einen virulenten *P. parasitica* var. *nicotianae* hervorzurufen (Mateos *et al.*, 1997). Ähnliche Antworten werden durch CBEL auch in Arabidopsis ausgelöst, wobei die Nekrosenbildung in Arabidopsis erst nach 5 Tagen und somit zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt (Khatib *et al.*, 2004). Basierend auf der Analyse von Arabidopsis-Mutanten wird die durch CBEL-induzierte Nekrose als JA- und ET-abhängig beschrieben. Die in Arabidopsis durch CBEL-aktivierte Genexpression dagegen hängt von der funktionalen SA-Akkumulation ab (Khatib *et al.*, 2004). Da für CBEL eine Funktion im strukturierten Aufbau der Zellwand des Oomyceten nachgewiesen wurde (Gaulin *et al.*, 2002) und auch Hinweise auf CBEL-Homologe aus weiteren *Phytophthora*-Spezies existieren (Mateos *et al.*, 1997), besitzt es zahlreiche Attribute eines PAMPs und so wurden die beiden in CBEL enthaltenen Cellulose-bindenden Domänen (CBDs) als PAMP von *Phytophthora* beschrieben (Gaulin *et al.*, 2006).

Mit dem Elicitin INF1 aus *Phytophthora*-Spezies ist ein weiterer HR-auslösender Elicitor bekannt (Kamoun *et al.*, 1997; Kamoun *et al.*, 1998), der zudem PAMP-typische Abwehrantworten wie einen *oxidative burst* und Abwehrgenexpression induziert (Sasabe *et al.*, 2000). Die durch INF1-induzierte HR wurde anfänglich als Nicht-Wirts-HR

klassifiziert, da sie nur in Nicht-Wirts-Pflanzen der *Nicotiana*-Spezies, nicht aber in Kartoffel oder Tomate beobachtet werden konnte (Kamoun *et al.*, 1998). Neuere Arbeiten dagegen konnten eine HR-Antwort auf INF1 auch in zwei für *Phytophthora* suszeptiblen wilden *Solanum*-Spezies nachweisen (Vleeshouwers *et al.*, 2006), die jedoch durch höhere Konzentrationen an INF1 induziert wurden als in den *Nicotiana*-Spezies. Zudem wurde die Erkennung von INF1 in Tomatenpflanzen gezeigt, die zwar nicht zu einer HR-Ausprägung führt, aber dennoch eine Antwort in Form von induzierter Abwehrgenexpression und Ethylensynthese hervorruft (Kawamura *et al.*, 2009). An der Perzeption von INF1 in Tabak ist zumindest partiell eine Lektin-ähnlichen Kinase beteiligt (Kanzaki *et al.*, 2008). Weiterhin kann die INF1-induzierte HR von den bakteriellen Effektoren AvrPto und AvrPtoB supprimiert werden (Hann und Rathjen, 2007), die auch das *signalling* anderer PAMP-Rezeptoren inhibieren (Göhre *et al.*, 2008; Shan *et al.*, 2008; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009). Die endogene Funktion von INF1 ist vermutlich die Bindung von Sterolen, die der Oomycet aus den Pflanzen akquirieren muss, da er zu deren Synthese selbst nicht in der Lage ist (Tyler, 2002). Die Sterol-Bindung scheint also eine essentielle Funktion des INF1 zu sein, die für typische PAMPs postuliert wird. Gerade diese Sterol-Bindefähigkeit von INF1 korreliert mit seiner HR-induzierenden Wirkung in Tabak (Osman *et al.*, 2001). Auch die in Tomate beobachteten Abwehrantworten sind abhängig von funktionalen INF1, d.h. eine mutierte Variante von INF1 mit Verlust der Sterol-bindenden Aktivität ist nicht in der Lage diese Antworten in Tomate auszulösen (Kawamura *et al.*, 2009). Zusammengefasst können diese Daten auf eine Funktion von INF1 als PAMP von Oomyceten hinweisen (Kawamura *et al.*, 2009). Zusätzlich resultiert die Vorbehandlung mit INF1 in Tomate auch in einer Resistenz gegen *Ralstonia solanacearum* (Kawamura *et al.*, 2009), ein Effekt der für klassische PAMPs wie flg22 ebenso beschrieben ist (Zipfel *et al.*, 2004). Zwar zeigen *Phytophthora*-Stämme mit einer Deletion des INF1 keinen Fitness-Verlust auf Wirtspflanzen (Kamoun *et al.*, 1998), doch könnte dies damit erklärt werden, dass INF1 zu einer Genfamilie gehört (Kamoun *et al.*, 1993), deren Mitglieder möglicherweise redundant sind.

Andere Elicitoren pflanzlicher Abwehrreaktionen, für die zwar eine HR als Antwort in Tomate und Tabak bzw. Tabak beschrieben ist, die aber aufgrund der bisherigen Daten nicht eindeutig als PAMP definiert werden können, sind die in Pilzen vorkommende Ethylen-induzierende Xylanase (EIX) (Enkerli *et al.*, 1999; Rotblat *et al.*, 2002) und das bakterielle HrpZ, ein Vertreter der Harpin-Proteine (He *et al.*, 1993). Für EIX konnte mit LeEix2 ein transmembranständiges LRR-Protein als funktioneller Rezeptor charakterisiert werden (Ron und Avni, 2004), dem ebenso wie dem Chitin-Rezeptor CEBiP aus Reis (Kaku *et al.*, 2006) eine für bisher beschriebene PAMP-Rezeptoren typische intrazelluläre Kinase-Domäne (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Zipfel *et al.*, 2006) fehlt. LeEix2 wird nach Stimulierung mit ähnlicher Kinetik über einen Endocytose-

Prozess internalisiert wie FLS2, jedoch scheinen sich die Wege dieser beiden Prozesse zu unterscheiden (Robatzek *et al.*, 2006; Bar und Avni, 2009).

Für HrpZ konnte die Induktion eines FRK1-LUC-Reporter-Genkonstruktes (Marker für frühe PAMP-Antwort) in Abhängigkeit von BAK1, einem Co-Rezeptor von FLS2 und EFR nachgewiesen werden (Shan *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde publiziert, dass für die Abwehr-induzierende Wirkung von HrpZ nur der C-terminale Teil des Proteins, für seine Poren-bildende putative Virulenzfunktion hingegen das intakte Protein notwendig ist (He *et al.*, 1993; Engelhardt *et al.*, 2009). Die Frage, ob allein der C-terminale Teil von HrpZ auch in der Lage ist, eine HR-Bildung zu induzieren, bleibt aber offen. Für ein anderes Harpin-Protein aus *Erwinia amylovora* konnte eine Resistenz-induzierende Wirkung in Tomatenpflanzen gegen den Pilz *B. cinerea* (Fontanilla *et al.*, 2005) und den Oomyceten *P. infestans* gezeigt werden (Fontanilla *et al.*, 2005). Somit existieren sowohl für EIX als auch für Harpin-Proteine Hinweise, dass es sich bei diesen Elicitoren um PAMPs handeln könnte, die in den Solanaceen Tomate bzw. Tabak eine HR auslösen können.

Während flg22, das Elicitor-aktive Epitop des bakteriellen Flagellins weder in Arabidopsis noch in Solanaceen eine HR induzieren kann, wurde eine HR in Tomate nach Infiltration des gereinigten Flagellins aus *P. syringae* pv. *tabaci* beobachtet. Umgekehrt reagieren Tabak-Zellkulturen stärker auf Flagellin aus *P. syringae* pv. *tomato* oder *glycinea* als auf das *P. syringae* pv. *tabaci*-spezifische Flagellin (Taguchi *et al.*, 2003) und in Tabakblätter infiltriertes *P. syringae* pv. *tomato*-Flagellin induziert dort eine HR (Hann und Rathjen, 2007). Eine mögliche Annahme ist, dass das intakte Flagellin zusätzlich zu flg22 ein Epitop besitzt, das in Tabak erkannt werden kann, wobei Glycosylierung als mögliches Strukturmerkmal in Frage kommen könnte (Takeuchi *et al.*, 2003). Die Klonierung des *N. benthamiana*-Homologen der FLS2-Rezeptorkinase und die Komplementation von *NbFLS2*-defizienten Tabakpflanzen mit *AtFLS2* wurden 2007 von Hann und Rathjen beschrieben. Die mit *AtFLS2* komplementierten Tabakpflanzen waren in der Lage, mit einem *oxidative burst* auf flg22 zu reagieren (Hann und Rathjen, 2007). Die Ausprägung einer HR in diesen Pflanzen nach Behandlung mit Flagellin-Monomeren ist jedoch nicht beschrieben worden. Dieses Experiment könnte klären, ob *AtFLS2* in Tabak eine Flagellin-induzierte HR vermitteln könnte, also Solanaceen-spezifische *downstream*-Signalwege hierfür erforderlich sind. Unterschiede in der Wahrnehmung von Flagellin scheint es sogar zwischen verschiedenen Solanaceen zu geben. Während in Tomate flg15 aus *E. coli* als PAMP dient, kann Tabak flg15^{E.coli} nicht perzipieren (Robatzek *et al.*, 2007). Die heterologe Expression des Tomaten-FLS2-Rezeptors in Tabak führt jedoch zu Responsivität gegenüber flg15^{E.coli} (Robatzek *et al.*, 2007), was auf Unterschiede in der Rezeptor-vermittelten Erkennung und nicht in der Signaltransduktion hindeuten würde.

Aus den genannten und weiteren Daten zur PAMP-Erkennung in Pflanzen könnte man den Schluss ziehen, dass die HR als Antwort auf PAMP-Erkennung eine Solanaceen-spezifische Reaktion ist. So verursacht z.B. auch weder eines der für die Brassicacee *Arabidopsis* bekannten PAMPs (flg22, EF-Tu, PGN) (Felix *et al.*, 1999; Kunze *et al.*, 2004; Gust *et al.*, 2007) noch der *Pst* DC3000 *hrp*⁻-Stamm (Govrin und Levine, 2000) in *Arabidopsis* eine HR. Ebenso wurde in einem Screen mit 53 *Arabidopsis* Ökotypen für Behandlung mit einem Elicitin aus *Phytophthora cinnamomi* keine HR beobachtet (Takemoto *et al.*, 2005).

Mit dem RNP-1-Motiv des bakteriellen *cold shock protein* (CSP) (Felix und Boller, 2003) bzw. dem elf18-Peptid des EF-Tu (Kunze *et al.*, 2004) sind Spezies-spezifische PAMPs bekannt, die ausschließlich in Solanaceen bzw. Brassicaceen erkannt werden. Der Elicitor CSP verursacht allerdings im Gegensatz zu den anderen für Solanaceen beschriebenen PAMPs und Elicitoren (s. oben) keine HR in den getesteten Pflanzen (Felix und Boller, 2003). Trotzdem weisen diese Daten darauf hin, dass verschiedene Pflanzenfamilien ein unterschiedliches Spektrum an PAMPs erkennen können und möglicherweise Unterschiede in ihren Antworten aufweisen (Hann und Rathjen, 2007). So wird dann auch in einem zusammenfassenden Artikel darauf hingewiesen, dass zwar PAMPs normalerweise keine HR auslösen, es sich dabei jedoch nicht um eine pauschale Regel handelt (Boller und Felix, 2009).

Das Auftreten einer HR nach Behandlung von Kartoffel mit dem *Phytophthora*-spezifischen PAMP Pep-13 ruft die Frage hervor, ob diese eine Funktion in der Abwehr des Oomyceten besitzt. Im Allgemeinen wird die HR als Verteidigungsstrategie von Pflanzen gegenüber biotrophen Pathogenen betrachtet (Kliebenstein und Rowe, 2008) während *Phytophthora* als hemibiotrophes Pathogen beschrieben ist und gerade in der späten nekrotrophen Phase selbst das pflanzliche Gewebe durch Nekrosen-Bildung zerstört. Für den rein nekrotroph wachsenden Pilz *B. cinerea* konnte sogar eine verstärkte Infektion bei gleichzeitiger Stimulierung einer HR mit der Infektion beobachtet werden (Govrin und Levine, 2000). Dennoch wurde die HR als Teil der Abwehr gegen *Phytophthora* in resistenten *Nicotiana*-Spezies (Kamoun *et al.*, 1998) und ebenso in resistenten wie auch suszeptiblen *Solanum*-Spezies (Vleeshouwers *et al.*, 2000) nachgewiesen. Die HR kann also Teil der Abwehrantworten von Wirts- und Nichtwirtspflanzen gegen *Phytophthora* sein.

1.2 Pep-13-induzierte Signalverarbeitung in Kartoffel

Der *Phytophthora*-spezifische PAMP Pep-13 ist in der Lage nach Infiltration in Kartoffelblätter eine HR auszulösen, während diese Reaktion in der Nicht-Wirts-Pflanze Petersilie nicht beobachtet wird (Halim *et al.*, 2004). Dies läßt auf Unterschiede in Teilen der Pep-13-induzierten Signalverarbeitung zwischen beiden Pflanzenspezies schließen. Dagegen können allgemeine Charakteristika von PAMP-Reaktionen (Boller und Felix, 2009; Nürnberger und Kemmerling, 2009) in der Pep-13-induzierten Signalkaskade beider Pflanzenspezies beobachtet werden, so dass die Annahme, dass auf die spezifische Erkennung von PAMPs hin eine konservierte Signalverarbeitung stattfindet (Zipfel *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2008; Boller und Felix, 2009) auch an diesem PAMP bestätigt wird.

Trotzdem können Unterschiede verzeichnet werden z.B. in dem Auftreten der HR (s. D 1.1), in der Synthese von Camalexin in Arabidopsis als Antwort auf PGN, nicht aber flg22 und ebenso in sehr ähnlichen, aber eben nicht identischen Genexpressionsmustern nach PAMP-Behandlung (Gust *et al.*, 2007). Als mögliche Ursachen für diese Unterschiede werden zum einen Schwellenwerte für die frühen Signale diskutiert und zum anderen darauf hingewiesen, dass mittlerweile verschiedene Rezeptortypen für verschiedene PAMPs bekannt sind (Gust *et al.*, 2007). So werden flg22 und EF-Tu über LRR-RLKs und in Abhängigkeit von BAK1, einem Co-Rezeptor, perzipiert (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Zipfel *et al.*, 2006; Chinchilla *et al.*, 2007), während z.B. an der Chitinwahrnehmung LysM-RLPs und LysM-RLKs beteiligt sind und diese Perzeption vermutlich BAK1-unabhängig vermittelt wird (Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007; Shan *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2008).

In Kartoffelpflanzen ist neben den allgemein beobachteten PAMP-Antworten nach Infiltration von Pep-13 die Akkumulation der Signalsubstanzen SA und JA nachgewiesen worden (Halim *et al.*, 2004). Eine solche Bildung von SA als Antwort auf PAMPs ist auch für Arabidopsis und Tabak gezeigt, die nach flg22- und LPS-Behandlung bzw. Elicitin-Behandlung SA akkumulieren (Dorey *et al.*, 1999; Mishina und Zeier, 2007; Tsuda *et al.*, 2008). Der Einfluss der Oxylipine, im Besonderen OPDA und JA auf die PTI ist generell wenig untersucht und war ein Aspekt dieser Arbeit. Im Vorfeld war bereits eine Reduktion der Pep-13-induzierten Abwehrantworten in JA-defizienten StOPR3-RNAi-Pflanzen beobachtet worden (Halim *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass für die Abwehrantworten auf Pep-13-Behandlung in Kartoffelpflanzen tatsächlich JA das Signal unterhalb von SA ist. In den hier verwendeten StAOC-RNAi-Pflanzen, die zusätzlich zu reduzierten JA-Leveln auch kein OPDA mehr akkumulieren sollten, zeigte sich keine Verstärkung des Pep-13-induzierten Phänotyps der ROS-Bildung oder HR-Ausprägung im Vergleich zu den StOPR3-RNAi-Pflanzen (s. Abb. C-8 und C-9). Ferner ist die Abhängigkeit der JA-abhängigen

Abwehrantworten nach Pep-13-Behandlung von StCOI1, der zentralen Signalverarbeitungskomponente des JA-Weges, gezeigt (s. Abb. C-8 und C-9). Neben einem Einfluss auf die Bildung der HR und die damit verbundene ROS-Akkumulation konnte auch eine Funktion von JA in der Pep-13-vermittelten Aktivierung zumindest einiger Abwehrgene ermittelt werden (s. auch D 1.3). Außerdem konnte in Zeitreihen-Experimenten mit Wildtyp-Pflanzen die Akkumulation von JA-Ile nachgewiesen werden, das in *A. thaliana* und Tomate als biologisch aktives Derivat der JA gilt (Staswick *et al.*, 2002; Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Der Nachweis, dass JA-Ile auch in der Pep-13-induzierten Abwehr in Kartoffel als Signal fungiert könnte über die Klonierung und anschließendes *Silencing* des *JAR1*-Homologen aus Kartoffel erbracht werden.

In den JA-defizienten bzw. –insensitiven RNAi-Pflanzen ist nur ein reduzierter Pep-13-Phänotyp zu beobachten, was im Kontrast zu dem totalen Verlust der ROS-Akkumulation und HR-Ausbildung in *NahG*-exprimierenden Pflanzen steht (Halim *et al.*, 2004). Daher kann das Modell der Pep-13-induzierten Abwehr in Kartoffel (s. Abb. D-1) nicht als lineare Signalkaskade gezeichnet werden. Stattdessen wird ein verstärkender Effekt der Signalsubstanz JA auf die Ausbildung der Abwehr nach Pep-13-Erkennung angenommen, für den auch StCOI1 benötigt wird. Eine gleichzeitige Akkumulation von JA und SA und somit eine putativ synergistische Funktion, konnte z.B. auch in transgenen Rpm1-Arabidopsis-Pflanzen beobachtet werden, die nach DEX-Behandlung *AvrRpm1* exprimierten (Mackey *et al.*, 2002) und dadurch eine R-Gen-vermittelte HR ausbildeten (Kourtschenko *et al.*, 2007). Dabei ist jedoch noch unklar, ob es sich um eine Signalkaskade oder zwei parallele Signalwege handelt.

Eine andere Möglichkeit der Interpretation der Daten der vorliegenden Arbeit könnte darin bestehen, dass die RNAi-vermittelte Herabsetzung der *StAOC*-, *StOPR3*- bzw. *StCOI1*-Transkriptakkumulation nicht vollständig ist und somit ein komplettes Ausschalten der JA-abhängigen Abwehrantworten nicht erreicht wird. Damit wäre es auch möglich anzunehmen, dass JA eigentlich direkt unterhalb von SA fungiert. Dagegen spricht allerdings die deutliche 76-, 56- bzw. 16-fache Reduktion der jeweiligen *StAOC*-, *StOPR3*- bzw. *StCOI1*-Transkripte laut der Microarray-Daten (s. C 1.5.1). Trotz der verschieden reduzierten Transkriptmengen weisen alle sechs für die Pep-13-Experimente verwendeten JA-defizienten bzw. –insensitiven RNAi-Linien gleiche Abwehrantworten sowie stark reduzierte JA-Level nach Pep-13-Behandlung auf. Eine entsprechend ihres *Silencing*-Levels reproduzierbare variierende Pep-13-Antwort der RNAi-Linien, wurde nicht festgestellt.

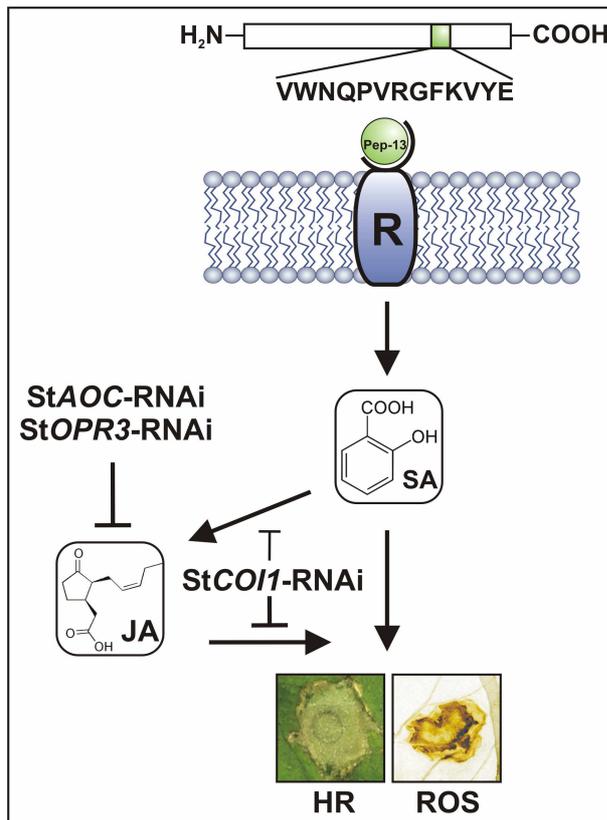


Abb. D-1: Model der Pep-13-induzierten Signalkaskade in Kartoffel

Pep-13, ein 13 Aminosäuren langes Peptid aus GP42, einer *Phytophthora*-spezifischen Transglutaminase wird in Kartoffel als PAMP erkannt. Die Perzeption erfolgt vermutlich über einen membranständigen Rezeptor (R). Diese Erkennung induziert eine Signalkaskade, in deren Verlauf SA und JA akkumulieren. Dabei ist SA für die Ausbildung der HR und die ROS-Akkumulation absolut notwendig, während JA vermutlich einen verstärkenden Einfluss auf die HR-Ausbildung hat. Die Expression der StAOC- und StOPR3-RNAi-Konstrukte inhibiert die JA-Akkumulation. Expression des StCOI1-RNAi-Konstruktes führt zu Insensitivität gegenüber JA. Da die JA-Biosynthese über einen positiven *feedback*-Mechanismus reguliert wird, kann dadurch auch die JA-Biosynthese beeinträchtigt sein.

Die Daten dieser Arbeit und der Vorgänger-Arbeiten (Wolf, 2005; Halim *et al.*, 2006) können eine Funktion von JA in der Signalkaskade unterhalb der Pep-13-Erkennung nachweisen. Auch in anderen Systemen konnte bereits eine Aktivierung des JA-Signalweges bzw. auch des 9-Oxylipin-Weges durch PAMP-vermittelte Erkennung nachgewiesen werden. So kann z.B. die Aktivierung der JA-responsiven Gene 13-Lipoxygenase (*13-LOX*), Proteinase-Inhibitor 2 (*PR6*) und Divinylethersynthase (*DES*) in INF1-behandelten Tomatenpflanzen beobachtet werden, auch wenn diese Pflanzen im Gegensatz zu Tabak oder *N. benthamiana* keine HR ausbilden (Kawamura *et al.*, 2009). CBEL, ein *Phytophthora*-PAMP, ist zudem in der Lage in Arabidopsis JA- und ET-abhängig die Expression einer Anthranilat Synthase (*ASA1*), eines Enzyms im Camalexin-Stoffwechsel, zu induzieren (Khatib *et al.*, 2004) und in Tabakpflanzen eine 9-LOX transkriptionell zu aktivieren (Mateos *et al.*, 1997). In keiner dieser Arbeiten wurde jedoch eine PAMP-induzierte Akkumulation der Oxylipine gezeigt. Weiterhin wäre es auch interessant zu testen, ob die häufig durch PAMP-Vorbehandlung induzierte systemische Resistenz (Mateos *et al.*, 1997; Zipfel *et al.*, 2004; Kawamura *et al.*, 2009) an einen funktionalen JA-Weg gekoppelt ist, für den mehrfach eine Rolle in der Ausprägung der induzierten systemischen Resistenz (ISR) gezeigt wurde (Pieterse *et al.*, 1998; Van Wees *et al.*, 2008).

Bisher bleibt offen, welche spezifische Funktion JA in der Pep-13-vermittelten Abwehr in Kartoffel wahrnimmt. Möglicherweise könnte eine Funktion in der

Vermittlung der HR-Antwort bestehen, die nach Pep-13-Infiltration einsetzt, in vielen anderen PAMP-Interaktionen jedoch nicht zu beobachten ist. JA ist unter anderem für eine Seneszenz-vermittelnde Aktivität bekannt (He *et al.*, 2002; Wasternack, 2007). In Kartoffel konnte zudem eine HR-induzierende Wirkung nach Behandlung mit dem JA-Vorläufer 13-HPOT nachgewiesen werden (Göbel, 2001). Die von dem *Phytophthora*-PAMP CBEL induzierte HR in Arabidopsis ist ebenso von einem funktionellen JA-Signalweg abhängig (Khatib *et al.*, 2004). Zusätzlich zum JA-Signalweg wurde unter Verwendung der Mutante *ein2* ein Einfluss des ET-Signalweges auf die Bildung der CBEL-induzierten Nekrose beobachtet (Khatib *et al.*, 2004). Da die Reaktion von Kartoffelpflanzen auf Pep-13-Behandlung nur partiell von dem fehlenden JA-Signalweg beeinflusst wird, könnte die Existenz eines parallel zu JA agierenden Signalweges angenommen werden. Eine *flg22*-induzierte ET-Synthese für Kartoffel wurde von Kunze und Mitarbeitern beschrieben (Kunze *et al.*, 2004), so dass der ET-Signalweg ein Kandidat hierfür sein könnte. Auf der anderen Seite führt das *Silencing* von *COII* oder *NPR1*, deren Genprodukte im JA- bzw. SA-Signalweg fungieren, in *N. benthamiana* nicht zu einer Veränderung des HR-Phänotyps nach INF1-Behandlung (Kanneganti *et al.*, 2006). Somit ist es möglich, dass die Ausbildung der HR in verschiedenen Pflanzenspezies durch unterschiedliche Signalwege vermittelt wird. Die Hypothese von Gust (Gust *et al.*, 2007), dass verschiedene Rezeptortypen zu unterschiedlicher Signalverarbeitung führen, kann hierfür eine Erklärung bieten.

Auch die Signalkomponenten unterhalb von JA sind noch unbekannt. Mögliche Signale, von denen bekannt ist, dass sie in der Ausprägung der HR-Antwort in anderen Systemen eine Rolle spielen, sind u.a. MAPKs. So weisen *N. benthamiana*-Pflanzen mit einem *Silencing* der MAPK-Kinase *NbMKK1* eine verzögerte HR nach INF1-Behandlung auf (Takahashi *et al.*, 2007). Für die MAPKs WIPK und SIPK aus Tabak ist eine Aktivierung nach Behandlung mit dem Elicitin Cryptogein bekannt (Zhang *et al.*, 2000). Die Tabak MAPK-Kinase *NtMEK2* kann sowohl SIPK als auch WIPK aktivieren (Yang *et al.*, 2001) und es wird angenommen, dass diese MAPK-Kinase parallel zu der *NbMKK1*-Kaskade arbeitet, da *NbMKK1* auch mit *NbSIPK* interagieren kann (Takahashi *et al.*, 2007). Auch die vermutlich zu der *NbMKK1*-SIPK/WIPK homologe Kaskade aus Tomate, *SIMKK4*-*SIMP2*/*SIMP3* fungiert in der Vermittlung einer Zelltodreaktion (Pedley und Martin, 2004). Unterhalb der MAPK-Aktivierung findet sich häufig ein *oxidative burst* und in verschiedenen Arbeiten wurde eine Verknüpfung dieser beiden Signale als essentiell für die Auslösung der Zelltodreaktion beschrieben (Ren *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2003). Beispielsweise konnten Asai und Mitarbeiter (Asai *et al.*, 2008) die Abhängigkeit des INF1-vermittelten *oxidative burst* in *N. benthamiana* von den MAPK-Kaskaden *MEK2*-SIPK/*Ntf4* und *MEK1*-*Ntf6* nachweisen. Zusätzlich existieren Hinweise auf eine Funktion der *NtMEK2*-SIPK/*Ntf4*/WIPK-Kaskade als Signal für die

Generierung von ROS in den Chloroplasten, die dann die HR vermitteln (Liu *et al.*, 2007). Die zentrale Funktion der MAPK-Wege wird auch durch die Phosphothreoninlyase-Aktivität des *Pseudomonas*-Effektors HopA1 verdeutlicht, durch die MPK3 und MPK6 aus *Arabidopsis* inaktiviert werden (Zhang *et al.*, 2007). Eine Verbindung zwischen den von PAMPs aktivierten MAPKs und der nach Pep-13-Behandlung beobachteten Akkumulation der Signalmoleküle SA und JA könnte auf der Basis von Tabakdaten postuliert werden, die eine Regulation des wundinduzierten JA-Levels (Seo *et al.*, 2007) bzw. des Harpin-induzierten SA-Levels durch MAPKs zeigen (Samuel *et al.*, 2005).

Die Aktivierung der MAPKs erfolgt bereits innerhalb weniger Minuten und es wurde vorgeschlagen, dass oberhalb dieser Signalkaskaden Ca^{2+} -Ionenströme fungieren (Lecourieux *et al.*, 2002), die in Tabakzellen für die Ausbildung der HR nach INF1-Behandlung benötigt werden (Sasabe *et al.*, 2000). Eine Komponente zwischen Ca^{2+} und SA-Akkumulation wurde mit dem Calmodulin-bindenden Protein CBP60g aus *Arabidopsis* kürzlich beschrieben (Wang *et al.*, 2009). Die flg22-induzierte SA-Akkumulation und auch die Abwehr gegenüber einem virulenten *Pseudomonas*-Stamm hängt in diesem System von CBP60g und seiner Fähigkeit Calmodulin zu binden ab (Wang *et al.*, 2009). Ob der MAPK-Weg von Ca^{2+} aktiviert wird, oder beide Wege unabhängig voneinander agieren bleibt zu klären (Wang *et al.*, 2009).

Interessanterweise ist SA als Signal für die HR einiger R-Gen-abhängiger Signalketten bekannt (Wiermer *et al.*, 2005) und auch der Harpin-induzierte Zelltod in Tabak ist SA-abhängig (Samuel *et al.*, 2005). Dagegen zeigt Tomate nach INF1-Behandlung weder eine Aktivierung des SA-Weges noch eine HR (Kawamura *et al.*, 2009).

Eine weitere noch ungeklärte Frage bleibt das Signal zwischen SA und JA nach der Erkennung von Pep-13 in Kartoffelblättern. In *Arabidopsis*, einer Pflanze für die meist eine antagonistische Interaktion zwischen SA und JA nachgewiesen werden konnte, wurde die Regulierung dieses Antagonismus durch Änderungen im Redoxstatus der Zelle vorgeschlagen (Spoel *et al.*, 2003; Koornneef *et al.*, 2008). In dem hier untersuchten Modell, Kartoffel-Pep-13 liegen SA und JA in einem Signalweg. Es wäre interessant zu klären, ob eine Kontrolle über den Redoxstatus auch hier vorliegt, zumal für den SA-Signalweg gezeigt wurde, dass SA-induzierte Veränderungen im Redoxpotential der Zelle und daraus resultierende Monomerisierung und Kern-Lokalisierung von NPR1 zu einer Aktivierung SA-abhängiger Gene führen (Mou *et al.*, 2003).

Die Akkumulation von SA setzt in Kartoffel bereits ca. sechs Stunden nach Pep-13-Behandlung ein (s. Abb. C-1) und könnte zu einer Aktivierung der JA-Biosynthesegene oder aber zur direkten Aktivierung der Substratfreisetzung für die JA-Biosynthese führen. Andererseits ergab eine innerhalb dieser Arbeit durchgeführte Kinetik Hinweise auf eine

mögliche schwache Akkumulation von OPDA und JA zu frühen Zeitpunkten nach Pep-13-Behandlung (s. Abb. C-2), die weiter untersucht werden müsste.

Ein weiteres Signal in der PAMP-induzierten Abwehr könnte Phosphatidsäure (PA)-Akkumulation sein, da z.B. Tomatenzellen nach Behandlung mit flg22, Xylanase oder Chitin eine PA-Akkumulation aufweisen (van der Luit *et al.*, 2000). Als Quelle für die PA-Akkumulation werden sowohl der Abbau von Inositolphosphaten durch Phospholipase C (PLC) als auch der Abbau der strukturellen Phospholipide durch Phospholipase D (PLD) diskutiert (van der Luit *et al.*, 2000). Da exogene Gabe von SA zu einer erhöhten PLD-Aktivität in *A. thaliana* führt, und ca. ein Drittel der SA-aktivierten Gene eine Abhängigkeit von dieser PLD-Aktivität zeigen (Krinke *et al.*, 2009) könnte PA unterhalb von SA agieren. In verwundeten Arabidopsis-Pflanzen akkumuliert PA vor JA und da *antisense*-PLD-Pflanzen reduzierte JA-Level nach Verwundung aufweisen (Wang *et al.*, 2000) und eine Regulation der Galactolipasegene *AtDGL* und *AtDAD1* durch *PLD α 1* nachgewiesen wurde (Hyun *et al.*, 2008), könnte mit PA ein Signal vorliegen, dass die SA-Akkumulation mit der JA-Akkumulation verknüpft. Zudem kann PA-Gabe in *A. thaliana* eine Zelltod-Antwort auslösen (Andersson *et al.*, 2006), womit ein Hinweis auf eine HR-vermittelnde Funktion des PA vorliegt. Es könnte daher untersucht werden, ob auch für die HR nach PAMP-Behandlung PA als Signal dient. Zu beachten ist jedoch, dass es sich bei den oben genannten Beispielen in den verschiedenen Systemen um sehr verschiedene Stressstimuli und Zeiträume der betrachteten Antworten handelt, so dass dies vorerst eine spekulative Hypothese darstellt.

In der R-Gen-vermittelten Resistenz, die meist durch eine schnelle HR gekennzeichnet ist, besitzt der SGT1-HSP90-Chaperon-Komplex eine zentrale Funktion für die HR-Ausprägung (Shirasu, 2009). HSP90 wurde zudem als Interaktor für NbSIPK identifiziert und HSP90-*knock down*-Pflanzen wiesen einen Defekt in der INF1-vermittelten HR auf (Kanzaki *et al.*, 2003). Ebenso ist für SGT1 bekannt, dass *Silencing* dieser Komponente in *N. benthamiana* zu einem Verlust der HR nach transienter INF1-Expression führt (Peart *et al.*, 2002). Dem SGT1-HSP90-Chaperon-Komplex könnte somit neben der bereits bekannten Funktion in der ETI auch eine Funktion in der Vermittlung der durch PAMPs induzierten HR zukommen.

Welche Möglichkeiten könnten bestehen, den von Pep-13 ausgelösten Signalweg in Kartoffel weiter aufzuklären? In anderen Systemen wurden dazu erfolgreich Daten aus der ETI mit denen der PTI verknüpft. Virulente Pathogene nutzen Effektoren, um die PTI zu unterdrücken und man könnte aus den Angriffszielen der Pathogen-Effektoren Rückschlüsse auf die PTI ziehen.

Weiterhin ist eine allgemein genutzte Möglichkeit der Aufklärung von Signalwegen die Verwendung von Microarray-Daten, die möglicherweise Trends, der durch den Stimulus hervorgerufenen Änderungen in der Genexpression wiedergeben, wodurch Hinweise auf die beteiligten Signalwege erhalten werden können.

1.3 Oxylin-regulierte Gene in der Pep-13-Antwort der Kartoffel

Häufig werden Mutanten mit veränderter Antwort auf einen Stimulus hinsichtlich ihres globalen Expressionsmusters im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen untersucht, um so Hinweise auf Signalwege zu erhalten, die von diesen Mutationen beeinflusst werden. In ähnlicher Weise wurden in der vorliegenden Arbeit die Pep-13-induzierte globale Genexpression von Pflanzen charakterisiert, die in ihren JA- und/oder OPDA-Leveln oder in ihrer JA-Sensitivität beeinträchtigt waren. Daraus sollten Rückschlüsse auf JA- bzw. OPDA-regulierte Gene gezogen werden, die in der Pep-13-Antwort von Kartoffel eine Rolle spielen. Zudem könnte die Analyse dieser Microarray-Daten mögliche Kandidaten identifizieren, die an der Ausbildung der Pep-13-vermittelten HR beteiligt sind.

Für die Modellpflanze *A. thaliana* liegen zahlreiche Expressionsprofile für PAMP-Reaktionen vor, wie z.B. für *flg22*, *elf26*, PGN, LPS, Chitin und Harpin (Navarro *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004; Thilmony *et al.*, 2006; Zipfel *et al.*, 2006; Gust *et al.*, 2007; Livaja *et al.*, 2008). Aus diesen Daten könnten einige allgemeine Schlüsse hinsichtlich der PAMP-induzierten Genexpression von Pflanzen gezogen werden. So scheint es ein Set von Genen zu geben, das von allen PAMPs gleichermaßen aktiviert wird und eine generische PAMP-Antwort darstellt (Desaki *et al.*, 2006; Thilmony *et al.*, 2006; Zipfel *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2008). Des Weiteren werden meist mehr Gene aktiviert als reprimiert, wobei ein großer Teil der aktivierten Gene ihrer Funktion nach in die Gruppen Signal-Perzeption/Transduktion (z.B. Rezeptoren, Proteinkinasen), transkriptionelle Regulation (z.B. WRKY und AP2/ERF Transkriptionsfaktoren) und antimikrobielle Wirkung (z.B. PR-Proteine, Enzyme der Phytoalexinbiosynthese) eingeordnet werden kann (Zipfel *et al.*, 2004). In der Gruppe „Signal-Perzeption“ befinden sich überproportional viele Gene, die für RLKs und R-Proteine kodieren, u.a. auch für PAMP-Rezeptoren selbst (Navarro *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004; Thilmony *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007). Daher wird von der Induktion eines „Alarmzustandes“ nach PAMP-Wahrnehmung ausgegangen, der die Pflanze gegenüber weiteren pathogenen Mikroben sensibilisiert (Zipfel *et al.*, 2004). Ebenfalls aktiviert werden häufig Gene des Ubiquitin-Proteasom-Weges, was als Hinweis gewertet wird, dass zumindest ein Teil des pflanzlichen Immunsystems negativ reguliert und auf einen Stimulus hin dereprimiert wird (Navarro *et al.*, 2004). Auch finden sich unter den aktivierten Genen solche, die für Zellwand-Modifikationen (Thilmony *et al.*, 2006; Livaja *et al.*, 2008) oder Sekretionsmechanismen kodieren (Thilmony *et al.*, 2006; Denoux *et al.*, 2008), während Gene des Auxin-Metabolismus herunterreguliert werden (Navarro *et al.*, 2004). Ein zentraler Punkt dieser Studien ist der Nachweis, dass PAMP-responsive Gene nach Infektion mit virulenten Pathogenen nicht oder weniger robust und nur mit großer

Zeitverzögerung aktiviert werden. Oder sie werden nach anfänglicher Aktivierung später durch Virulenzmechanismen der Pathogene unterdrückt (Tao *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2004; Thilmony *et al.*, 2006).

Für *Solanaceen* liegen keine derart ausführlichen Daten vor und auch die Reaktion auf PAMPs von Oomyceten wurde bisher selten analysiert. Die Arbeitsgruppe um Kawamura veröffentlichte eine globale Genexpressionsanalyse in INF1-behandelten Tomatenpflanzen (Kawamura *et al.*, 2009). Interessanterweise rief INF1-Behandlung dort eine Induktion von Komponenten des JA-Weges hervor, wie z.B. einer Lipoxygenase, der AOS und des Proteinase Inhibitors II (*PR6*) (Kawamura *et al.*, 2009). Zwar kann angenommen werden, dass auch durch den *Phytophthora*-PAMP Pep-13 ein ähnliches Set von generischen PAMP-responsiven Genen aktiviert wird, doch ließ die Tatsache, dass Pep-13 in Kartoffel eine HR auslöst, auch Unterschiede in der Antwort vermuten. Beispielsweise identifizierte ein Vergleich der Reaktion von Arabidopsis auf Harpin- bzw. LPS-Behandlung unterschiedliche Genaktivierungsmuster, wobei Harpin, nicht aber LPS eine HR induziert (Livaja *et al.*, 2008).

Eine erste Fragestellung an die Microarray-Daten war der Einfluss der Herabsetzung der OPDA- bzw. JA-Akkumulation auf die basale Genexpression in Kartoffelblättern. Da keine Daten für unbehandeltes Material zur Verfügung standen, wurde hierfür die Genexpression nach W2A-Kontrollinfiltration in den RNAi-Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen betrachtet. Dabei zeigten in allen drei Vergleichen insgesamt nur 131 Gene eine differentielle Expression (Vgl. Abb. C-13 B). Das heißt diese Gene wiesen in mindestens einem der Vergleiche „RNAi vs. WT“ eine signifikant ($p < 0,05$) dreifach stärkere oder schwächere Expression in den RNAi-Pflanzen im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen auf. Damit ließe sich ein relativ geringer Einfluss der RNAi-Konstrukte auf die basale Genexpression in Kartoffelblättern vermuten. Zudem sind mehr Gene in den RNAi-Pflanzen in ihrer Expression reduziert als induziert. Von diesen ist ein beträchtlicher Anteil der Kategorie der Verwundungs-Marker zuzuordnen (Howe, 2004), bei denen es sich z.B. um Protease-Inhibitoren, Polyphenoloxidasen, Polygalacturonasen oder eine Leucin-Aminopeptidase handelt. Man kann also vermuten, dass die Infiltration eine leichte Verwundungsantwort in den Blättern auslöst. Da diese großteils JA-abhängig ist (Howe, 2004; Devoto *et al.*, 2005), war eine veränderte Expression dieser Verwundungsmarker in den JA-defizienten und -insensitiven RNAi-Pflanzen zu erwarten gewesen. Daher diente die W2A-Kontrollbehandlung auch der Eliminierung dieser Verwundungsmarker-Gene aus der Gruppe der Pep-13-aktivierten Gene. Weiterhin befinden sich unter den Genen, die in den RNAi-Linien signifikant reduziert exprimiert werden, Gene des Octadecanoid-Weges, wie eine LOX und AOS2, und ebenfalls erwartungsgemäß, die Gene, deren Expression durch RNAi herabgesetzt werden sollte (s. Kap. C 1.5.1.1). Gene des Primärstoffwechsels oder allgemeine nicht

Stress-assoziierte Gene finden sich kaum in diesen Listen wieder, so dass eine deutliche Fehlregulation in der Physiologie der transgenen RNAi-Pflanzen nicht angenommen wird. Dies spiegelt sich auch in dem rein äußerlich, bis zu dem für die Experimente genutzten Wuchsstadium, unveränderten Phänotyp der RNAi-Pflanzen wider.

Pep-13 ist als Elicitor von Abwehrantworten in Pflanzen seit langem bekannt und es konnten in früheren Arbeiten bereits Pep-13-aktivierte Gene identifiziert werden, wie PR-Gene (*PRI*, *PR10*) oder Gene des Sekundärstoffwechsels (*PAL*, *4CL*, *CHS*) (Nürnberger *et al.*, 1994; Kirsch *et al.*, 2001; Brunner *et al.*, 2002; Halim *et al.*, 2004). Kürzlich veröffentlichte Daten belegen für Pep-13 in Petersilie eine in anderen Systemen ebenso beobachtete Überschneidung des Genexpressionsmusters mit dem Muster, das durch andere Elicitoren wie HrpZ1 hervorgerufen wird (Engelhardt *et al.*, 2009).

Die Microarray-Daten der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zur Analyse der Pep-13-induzierten Genexpression können zunächst genutzt werden, um weitere PAMP-responsive Gene in Kartoffel zu identifizieren. Im groben Überblick weisen die Daten Parallelen zu denen anderer Arbeitsgruppen auf (Navarro *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004; Thilmony *et al.*, 2006). So sind nach der Behandlung mit Pep-13 mehr Gene aktiviert als reprimiert (s. Abb. C-14 A). Unter den 848, in Wildtyp-Pflanzen mehr als dreifach aktivierten Genen sind zahlreiche als PR-Gene annotiert oder weisen Ähnlichkeit zu Rezeptor-Kinasen und Kinasen auf, die häufig eine Rolle in der Signalweiterleitung besitzen. Es könnte interessant sein, zu testen ob ein Teil dieser Gene in Kartoffel auch nach Behandlung mit anderen PAMPs wie flg22 aktiviert ist, und somit PAMP-responsive Gene darstellt, oder ob es sich um Gene handelt, die spezifisch durch Pep-13 reguliert werden. Ein Vergleich der elf26- und flg22-responsiven Genexpression in Arabidopsis ergab keine für einen der PAMPs spezifische Untergruppe (Zipfel *et al.*, 2006). Andererseits wurden im Vergleich zwischen Harpin- und LPS-induzierter Genexpression sowohl Gemeinsamkeiten wie in der Aktivierung von Signalkomponenten, als auch Unterschiede z.B. in der Expression von WRKY-Transkriptionsfaktoren beobachtet (Livaja *et al.*, 2008). Diese unterschiedlichen Daten können sich durch die verschiedenen betrachteten Zeitpunkte erklären: 30 und 60 Minuten für elf26/flg22 (Zipfel *et al.*, 2006) und bis zu 24 Stunden für Harpin/LPS (Livaja *et al.*, 2008). Die Transkriptakkumulation nach Harpin-Behandlung zum Zeitpunkt 30 min. zeigt Ähnlichkeiten zu dem Profil nach LPS-Behandlung zum Zeitpunkt 24 Stunden (Livaja *et al.*, 2008). Man kann daher vermuten, dass verschiedene PAMPs ein definiertes *Timing* der pflanzlichen Reaktion auslösen, was auch durch Genexpressionsdaten von flg22- bzw. OGA (Oligogalacturonid)-behandelten Arabidopsis-Pflanzen belegt werden könnte (Denoux *et al.*, 2008).

Unter den in Wildtyp-Kartoffeln durch Pep-13 aktivierten Genen befinden sich vermutlich Komponenten der Pep-13-Signalverarbeitung in Kartoffel. Zum Beispiel zeigen unter den mehr als dreifach hochregulierten Genen 16 die Annotation „Rezeptor-

ähnliche Kinase/Rezeptor Protein“ und ca. 30 eine Annotation als „Kinase“. Eine BLAST-Suche gegen *AtBAK1/SERK3* ergab zwei Gen-IDs, mit Sequenz-Ähnlichkeit zu diesem Gen, dessen Produkt an der Perzeption von flg22 und elf18 beteiligt ist (Chinchilla *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2007). Beide Gen-IDs gehören zum gleichen Gen und zeigen eine drei- bzw. vier-fache Aktivierung nach Pep-13-Behandlung, so dass es sich hierbei um das Kartoffel-Homologe zu *AtBAK1/SERK3* handeln könnte. Es wäre interessant zu klären, ob auch die Erkennung von Pep-13 von einem Rezeptor-Komplex, an dem BAK1 beteiligt ist, abhängt.

Weiterhin ist die Frage offen, welche Signale die Pep-13-ausgelöste HR vermitteln. Auch hierzu können die Genlisten nach Kandidaten durchmustert werden. So ist mit einem HIN1-ähnlichen Gen ein HR-Markergen unter den nach Pep-13-Behandlung im Wildtyp hochregulierten Genen. Eine Studie in Arabidopsis zur vergleichenden Genexpression nach Behandlung mit dem HR-induzierenden Harpin und LPS, das keine HR induziert, ergab Unterschiede in der Genexpression einiger ROS-assoziiierter Gene, von denen vermutet wird, dass ihnen eine Funktion in der Ausbildung der HR zukommt (Livaja *et al.*, 2008). Diese Gene wurden jedoch unter den Pep-13-responsiven nicht detektiert. Da die ROS-assoziierten Gene in der Arbeit von Livaja *et al.* (2008) zum Zeitpunkt eine bzw. vier Stunden nach Behandlung aktiviert waren und in den Experimenten dieser Arbeit der acht-Stunden-Zeitpunkt betrachtet wurde, kann eine Pep-13-Responsivität solcher Gene zu früheren Zeitpunkten nicht ausgeschlossen werden. In Arabidopsis wurde die Genexpression nach flg22-Behandlung und Behandlung mit einem HR-induzierenden Elicitor, dem Nep1 (engl. *necrosis and ethylene-inducing peptide1*)-ähnlichen Protein NLP_{Pp} verglichen. Diese Analyse ergab ebenfalls ein zum Teil überlappendes und zum Teil spezifisches Genexpressionsmuster (Qutob *et al.*, 2006). Dabei können unter den ca. 300 spezifisch NLP_{Pp}-responsiven Genen, solche vermutet werden, die an der HR-Auslösung beteiligt sind (Qutob *et al.*, 2006). Andererseits wurde in *N*-Gen-tragenden Tabak-Pflanzen die Aktivierung einer vakuolären Protease während der TMV-induzierten HR nachgewiesen (Hatsugai *et al.*, 2004). Daraufhin wurde die Hypothese formuliert, dass die HR unabhängig von Änderungen der Genexpression abläuft (Desaki *et al.*, 2006) und dass während der HR zwei separate Wege zum einen zum programmierten Zelltod und zum anderen zur induzierten Expression von Abwehrgenen führen (Hatsugai *et al.*, 2004).

Das eigentliche Hauptanliegen der Analyse der Microarray-Daten war in der vorliegenden Arbeit die Identifizierung von Genen, die nach Pep-13-Behandlung Oxylin-abhängig reguliert werden. Hierzu wurden die Gene, die in Wildtyp-Pflanzen durch Pep-13-Infiltration mehr als dreifach differentiell exprimiert werden mit den in den RNAi-Linien differentiell regulierten verglichen (s. Abb. C-14 B). Dabei zeigte sich, dass

jeweils ein großer Teil der in Wildtyp-Pflanzen signifikant regulierten Gene in den einzelnen RNAi-Linien nicht signifikant differentiell exprimiert werden. Zunächst wurden Gene betrachtet, die in allen drei RNAi-Linien nicht mehr signifikant reguliert werden, da von diesen insgesamt 492 Genen (s. Abb C-15) eine JA-abhängige Regulation via COI1 angenommen werden kann. Unter diesen Genen befinden sich auch *StPIN2* und *StCAO*, deren differentielle Expression in den RNAi-Linien bereits nachgewiesen worden war (vgl. Abb. C-12). Weiterhin gehören zu den am stärksten differentiell regulierten Genen ein ChitinaseB-Gen und *StPR5*. Für letzteres konnte in Northern-Analysen 24 Stunden nach Pep-13-Behandlung keine differentielle Expression detektiert werden (vgl. Abb. C-12). In den Microarray-Daten zum 8-Stunden-Zeitpunkt zeigte dieses Gen eine ca. 20-fache Induktion in den RNAi-Linien (mit $p > 0,05$) im Vergleich zu einer ca. 80-fachen Induktion im Wildtyp ($p < 0,05$) und somit eine schwach reduzierte Expression. Neben diesen Abwehr-Genen sind in der Liste der differentiell exprimierten Gene auch einige Gene mit der Annotation „WRKY-Transkriptionsfaktor“, „Transkriptionsfaktor“, „Kinase“ und eine ACC-Synthase zu finden, die eine putative Funktion in der Signalweiterleitung unterhalb von JA besitzen könnten.

Aus dieser Liste wurden interessante Kandidaten ausgewählt (s. Tabelle C-1) und weiter analysiert. Mit Ausnahme des putativen transkriptionellen Regulators *StTUBBY* zeigt keines der ausgewählten Kandidaten eine basale Expression in Blättern. Das heißt, alle werden erst auf den Stimulus Pep-13-Behandlung aktiviert (s. Abb. C-18). Des Weiteren sind einige dieser Gene Wund-responsiv, wobei die Wund-induzierte Expression meist zum Zeitpunkt acht Stunden wieder abgeklungen ist (s. Abb. C-18).

Für das Kandidatengen *StUBOX* ergibt eine BLASTX-Suche (www.ncbi.nlm.nih.gov) Sequenzhomologien zu zahlreichen U-Box- und ARMADILLO-Domänen enthaltenen E3-Ligasen, auch wenn die translatierte Sequenz dieses ESTs keine dieser Domänen aufweist. In der Liste der ähnlichen Gene finden sich auch das *SlCMPG1*, sowie die Gene *ACRE74* und *ACRE276* aus Tabak. In Petersilie wurde das *PcCMPG1* als eines der frühesten Pep-13-responsiven Gene beschrieben (Kirsch *et al.*, 2001). *CMPG1* aus *N. benthamiana* konnte als Interaktor des AVR3a aus *P. infestans* identifiziert werden (Birch *et al.*, 2009). Dieser Effektor ist in der Lage die INF1-induzierte HR zu inhibieren, ein Prozess, in den die *CMPG1*-kodierte E3-Ligase möglicherweise involviert ist (Bos *et al.*, 2006; Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2006; Birch *et al.*, 2009). *ACRE74* wurde mit dem Nachweis sowohl der E3-Ligase-Aktivität *in vitro*, als auch der Beteiligung an Abwehrantworten, wie der INF1-vermittelten HR in *NtCMPG1* umbenannt (Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2006). Die zentrale Rolle der U-Box-Proteine und des 26S-Proteasom-Weges in der PTI zeigt sich weiterhin an verschiedenen Genexpressionsstudien, in denen die Gene der U-Box-Proteine oder auch anderer Ubiquitin-E3-Ligasen PAMP-responsiv reagieren (Navarro *et al.*, 2004; Ramonell *et al.*, 2005; Thilmony *et al.*, 2006; Libault *et al.*, 2007).

Das als transkriptioneller Regulator annotierte *StTUBBY* weist starke Homologie zu *AtTLP8* auf, einem TUB-ähnlichen Gen aus Arabidopsis. Diese Genfamilie besitzt in Arabidopsis 11 annotierte Mitglieder, von denen alle bis auf *AtTLP8* eine F-Box-Domäne zusätzlich zur C-terminal konservierten Tubby-Domäne tragen (Lai *et al.*, 2004). Für die meisten der in Reis beschriebenen 14 TLPs wurde ebenfalls eine F-Box-Domäne nachgewiesen (Kou *et al.*, 2009). Eine Induktion dieser TLPs nach *Xanthomonas*-Infektion, ebenso wie die Wund-responsive Akkumulation vieler TLP-Transkripte (Kou *et al.*, 2009) gibt erste Hinweise auf die Beteiligung dieser Proteine an Stress-Antworten. Das Pep-13-responsive Kandidatengen *StTUBBY* ist in Kartoffel nicht oder nur schwach durch Verwundung induzierbar (vgl. Abb. C-18 B) und zeigt in einem ersten Experiment keine Aktivierung nach *Phytophthora*-Infektion (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der translatierten *StTUBBY*-Sequenz ergab das Vorhandensein der Tubby-Domäne sowie eines nukleären Lokalisierungssignals (NLS), während eine F-Box-Domäne nicht enthalten ist (www.ncbi.nlm.nih.gov). Da mit den POCI-Sequenzen meist nur unvollständige ESTs vorliegen, könnte dieses Gen dennoch eine F-Box besitzen. Für das Maus-Protein Tubby wurde nach Struktur-Aufklärung ein Model erstellt, nach dem das Protein im inaktiven Zustand Plasmamembran-gebunden vorliegt und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat bindet. Nach Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Hydrolyse durch eine G-Protein-aktivierte PLC wird Tubby in den Kern verlagert, wo es möglicherweise in die Regulation der Genexpression eingreift (Santagata *et al.*, 2001).

Ein weiterer möglicher Kandidat, der an der transkriptionellen Aktivierung beteiligt sein könnte ist *StAP2TF*. AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren sind typische Komponenten in der JA-vermittelten Genexpression, sowohl nach Verwundung, als auch in der Pathogenabwehr (Cheong *et al.*, 2002; Lorenzo *et al.*, 2003; McGrath *et al.*, 2005; Pre *et al.*, 2008). Sie binden über die AP2/ERF-Domäne die GCC-Box in ET/JA-responsiven Genen (Brown *et al.*, 2003). In der Sequenz des Kandidatengens wurden zwei AP2/ERF-Domänen identifiziert. Im Allgemeinen besitzen ERF-Transkriptionsfaktoren, die an der Stress-Antwort beteiligt sind, eine AP2/ERF-Domäne, während die in der pflanzlichen Entwicklung beteiligten AP2-Transkriptionsfaktoren zwei dieser Domänen aufweisen. Innerhalb der Experimente dieser Arbeit zeigt *StAP2TF* eine deutliche Transkriptakkumulation nach Pep-13-Behandlung (Vgl. Abb. C-16 und C-17 A). aber auch in Blüten von Kartoffelpflanzen (s. Abb. C-18 A). Dies könnte auf eine zusätzliche Funktion in der Blüten-Entwicklung hinweisen. Andererseits sind Abwehrgene häufig in Blüten exprimiert, um dieses Gewebe vor Fraß-Feinden zu schützen (Gonzalez-Teuber *et al.*, 2009).

Neben den klassischen Transkriptionsfaktoren existiert mit der Ebene der Chromatin-Remodulierungen eine weitere Möglichkeit der transkriptionellen Regulation. Nach einem Model aus tierischen Systemen erlaubt die von Histon-Acetyltransferasen katalysierte Acetylierung der Histone den Übergang des Chromatins in einen

permissivem Zustand, der dann die Umstrukturierung durch ATP-abhängige Nucleosomen-Remodelierungskomplexe gestattet. Dadurch wird die Zugänglichkeit der DNA für regulatorische Proteine erhöht (Eberharter und Becker, 2002; Chinnusamy und Zhu, 2009). Eine Histon-Deacetylase wurde beispielsweise von Devoto *et al.* (2002) als mögliches Ziel des COII-vermittelten Protein-Abbaus identifiziert, womit eine Regulation der JA-Antwort ermöglicht werden könnte. Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von Chromatin-Struktur-Änderungen an Stress-Antworten ergaben Arbeiten an *AtSYD*, einer Chromatin-remodelierenden ATPase (Walley *et al.*, 2008). Für *AtSYD* wurde eine Funktion in der Resistenz gegen *B. cinerea* unterhalb von JA und ET nachgewiesen (Walley *et al.*, 2008). Unter diesem Aspekt ist das Gen *StMYST1* mit Homologie zu einer Histon-Acetyltransferase ein interessanter Kandidat für die Aufklärung der Pep-13-induzierten Abwehrantworten. Zwar ist dieses Gen in Wildtyp-Pflanzen durch Pep-13 aktiviert doch konnten qRT-PCR-Analysen die aus den Microarray-Daten abgeleitete JA-abhängige Transkriptakkumulation von *StMYST1* bisher nicht bestätigen.

Die putative MAPK-Kinase-Kinase *StMAPKKK* weist eine sehr frühe Wund-responsive und ebenso eine spätere Pep-13-responsive Transkriptakkumulation auf, deren JA-Abhängigkeit aber wiederum in qRT-PCR-Experimenten nicht bestätigt werden konnte. Zahlreiche Arbeiten belegen die Beteiligung von MAPK-Kaskaden an der Signalweiterleitung in der pflanzlichen Abwehr (Colcombet und Hirt, 2008). Speziell wurde in Tomate die Funktion einer MAPK-Kinase-Kinase als positiver Regulator der Zelltod-Reaktion sowohl nach Infektion mit avirulenten als auch virulenten Pathogenen nachgewiesen (del Pozo *et al.*, 2004). Unterhalb der dort untersuchten *SlMAPKKK α* fungiert u.a. SIPK, für die bereits eine Funktion in der HR-Ausbildung postuliert wurde (Zhang *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2007).

StABC ist ein Vertreter der *ATP-binding-cassette* (ABC)-Superfamilie von Membran-lokalisierten Transportern, die den Energiegewinn der ATP-Hydrolyse für den Transport von Substraten über eine Membran nutzen. In der Regel besitzen diese Proteine zusätzlich zu der auch in der Sequenz des *StABC* vorliegenden ABC-Domäne, eine Transmembrandomäne. Eine solche kann in der POCI-Sequenz nicht detektiert werden, die jedoch nicht die vollständige Gensequenz umfasst. In der Pathogenabwehr sind Sekretionsmechanismen am gerichteten Transport von Zellwand-lokalisierten Proteinen oder phenolischen Substanzen beteiligt, die der Verstärkung der Zellwand dienen (Kwon *et al.*, 2008). Viele Komponenten dieser Sekretions-Prozesse sind auch durch PAMPs aktivierbar (Thilmony *et al.*, 2006). So ist beispielsweise der Arabidopsis ABC-Transporter PEN3/PDR8 an der Nichtwirts-Resistenz gegen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Erysiphe pisi* und *P. infestans* beteiligt (Stein *et al.*, 2006) und transportiert vermutlich antifungale Glucosinolat-Abbauprodukte in den Apoplasten (Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009). Ein weiterer ABC-Transporter, *NtPDR1* ist, ähnlich wie das

Kandidatengen *StABC* sehr schnell und deutlich nach PAMP-Behandlung aktiviert (Sasabe *et al.*, 2002). *StABC* weist in Blättern keine basale Expression auf, zeigt aber eine Expression in Wurzel und Blüten, wie auch das *Nicotiana plumbaginifolia PDR1* (Stukkens *et al.*, 2005). RNAi-vermitteltes *Silencing* des Np*PDR1* führt zu einer erhöhten Sensitivität gegen *B. cinerea* (Stukkens *et al.*, 2005), womit die Funktion von ABC-Transportern in der pflanzlichen Abwehr weiter untermauert wird.

Mit *StJAZ* wurde für die weiteren Analysen der Pep-13-Antwort ein Kandidatengen gewählt, das starke Homologie zu *AtJAZ8/TIFY5a* aus *Arabidopsis* aufweist. JAZ-Proteine sind in *Arabidopsis* und Tomate als negative Regulatoren der JA-vermittelten Antworten charakterisiert worden und bilden zusammen mit *StCOI1* einen putativen Rezeptorkomplex für das bioaktive JA-Ile aus (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Browse, 2008; Katsir *et al.*, 2008b; Fonseca *et al.*, 2009). Da in *Arabidopsis* 12 Mitglieder dieser Genfamilie vorliegen (Vanholme *et al.*, 2007), wurden Southern-Analysen in Kartoffel durchgeführt, die das Vorhandensein mehrerer homologer Gene des *StJAZ* auch in Kartoffel vermuten lassen (Vgl. Abb. C-19). Das *AtJAZ8/TIFY5a* zeigt eine Expression in Wurzeln und ist, wie die meisten dieser Gene, durch MeJA-Behandlung und Verwundung COI1-abhängig aktivierbar (Thines *et al.*, 2007; Vanholme *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2008). Auch *StJAZ* weist eine Expression nach Verwundung, sowie eine noch zu bestätigende Expression in Wurzeln und Blüten auf (s. Abb. C-18 A und B). Ein weiterer JAZ-ähnlicher EST zeigt in den Microarray-Daten ebenfalls eine Aktivierung durch Pep-13, ist aber in den RNAi-Pflanzen nicht reduziert. Neben der Funktion der JAZ-Proteine im JA-Signalweg wurde mit dem NbPPS3 ein ZIM-Domänen-Protein (entspricht der TIFY-Domäne, (Vanholme *et al.*, 2007)) identifiziert, das ein Zielprotein einer MAPK ist (Katou *et al.*, 2005). *Silencing* des *PPS3* führt zu einer reduzierten HR-Antwort nach Expression einer konstitutiv aktiven MAPK (Katou *et al.*, 2005). Da *StJAZ* keine Ähnlichkeit zu dem *PPS3* aufweist, stellt es vermutlich kein MAPK-Substrat dar, sondern spielt eher im JA-induzierten Signalweg unterhalb der Pep-13-Erkennung eine Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des *StJAZ* in Kartoffeln mittels RNAi herabgesetzt. Erste Untersuchungen ergaben dabei keinen veränderten Phänotyp der RNAi-Pflanzen nach Pep-13-Behandlung (s. Abb. C-20). Möglicherweise reicht das *Silencing*-Level in den RNAi-Pflanzen nicht aus, um einen Effekt zu erzielen. Andererseits haben auch andere Arbeitsgruppen in JAZ-T-DNA-Insertions-Linien keine, für JA-Signalweg-Mutanten charakteristischen, phänotypischen Veränderungen beobachten können (Thines *et al.*, 2007). Es wurde daher vorgeschlagen, dass die JAZ-Proteine überlappende Funktionen besitzen (Thines *et al.*, 2007) und mit dem Nachweis, dass JAZ-Proteine multiple Homo- und Heterodimere bilden können, scheint sich ein komplexes Regulationsmuster abzuzeichnen (Chung und Howe, 2009). Die Strategie des RNAi-vermittelten *knock-down* der Genexpression kann genutzt werden, um auch sehr

ähnliche Homologe einer Genfamilie auszuschalten (Kusaba *et al.*, 2003; Kusaba, 2004). Für *AtJAZ1* wurde beispielsweise eine *knock-down*-Linie hergestellt, die sich durch Hypersensitivität gegenüber JA auszeichnet (Grunewald *et al.*, 2009), auch wenn nicht klar ist, ob in dieser Linie ein *Silencing* von weiteren *JAZ*-Homologen erfolgte. Ein verstärkte Antwort auf den Pep-13-Stimulus wurde aber in dem ersten durchgeführten Experiment mit den *StJAZ*-RNAi-Linien ebenfalls nicht beobachtet. Für die Regulation der JA-Antwort ist die C-terminale Jas-Domäne der *JAZ*-Proteine essentiell. Der Verlust dieser Domäne führt zu einem Verlust der JA-Ile-vermittelten Interaktion mit COI1, wodurch ein JA-Ile-induzierter Abbau und die De-Reprimierung der JA-responsiven Transkriptionsfaktoren verhindert wird (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Browse, 2008; Melotto *et al.*, 2008). Um eine mögliche Funktion des *StJAZ* im Pep-13-induzierten Signalweg weiter zu untersuchen, könnte daher versucht werden, mittels gerichteter Mutagenese ein Konstrukt des *StJAZ* herzustellen, das in den zwei für die COI1-Bindung essentiellen Aminosäuren der Jas-Domäne (Melotto *et al.*, 2008) verändert ist. Eine Expression dieses Konstruktes könnte möglicherweise klären, ob *StJAZ* tatsächlich ein Teil der Pep-13-induzierten JA-Antwort in Kartoffel ist.

Die funktionelle Analyse dieser möglichen Kandidatengene könnte die weitere Aufklärung des Signalweges unterhalb von JA erlauben. Zusätzlich zeigt der Vergleich der Pep-13-induzierten Genexpression in Wildtyp-Pflanzen und JA-defizienten RNAi-Pflanzen, dass zahlreiche Gene unabhängig von JA reguliert werden. Dies war zu erwarten, denn JA akkumuliert im Pep-13-Signalweg unterhalb der SA-Akkumulation (Halim, 2006). Es könnte spekuliert werden, dass in den *NahG*-exprimierenden Kartoffelpflanzen die Expression der JA-regulierten Gene ebenfalls reduziert ist. Diese Hypothese bestätigte sich in einem ersten Experiment für *StJAZ*, *StAP2TF* und *StABC* (Daten nicht gezeigt). Zudem haben frühere Arbeiten eine Aktivierung von Abwehrgenen unabhängig von der SA-Akkumulation belegt (Halim *et al.*, 2004), so dass weitere Signale, wie z.B. MAPK-Kaskaden oder ET in der Pep-13-Antwort vermutet werden können (vgl. Abb. D-2). Ein Vergleich der Pep-13-responsiven globalen Genexpression in Wildtyp-Pflanzen mit der in SA-defizienten Pflanzen würde es ermöglichen, den Anteil des SA-Weges an den Pep-13-induzierten transkriptionellen Änderungen festzustellen.

Ein anderer möglicher Ansatzpunkt für weitergehende Analysen ist die Untersuchung weiterer Regulationsgruppen, die aus den Microarray-Analysen erhalten wurden (Vgl. Abb. C-15). Unter diesen befindet sich z.B. eine Gruppe von 127 Genen mit einem postulierten OPDA-abhängigen COI1-unabhängigen Expressionsprofil und weiterhin 131 Gene, deren Expression OPDA-abhängig via COI1 reguliert werden sollte (s. Abb. D-2). Eine Funktion von OPDA als Signal wurde bereits in *Escholtzia californica*-Zellkulturen ermittelt, in denen OPDA unabhängig von JA den Alkaloid-Syntheseweg stimulieren kann (Blechert *et al.*, 1995). In Arabidopsis führt exogene

Applikation von OPDA zu einer Induktion von einem Set von ORGs (*OPDA-specific response genes*) (Taki *et al.*, 2005), die scheinbar unabhängig von COI1 reguliert werden. Dabei wurde innerhalb der dortigen Arbeiten nur ein ausgewähltes Set von sechs Genen auf die Expression in *coil*-Mutanten nach OPDA-Behandlung untersucht (Taki *et al.*, 2005). Daher könnte die Möglichkeit bestehen, dass von den insgesamt 214 identifizierten ORGs (Taki *et al.*, 2005) ein Teil auch COI1-abhängig reguliert wird, so wie dies für das Arabidopsis *PHO1;H10* gezeigt wurde (Ribot *et al.*, 2008). Allerdings waren bisher alle Versuche ergebnislos, einen JAZ-COI1-Rezeptorkomplex für OPDA zu identifizieren (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2008), und es bleibt weiterhin unklar, wie OPDA in der Pflanze perzipiert wird. Eine Möglichkeit könnte in einem COI1-Komplex mit weiteren, noch unidentifizierten Repressorproteinen liegen. Zum Beispiel kann hierfür das Moos *Physcomitrella patens* als Untersuchungsobjekt dienen, in dem ausschließlich OPDA und OPDA-Ile vorkommen und das zudem sechs *COI1*-Homologe besitzt (Browse, 2008). Daneben existiert als weitere Hypothese die Signalwirkung von OPDA als RES (*reactive electrophile species*) (Farmer und Davoine, 2007). RES sind in der Lage Thiolgruppen von Proteinen direkt zu modifizieren oder werden von Detoxifikationsenzymen umgesetzt. So wurden OPDA-Glutathion-Konjugate in *P. syringae*-infiltrierten Arabidopsis-Blättern detektiert (Mueller *et al.*, 2008a). Ca. ein Drittel der OPDA-regulierten Gene zeigt in Arabidopsis außerdem eine Abhängigkeit von den Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 (Mueller *et al.*, 2008a), die auch in der Redox-Status-vermittelten SA-NPR1-Signalkaskade eine Rolle spielen. Sehr spekulativ könnte vielleicht auch ein COI1-Repressorprotein-Komplex für OPDA-Glutathionkonjugate existieren.

Weiterhin ergaben die Microarray-Analysen der vorliegenden Arbeit eine Gruppe von 210 JA-abhängig exprimierten Genen (Vgl. Abb. C-15), für die eine COI1-unabhängige Regulation postuliert wurde (s. Abb. D-2). Da die Arbeiten anderer Gruppen bisher für alle MeJA-responsiven Gene eine sehr strikte Abhängigkeit von dem F-Box-Protein COI1 nachgewiesen haben (Devoto *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004b), müßte dieses Expressionsprofil zunächst verifiziert und seine biologische Relevanz anschließend weiter untersucht werden. Es wäre möglich, dass die exogene Gabe von MeJA in den Analysen die andere Gruppen durchgeführt haben, nicht die in der Zelle nach einem Stress-Stimulus ablaufenden Signalwege wiedergibt. Andererseits ist vielleicht ein zu niedriges *Silencing*-Level in den in dieser Arbeit verwendeten RNAi-Pflanzen der Grund für die Detektion dieses Expressionsmusters, denn in den anderen Arbeiten wurden *knock out*-Mutanten von COI1 genutzt.

Abschließend sollte nicht vergessen werden, dass zwar „*Transcriptomics*“ die Möglichkeit bieten, einen globalen Überblick über Expressionsänderungen vieler Gene zu erhalten, aber die Expressionsprofile interessanter Kandidaten im Einzelnen stets verifiziert werden müssen, um Falsch-Positive auszuschließen. Außerdem besitzt die

Pflanze neben der aktivierten Transkription von Genen weitere Ebenen der post-transkriptionellen und post-translationellen Regulation, die vielfältige Anpassungen und ein „fine-tuning“ der Antwort an Stress-Situationen ermöglichen. So kann beispielsweise die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren durch PAMP-induzierte MAPKs eine Änderung der Genexpression herbeiführen (Bethke *et al.*, 2009). Gleichzeitig könnte die Aktivität von Enzymen aber auch direkt durch Phosphorylierung z.B. katalysiert durch PAMP-aktivierte MAPKs, reguliert werden (Benschop *et al.*, 2007). Diese Beispiele der PAMP-induzierten Reaktionen sind ein guter Beleg für die komplexen Signalnetzwerke, die in der pflanzlichen Zelle ablaufen, um eine bestmögliche Adaptation an sich verändernde Umweltbedingungen zu erreichen.

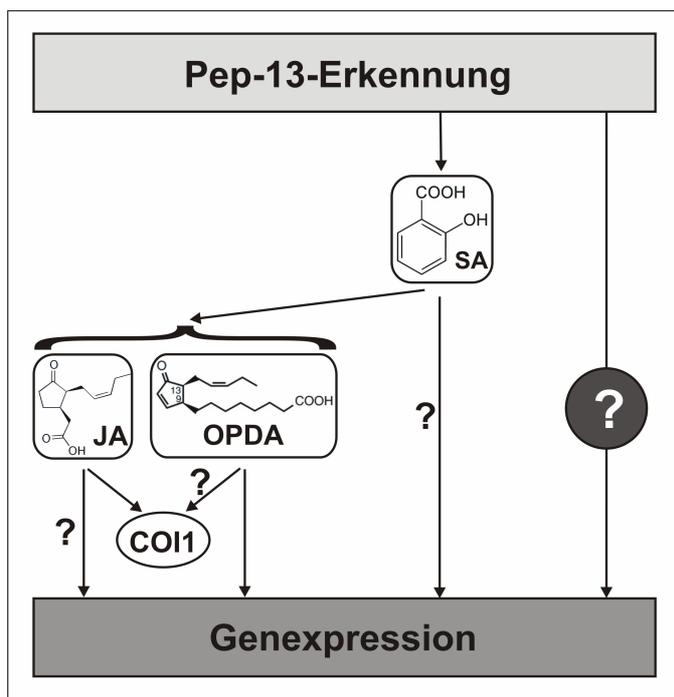


Abb. D-2: Modell der Pep-13-responsiven Genexpression

Auf der Basis der Microarray-Daten (s. B 1.5 und D 1.3) werden mögliche Signalwege aufgeführt, die bei der Vermittlung der Pep-13-induzierten Genexpression eine Rolle spielen könnten. Aus Literatur-Daten ist bekannt, dass Pep-13 in Kartoffel eine SA-unabhängige Genexpression vermitteln kann (Halim *et al.*, 2004) – der genaue Signalweg ist jedoch unbekannt (weißes Fragezeichen).

In den Analysen dieser Arbeit wurden Gene identifiziert, die JA-abhängig aber COI1-unabhängig bzw. OPDA-abhängig via COI1 exprimiert werden. Dafür existieren derzeit keine Beispiele aus der Literatur, so dass diese Wege als Hypothesen aufgestellt wurden und mit einem Fragezeichen markiert sind. Weiterhin könnte vermutet werden, dass ein Teil der SA-abhängigen Gene unabhängig von OPDA, JA oder COI1 exprimiert wird, da auch der Phänotyp in den JA-defizienten bzw. –insensitiven RNAi-Linien schwächer ist als in NahG-exprimierenden Pflanzen (Halim *et al.*, 2009). Auch dieser hypothetische Signalweg ist daher mit einem Fragezeichen markiert.

1.4 Das Zusammenspiel von SA und JA in der Pep-13-Antwort

SA und JA sind als Signalmoleküle an der Steuerung von pflanzlichen Abwehrantworten beteiligt. Nach einem generell akzeptierten Modell sind dabei SA-vermittelte Antworten für die Reaktion auf biotrophe Pathogene verantwortlich, während JA-vermittelte Abwehrantworten, meist in Zusammenarbeit mit ET, die Abwehr gegen nekrotrophe

Pathogene vermitteln. Für *Arabidopsis* wird häufig eine antagonistische Wechselwirkung dieser beiden Phytohormone beobachtet (Thomma *et al.*, 1998; Glazebrook, 2005; Spoel und Dong, 2008). Dieses Modell wird dadurch gestützt, dass einige Pathogene mit Hilfe von Effektoren oder Phytohormon-ähnlichen Molekülen in die Hormonsignalgebung der Pflanzen eingreifen und zu ihren Gunsten verändern können, um die Suszeptibilität zu fördern (Bari und Jones, 2009; Pieterse *et al.*, 2009). In *Arabidopsis* dient beispielsweise das bakterielle Phytotoxin COR aus *Pst* DC3000 der Induktion des pflanzlichen JA-Weges via COI1, wobei ca. 35% der MeJA-induzierbaren Gene auch von COR induziert werden (Zhao *et al.*, 2003; Uppalapati *et al.*, 2005; Katsir *et al.*, 2008b). Als Folge der Aktivierung des JA-Weges wird der SA-Weg reprimiert, wodurch das Wachstum der Bakterien gefördert wird (Kloek *et al.*, 2001; Uppalapati *et al.*, 2007). Zusätzlich zur Suppression des SA-Weges scheint COR weitere SA-unabhängige Virulenzmechanismen innezuhaben (Block *et al.*, 2005; Uppalapati *et al.*, 2007).

Der antagonistische *Cross-Talk* zwischen SA und JA in *Arabidopsis* ist auf molekularer Ebene durch einen gegensätzlichen Einfluss verschiedener Komponenten des SA-Weges auf den JA-Weg gekennzeichnet. WRKY70 beispielsweise ist ein Transkriptionsfaktor und positiver Regulator der SA-Antwort unterhalb von NPR1. *Arabidopsis*-Pflanzen, die WRKY70 überexprimieren zeigen konstitutive SA-Antworten, die mit erhöhter Resistenz gegen das biotrophe Pathogen *Erysiphe cichoracearum* und eingeschränkter Resistenz gegen das nekrotrophe Pathogen *A. brassicicola* einhergeht (Li *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2006). Dagegen sind *Arabidopsis*-Pflanzen mit supprimierter WRKY70-Expression resistenter gegen *A. brassicicola* (Li *et al.*, 2006). Umgekehrt ist die MAPK MPK4 ein positiver Regulator des JA-Signalweges und negativer Regulator der SA-Antworten, so dass *mpk4*-*Arabidopsis* suszeptibler auf *A. brassicicola*-Infektion reagieren und resistenter gegenüber *P. syringae*-Infektion sind (Petersen *et al.*, 2000; Brodersen *et al.*, 2006). Ein zentraler Regulator der SA-Antworten in *Arabidopsis* ist NPR1, das nach SA-reduzierten Redoxpotential-Änderungen zusammen mit TGA-Transkriptionsfaktoren und dem GRX 480 die SA-Antworten vermittelt (Mou *et al.*, 2003; Spoel *et al.*, 2003; Ndamukong *et al.*, 2007). In *npr1*-*Arabidopsis*-Pflanzen ist die SA-vermittelte Inhibierung der JA-Antwort aufgehoben und *Arabidopsis*-Pflanzen, die GRX 480 überexprimieren zeigen reduzierte PDF1.2-Expression (Spoel *et al.*, 2003; Ndamukong *et al.*, 2007). Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Signalkomponenten ebenso den SA/JA-Antagonismus in *Arabidopsis* regulieren. Als möglicher Mechanismus dieser Regulation wird eine Änderung des Redoxstatus der Zelle diskutiert. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die Suppression der MeJA-induzierten PDF1.2-Expression durch SA mit einem Anstieg des Glutathion-Levels korreliert (Koornneef *et al.*, 2008).

Andererseits ist NPR1 auch in die Ausbildung der JA/ET-abhängigen ISR involviert (Pieterse 1998), wobei diese Funktion des NPR1, ebenso wie die

Supprimierung der JA-Antwort durch SA von einem cytosolischen Pool des NPR1 ausgeübt wird (Glazebrook *et al.*, 2003; Spoel *et al.*, 2003). Die Kernlokalisierung des NPR1 wird durch Ubiquitinierung reguliert, die damit ebenso einen Einfluss auf den SA/JA-Cross-Talk haben könnte (Spoel *et al.*, 2009).

Eine Untersuchung der Akkumulation von SA, JA und ET in verschiedenen Interaktionen ergab eine große Spezifität in Abhängigkeit vom jeweiligen Pathogen (*P. syringae*, *A. brassicicola*, *Pieris rapae*, *Frankliniella occidentalis*) (De Vos *et al.*, 2005). Diese charakteristische Signal-Signatur resultierte in einem spezifischen Genexpressionsprofil, wobei allgemeine Stress- und Abwehr-assoziierte Gene von allen Angreifern aktiviert wurden (De Vos *et al.*, 2005). Spezifische Interaktionen dieser Signalmoleküle, die Menge und der zeitliche Rahmen ihrer Akkumulation in Abhängigkeit der jeweiligen Angreifer könnten das Ergebnis der Abwehrantworten beeinflussen (De Vos *et al.*, 2005). Ebenso könnte vermutet werden, dass Untersuchungen an anderen Pflanzenspezies abweichende Modelle für die Interaktion der Signale SA und JA aufdecken. Die meisten der bisherigen Ergebnisse wurden durch Analyse von Interaktionen zwischen Arabidopsis und einer geringen Anzahl von Pathogenen erhalten, die das Bild der möglichen Interaktionen beschränken könnten (Adie *et al.*, 2007).

Die gemeinsame Wirkungsweise von SA und JA innerhalb einer Signalkaskade, die in der Pep-13-Antwort der Kartoffel beobachtet werden kann, steht im Gegensatz zu der häufig in Arabidopsis beobachteten antagonistischen Wirkungsweise von SA und JA. In der Pep-13-induzierten Abwehr der Kartoffel akkumuliert SA ca. nach sechs Stunden, während eine deutliche Akkumulation von OPDA und JA erst zu späteren Zeitpunkten erfolgt (s. Abb. C-1 und C-2). Die JA-defizienten RNAi-Pflanzen sind in der Lage SA zu akkumulieren wohingegen die JA-Akkumulation in *NahG*-exprimierenden Kartoffelpflanzen inhibiert ist (Halim *et al.*, 2004; Halim, 2006). Diese Wirkungsweise von SA und JA innerhalb eines Signalweges könnte als ein Modellsystem für weitere Studien möglicher Wechselwirkungen von Signalen in Pflanzen dienen.

Auch in anderen Modellen konnte eine nicht-antagonistische Wirkung von SA und JA nachgewiesen werden. In Tabak beispielsweise führt eine Infektion mit avirulenten *P. syringae* pv. *phaseolicola*-Bakterien zu gleichzeitiger Akkumulation von SA und JA (Mur *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den *NahG*-exprimierenden Kartoffelpflanzen, die eine Reduktion der JA-Level aufweisen (Halim *et al.*, 2004), resultiert die Expression einer Salizylhydroxylase in Tabak und entsprechende Reduktion der SA-Level nicht in einer verminderten JA-Akkumulation (Mur *et al.*, 2006). In der kompatiblen Interaktion von Tomate mit *X. campestris* pv. *vesicatoria* wird eine sequentielle Wirkung von JA, ET und SA in der Entwicklung von Krankheitssymptomen beobachtet (O'Donnell *et al.*, 2003b). In Arabidopsis akkumulieren nach Infektion mit virulenten *X. campestris* pv. *campestris* ebenso JA, ET und SA, aber in diesem System liegt SA oberhalb von ET

(O'Donnell *et al.*, 2003a). Die Behandlung von Arabidopsis-Pflanzen mit avirulenten Bakterien löst eine SA-abhängige systemische erworbene Resistenz (SAR) aus, während die Behandlung mit einigen nicht-pathogenen Rhizobakterien eine JA/ET-abhängige induzierte systemische Resistenz (ISR) hervorruft (Van der Ent *et al.*, 2009). Van Wees und Mitarbeiter (van Wees *et al.*, 2000) konnten nachweisen, dass die gleichzeitige Induktion beider Wege in Arabidopsis zu einer synergistischen Erhöhung der Resistenz gegen nachfolgende *Pst*-Infektion führt und nicht zu der erwarteten antagonistischen Wechselwirkung beider Signal-Wege. Auch in der Vermittlung der Antwort von Arabidopsis auf Hitzestress spielen sowohl SA als auch JA eine Rolle (Clarke *et al.*, 2009). Microarray-Studien zur Untersuchung der Antwort von Arabidopsis auf exogene Behandlung mit SA oder MeJA konnten zudem eine Gruppe von Genen identifizieren, die in Arabidopsis durch diese beiden Substanzen co-reguliert werden (Schenk *et al.*, 2000). Damit finden sich in der Literatur Beispiele, die neben dem Antagonismus weitere Möglichkeiten des *Cross-Talks* zwischen den Signalmolekülen SA und JA aufweisen. Zusätzlich zeigen Studien in Arabidopsis eine Abhängigkeit der antagonistischen Wechselwirkung von räumlichen Faktoren. Infektion mit hemibiotrophen *P. syringae*-Bakterien führte zu einer Induktion des SA-Weges und damit aufgrund einer Reprimierung der JA-Antwort zu erhöhter Suszeptibilität gegenüber einer darauffolgenden Infektion mit *A. brassicicola*. Räumlich entfernte, nicht *Pst*-infizierte Blätter weisen aber keinen negativen Effekt auf die Abwehr gegen *A. brassicicola* auf (Spoel *et al.*, 2007). Auch konnte die Reprimierung der JA-Antwort im lokalen Gewebe nur nach Infektion mit virulenten Pseudomonaden beobachtet werden. Diese Regulation der antagonistischen Wirkungsweise von SA und JA könnte gewährleisten, dass nach einer Infektion mit avirulenten Bakterien, die zur Ausbildung einer HR führt, das Gewebe nicht anfälliger gegen nekrotrophe Pathogene wird, für die absterbendes Gewebe ein Vorteil darstellt (Spoel *et al.*, 2007).

Das Netzwerk der Signalweiterleitung in Pflanzen ist somit äußerst komplex und es wurde vorgeschlagen, dass eine Ursache dafür in der Co-Evolution der Pflanze-Pathogen-Interaktionen liegt (Pieterse *et al.*, 2009), da Pathogen-Effektoren zusätzlich in die Regulation der pflanzlichen Abwehr eingreifen (Hogenhout *et al.*, 2009).

2. Die Pathogenabwehr in Kartoffelpflanzen mit verändertem Oxylinmuster

2.1 Die Interaktion mit *P. infestans*

Allgemein führt eine Infektion mit verschiedenen Pathogenen in Pflanzen zu einer Reihe von Abwehrantworten, die häufig auch von einer Oxylin-Akkumulation begleitet werden (Göbel *et al.*, 2002; De Vos *et al.*, 2005; La Camera *et al.*, 2009). Dass dabei den Jasmonaten eine Funktion in der pflanzlichen Abwehr zukommt, wurde durch Arbeiten an Arabidopsis-Mutanten belegt, die in der JA-Biosynthese oder der JA-Perzeption beeinträchtigt sind. Diese zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber nekrotrophen Pathogenen wie *A. brassicicola*, *B. cinerea* oder *Pythium*-Spezies (Staswick *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998). Als möglicher Mechanismus, mit dem Jasmonate eine Abwehr vermitteln, wird die Fähigkeit dieser Signalmoleküle diskutiert, das Genexpressionsprofil der Pflanzen von allgemeinen Wachstumsprozessen auf die Stress-Reaktion umzustellen (Pauw und Memelink, 2004; Devoto *et al.*, 2005; Taki *et al.*, 2005). Beispielsweise aktiviert MeJA-Behandlung in Arabidopsis Gene des Phenylpropanoidweges, sowie die Akkumulation von Mono- und Oligolignolen (Pauwels *et al.*, 2008). Auch die Gene von Enzymen des Indol-Glucosinolatweges sind in Arabidopsis MeJA-responsiv (Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2005), und die Synthese der entsprechenden Indol-Glucosinolate ist von funktionalem *COII* abhängig (Brader *et al.*, 2001). Zwar stellen Indol-Glucosinolate Brassicaceen-spezifische Phytoalexine dar, aber mit Nicotin existiert auch ein Beispiel für ein Phytoalexin der Solanacee Tabak, dessen Synthese ebenfalls *COII*-abhängig ist (Shoji *et al.*, 2008). Damit kann vermutet werden, dass JAs die Synthese von Abwehr-assoziierten Sekundärmetaboliten vermitteln. Auch in den Microarray-Analysen dieser Arbeit wiesen Gene wie die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (*PAL*) oder eine 4-Coumarat-CoA-Ligase (*4CL*) nach Behandlung mit dem PAMP Pep-13 eine, in den JA-defizienten Pflanzen reduzierte Expression auf.

Anhand der aus Arabidopsis bekannten Daten zur Rolle der JAs in der Abwehr hätte vermutet werden können, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten JA-defizienten bzw. JA-insensitiven RNAi-Kartoffelpflanzen in der Interaktion mit *P. infestans* einen veränderten Infektionsphänotyp zeigen. Die Quantifizierung des *P. infestans*-Wachstums in Blättern und Knollen der RNAi-Pflanzen (r1-Hintergrund) ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Vgl. Abb. C-22 und C-23). Ebenso wurde die *P. infestans*-Biomasse in einer inkompatiblen Interaktion bestimmt. Auch hier wiesen die resistenten R1-Pflanzen, die

mit den RNAi-Konstrukten gegen die JA-Biosynthesegene oder gegen *StCOII* transformiert worden waren, kein verändertes Wachstum von *P. infestans* und damit keinen Bruch der durch das R1-Gen vermittelten Resistenz auf (Vgl. Abb. C-28). Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu Daten, die eine erhöhte Anfälligkeit der JA-defizienten *def1*-Tomaten gegenüber den hemibiotrophen Pathogenen *P. infestans*, *P. syringae* und *X. campestris* pv. *vesicatoria* nachweisen konnten (Thaler *et al.*, 2004). Allerdings wurden für diese Untersuchungen ausschließlich makroskopische Marker wie beispielsweise die nekrotische Blattfläche verwendet. Der *StAOS2*-Locus in Kartoffel wurde als ein Kandidat für einen quantitativen Resistenz-Locus identifiziert (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2008). *StAOS2*-Allele, die mit einer erhöhten Feldresistenz gegen *P. infestans* assoziiert waren, konnten die *A. thaliana*-Mutante *aos* hinsichtlich der Akkumulation von OPDA und JA sowie der Resistenz gegenüber dem Bakterium *E. carotovora* ssp. *carotovora* besser komplementieren als solche Allele, die in Kartoffel eher Suszeptibilität verliehen (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2008). Gleichzeitig wurden *StAOS2*-RNAi-Kartoffelpflanzen untersucht, die ein 1,5-fach erhöhtes Wachstum von *P. infestans* aufwiesen. Im Gegensatz zu diesen Daten liegen für JA-defiziente *def1*- und *Never-ripe*- (ET-insensitiv) Tomaten, sowie *NahG*-exprimierende Tomaten Ergebnisse vor, die eine Beteiligung des JA-, ET- und SA-Weges an der Abwehr gegen *P. infestans* ausschließen (Smart *et al.*, 2003). Diese Daten stützen sich jedoch hauptsächlich auf phänotypische Beobachtungen und eine Quantifizierung der *P. infestans*-Biomasse ist nicht erfolgt. Eine andere Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Oxylipin-Weges in verschiedenen Kartoffelsorten und der Resistenz gegenüber *P. infestans*. Dabei zeigte sich keine Korrelation zwischen der Stärke oder dem zeitlichen Verlauf der Oxylipinakkumulation und dem jeweiligen Resistenzlevel der einzelnen Sorten (Fauconnier *et al.*, 2008). Auch funktionelle Analysen, bei denen die RNAi-Strategie zum Herabsetzen der *StDES*, der Divinylethersynthase des 9-LOX-Weges, genutzt wurde, ergaben keine notwendige Funktion der 9-Oxylipine Colnel- und Colnelensäure für die Abwehr von Kartoffel gegen *P. infestans* (Eschen-Lippold *et al.*, 2007). Zwar akkumulieren nach *P. infestans*-Infektion bevorzugt die 9-Oxylipine, während ein Anstieg von OPDA oder JA nicht nachgewiesen werden konnte (Weber *et al.*, 1999; Göbel *et al.*, 2002), dennoch kann die Expression der 13-LOX *StLOX3* in infizierten Blättern beobachtet werden (Göbel *et al.*, 2002). LOX-gebildete 9- und 13-Ketodiene sowie -Ketotriene akkumulieren u.a. in der Interaktion von Arabidopsis mit avirulenten *Pst* in stärkerem Maße, als nach Infektion mit virulenten *Pst* (Vollenweider *et al.*, 2000). Daher könnte versucht werden, die direkten Produkte der *StLOX3*, 13-Hydroperoxide oder deren Ketone, in ihrer Funktion für die Kartoffel-*P. infestans*-Interaktion näher zu analysieren, zumal 13-HOT und 13-KOT starke antifungale Wirkung aufweisen (Prost *et al.*, 2005). Ein derartiger Ansatz wurde für den 9-LOX-Weg bereits verfolgt und es zeigte sich, dass das Ausschalten der 9-LOX *StLOX1* über RNAi zwar zu

einen Verlust der enzymatischen 9-Oxylipin-Bildung führt, dafür aber nicht-enzymatisch gebildete Oxylipine und 13-Oxylipine akkumulieren (Göbel *et al.*, 2003) und dass diese vermutlich eine mögliche Funktion der 9-Oxylipine für die Zelltodreaktion (Knight *et al.*, 2001) ersetzen (Göbel *et al.*, 2003). Die enzymatisch katalysierte Bildung von Lipidhydroperoxiden hätte für die Pflanze den Vorteil der Kontrollierbarkeit, womit die Bildung freier Radikale verhindert würde (Göbel *et al.*, 2003), und könnte zusätzlich zur Synthese von antimikrobiell wirksamen Substanzen genutzt werden (Weber *et al.*, 1999; Prost *et al.*, 2005). Die Akkumulation von nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipinen, sogenannten Phytoprostanen, wurde auch in *B. cinerea*-infizierten Tomatenpflanzen detektiert (Thoma *et al.*, 2003). Es wurde vorgeschlagen, dass es sich dabei um Signale handelt, die bereits früh in der Evolution entstanden sind. Diese könnten später von den Pflanzen als Stör-/Gefahr-Signale genutzt und in weniger destruktive Wege umgeleitet worden sein (Müller, 2004; Browse, 2008). Damit würde der Eingriff in den 9- oder 13-Oxylipinweg nicht zu einer Änderung der pflanzlichen Reaktion führen, da Lipidperoxide des jeweils anderen Weges die Funktion übernehmen können. So führt das *Silencing* einer 9-LOX in Kartoffel zu erhöhter Produktion von 13-Oxylipinen (Göbel *et al.*, 2003) und in Tomate wurde eine Reduktion der 9-Oxylipine in AOC-überexprimierenden Pflanzen beobachtet (Miersch *et al.*, 2004). Gleichzeitiges Ausschalten des 9- und 13-Oxylipinweges könnte zur Überprüfung dieser Hypothese genutzt werden, obwohl dann noch eine redundante Funktion der Phytoprostane denkbar wäre. Ein allgemeines Problem all dieser Untersuchungen ist der schwierige Nachweis eines Effektes auf eine kompatible Interaktion. *P. infestans* ist derart gut an seinen Wirt angepasst, dass kleine Änderungen der Abwehr keinen Effekt auf das Wachstum dieses Pathogens zu haben scheinen.

Neben den kontroversen Daten zur Rolle der Oxylipine in der Antwort auf den Oomyceten *P. infestans* (s. oben) existieren Hinweise, dass SA einen deutlich größeren Einfluss auf die Abwehrantworten gegen *P. infestans* hat (Halim *et al.*, 2007). Dies könnte mit der hemibiotrophen Lebensweise von *P. infestans* erklärt werden. Ähnlich wie für *P. syringae* gezeigt, sind SA-vermittelte Abwehrantworten eher wirksam (Thaler *et al.*, 2004; Glazebrook, 2005). An der Resistenzantwort gegen *P. infestans* ist auch eine programmierte Zelltod-Reaktion, die HR, beteiligt (Vleeshouwers *et al.*, 2000). Für diese wird eine Beteiligung des SA-Weges diskutiert, wenn sie durch Erkennung von Effektoren ausgelöst wird ist. In der Ausprägung der HR nach PAMP-Erkennung werden mehrere mögliche Signale diskutiert (s. D 1.1). Es könnte sein, dass die SA- und JA-Signalwege gemeinsam in der Abwehr gegen *P. infestans* fungieren und gewisse überlappende Funktionen auch in der HR-Antwort besitzen.

Die PAMP-vermittelte Abwehr ist, zusammen mit einer ineffizienten Effektor-vermittelten Resistenz, ebenso für die basale Abwehr einer suszeptiblen Pflanze von Bedeutung (Zipfel *et al.*, 2004) und kann in einer kompatiblen Pflanze-Pathogen-

Interaktion ein Einschränken des Pathogenwachstums und möglicherweise des Ausmaßes der Krankheitssymptome bewirken (Jones und Dangl, 2006; Göhre und Robatzek, 2008). Da die Erkennung des *Phytophthora*-PAMPs Pep-13 in Kartoffel Abwehrantworten auslöst (Geiler, 2001; Brunner *et al.*, 2002), für die auch der JA-Weg relevant ist ((Halim, 2006), diese Arbeit), könnten sich die Fragen ergeben, warum Kartoffel gegen *Phytophthora* derart anfällig ist und warum eine Inhibierung der JA-Antwort nicht zu einem veränderten Wachstum von *P. infestans* führt. Nach den Modellen von Chisholm (2006) und Jones und Dangl (2006) kann die Interaktion von Pflanzen und Pathogenen unter einem zeitlichen Aspekt betrachtet werden. Dabei ist die erste Form der pflanzlichen Abwehr die nach der PAMP-Erkennung initiierte PTI. Erfolgreiche Pathogene haben dann im Laufe der Evolution ein Arsenal von Effektoren entwickelt, deren Virulenzfunktion in der Pflanze häufig auf der Unterdrückung der Mechanismen der PTI beruht (Chisholm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006; Göhre und Robatzek, 2008). Untersuchungen an verschiedenen *Phytophthora*-Stämmen konnten mehrere Hundert putative Effektoren identifizieren, deren Funktion in dem meisten Fällen noch ungeklärt ist (Tyler *et al.*, 2006; Birch *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2008). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass *P. infestans* mit Hilfe dieser Effektoren auch in die Perzeption der PAMPs wie z.B. Pep-13 oder in die Signalkaskade unterhalb dieser Erkennung eingreift.

2.2. 13-Oxylipine in der kompatiblen Interaktion mit dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea*

Nekrotrophe Pathogene, wie der Pilz *B. cinerea*, zerstören pflanzliches Gewebe über zahlreiche Zellwand-degradierende Enzyme und leben von dem toten Gewebe. Damit stehen Pflanzen unter einem evolutionären Druck, spezifische Verteidigungsstrategien für diese Pathogene zu entwickeln, da beispielsweise eine Zelltodreaktion wie die HR es dem Pathogen erleichtert, die Pflanze zu besiedeln (Govrin und Levine, 2000). „Allein die Existenz eines pflanzlichen Signalweges, der eine HR auslöst, könnte ein molekulares Ziel darstellen, das von einem nekrotrophen Pathogen stimuliert werden könnte...“ (Kliebenstein und Rowe, 2008). In *Arabidopsis* wurde häufig beobachtet, dass der JA-Weg in Kombination mit dem ET-Weg die Abwehr gegen nekrotrophe Pathogene vermittelt (Glazebrook, 2005). So zeigen JA-defiziente oder –insensitive *A. thaliana*-Mutanten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber nekrotrophen Pathogenen (Staswick *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998). *Arabidopsis*-Pflanzen, die aufgrund der Überexpression einer Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferase (*JMT*) eine konstitutive Expression JA-responsiver Gene aufweisen, besitzen hingegen eine erhöhte Resistenz gegen *B. cinerea* (Seo *et al.*, 2001). Vergleichende Genexpressionsstudien an *Arabidopsis*

ergeben ein ähnliches Bild, denn ca. 30 bzw. 40 % der *B. cinerea* bzw. *A. brassicicola*-responsiven Gene sind auch abhängig von *COII* (Wise *et al.*, 2007). Einige Daten aus Arbeiten an der Arabidopsis *opr3*-Mutante weisen dagegen auf eine Funktion des JA-Vorläufers OPDA in der Abwehr gegen *B. cinerea* und *A. brassicicola* hin (Stintzi *et al.*, 2001; Raacke *et al.*, 2006). Zudem zeigen zahlreiche Oxylipine eine Wachstumsinhibierende Wirkung auf Bakterien, Pilz und auch Oomyceten, und OPDA gehört neben 13-HOT und 13-KOT zu den gegenüber eukaryotischen Pathogenen aktivsten Substanzen (Prost *et al.*, 2005). Die Beteiligung von ET an der Resistenz-vermittelnden Antwort gegen *B. cinerea* belegen Arbeiten an den ERF-Transkriptionsfaktoren *ERF1* und *ORA59*, deren Überexpression bzw. *Silencing* in Arabidopsis zu erhöhter Resistenz bzw. Suszeptibilität führt (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; Pre *et al.*, 2008).

Trotz dieser starken Hinweise auf eine Funktion der Octadecanoide in der Abwehr gegen nekrotrophe Pathogene konnte in den Wachstums-Experimenten der vorliegenden Arbeit keine Änderung der Anfälligkeit der StAOC-, StOPR3- oder StCOII-RNAi-Pflanzen beobachtet werden (Vgl. Abb. C-30). Dieses Resultat deckt sich jedoch mit Ergebnissen einer Arbeit der Gruppe um Audenaert (2002), in der die JA-defiziente Tomaten-Mutante *def1* ebenso kein erhöhtes Wachstum von *B. cinerea* aufweist. Damit könnten sich für Solanaceen Unterschiede in den Abwehrmechanismen im Vergleich zu der Brassicacee Arabidopsis abzeichnen. Es wurde diskutiert, dass Arabidopsis sich mit einer sehr starken basalen Abwehr gegen *B. cinerea* von der sehr suszeptiblen Tomate unterscheidet (Audenaert *et al.*, 2002), wobei der Verlust der JA-abhängigen Abwehrantworten in Arabidopsis, z.B. in *coil*-Mutanten, einen größeren Effekt auf die Interaktion hätte. Auch könnten sich in der Evolution der Pflanze-Pathogen-Interaktionen sehr spezifische Wechselwirkungen entwickelt haben. So ist die *def1*-Tomatenmutante beispielsweise resistenter gegen *Alternaria alternata* und die Arabidopsis JA-insensitive *coil*-Mutante ist im Gegensatz zu den Biosynthese-Mutanten *aos*, *opr3* und *jar1* resistent gegen *Fusarium oxysporum* (Egusa *et al.*, 2009; Thatcher *et al.*, 2009). Beide Gruppen vermuten, dass die jeweiligen Pathogene einen intakten JA-Signalweg für eine erfolgreiche Infektion benötigen (Egusa *et al.*, 2009; Thatcher *et al.*, 2009).

ABA, ein weiteres Phytohormon, wurde als mögliches Signal in der Abwehr von Arabidopsis gegen das nekrotrophe Pathogen *Pythium irregulare* identifiziert, da Mutanten im ABA-Weg eine erhöhte Suszeptibilität zeigten (Adie *et al.*, 2007). Diese ist nicht spezifisch für *P. irregulare*, denn auch *A. brassicicola* zeigt vermehrtes Wachstum auf diesen Pflanzen. Dagegen sind die gleichen Mutanten resistenter gegenüber *B. cinerea*, obwohl das Genexpressionsprofil von Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen nach *B. cinerea*-Infektion sehr ähnlich ist wie nach *P. irregulare*- oder *P. infestans*-Infektion und nach ABA-Behandlung (Adie *et al.*, 2007). Wiederum sind *sitiens*-Tomatenpflanzen mit einer Mutation in einem ABA-Biosynthese-Gen resistenter gegen *B. cinerea* und zeigen damit eine andere Reaktion als Arabidopsis (Audenaert *et al.*, 2002).

Zusammenfassend ergibt sich damit ein komplexes Bild der Abwehr gegenüber nekrotrophen Pathogenen, das zahlreiche Regulationsebenen umfasst und zusätzlich spezifische Facetten in einzelnen Pflanze-Pathogen-Interaktionen annehmen kann.

E ZUSAMMENFASSUNG

Octadecanoide, im Besonderen JA, sind seit langem untersuchte pflanzliche Signalsubstanzen mit einer Funktion in der Abwehr der Pflanzen gegenüber Pathogenen. Meist wird dabei davon ausgegangen, dass JA die pflanzliche Abwehr gegenüber nekrotrophen Pathogenen vermittelt. SA hingegen ist verantwortlich für die Abwehr von (hemi-) biotrophen Pathogenen. Zwischen SA und JA wurde häufig eine generell antagonistische Wirkungsweise festgestellt. Vor dem Hintergrund dieser Daten aus der Modellpflanze *A. thaliana* wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle der Octadecanoide OPDA und JA für die Pathogenabwehr von Kartoffel näher untersucht.

In transgenen Kartoffelpflanzen wurde unter Verwendung der RNAi-Strategie die Akkumulation von OPDA und/oder JA (StOPR3- bzw. StAOC-RNAi-Pflanzen), sowie die Perzeption des JA (StCOII-RNAi-Pflanzen) herabgesetzt, um eine funktionale Analyse der Bedeutung dieser Substanzen zu ermöglichen.

Die PAMP-vermittelten Abwehrantworten zeigten in Kartoffel einen eindeutigen Einfluss des JA. Die Ausbildung der HR und die damit einhergehende Akkumulation der ROS war in den RNAi-Pflanzen nach Infiltration des *Phytophthora* PAMPs Pep-13 deutlich vermindert. Damit konnten vorangegangene Arbeiten zu den StOPR3- und erste Daten zu StCOII-RNAi-Pflanzen bestätigt werden. Es war bereits bekannt, dass StOPR3-RNAi-Pflanzen ihre Fähigkeit beibehielten, SA zu akkumulieren. Zusammen mit vorliegenden Daten zu *NahG*-exprimierenden Pflanzen konnte daraus ein Modell aufgestellt werden, wonach SA nach Pep-13-Behandlung in Kartoffel oberhalb von JA akkumuliert. In Kartoffel kann somit für die Reaktion auf PAMP-Behandlung kein SA-JA-Antagonismus angenommen werden. Vielmehr vermitteln diese beiden Signalsubstanzen gemeinsam die Reaktion der Kartoffelpflanzen auf den PAMP Pep-13. Dieses Modell kann mit den Daten dieser Arbeit zur zeitlichen Abfolge der SA- und JA-Akkumulation nach Pep-13-Behandlung weiter gestützt werden. Zudem wurden die Daten zur Reaktion der JA-defizienten Pflanzen auf die StAOC-RNAi-Pflanzen ausgeweitet, die im Hinblick auf HR-Ausbildung oder ROS-Akkumulation keine Unterschiede zu den StOPR3-RNAi-Pflanzen aufwiesen.

Weiterhin wurden Microarray-Experimente durchgeführt, um die Genexpression nach Pep-13-Behandlung in Wildtyp-Pflanzen und RNAi-Pflanzen miteinander zu vergleichen. Dabei wurde nur teilweise eine Abhängigkeit der Pep-13-aktivierten Gene von einem intakten JA-Signalweg ermittelt. Ein großer Teil der Pep-13-regulierten Gene ist vermutlich unabhängig von der SA-JA-Kaskade oder abhängig von SA aber unabhängig von dem JA-Weg exprimiert. Welche Signale genau diese Gene beeinflussen, könnte in

fortführenden Analysen zur weiteren Aufdeckung der Pep-13-vermittelten Abwehrantworten geklärt werden. Unter den Genen, die in den RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp differentiell exprimiert werden, konnten verschiedene Gruppen mit unterschiedlichem Regulationsmuster identifiziert werden. Dabei wurden zunächst Kandidaten der Gruppe JA-abhängig via COI1 aktivierter Gene näher untersucht. Für die Kandidatengene *StJAZ*, *StAP2TF*, *StABC*, *StUBOX* und *StTUBBY* konnte das aus den Microarray-Daten erhaltene Expressionsmuster bestätigt werden. Ferner wurden erste Expressionsstudien dieser Kandidaten vorgenommen. Weitere Regulationsgruppen bedürfen der biologischen Verifizierung und könnten die Basis für weiterführende Arbeiten bilden. So zeigte beispielsweise eine Gruppe von Genen eine Expression in den *StOPR3*-RNAi- aber nicht in den *StAOC*-RNAi-Pflanzen, so dass vermutet werden könnte, dass OPDA und JA in der Pep-13-Signalkaskade verschiedene Sets von Genen regulieren. Auch die Abhängigkeit der JA-regulierten Gene bzw. die Unabhängigkeit der OPDA-regulierten Gene von COI1, die aus der Literatur bekannt ist, scheint für einige Gene nicht zu bestehen. Diese, aus den Microarray-Daten gewonnene Hypothese müßte weiter untersucht werden.

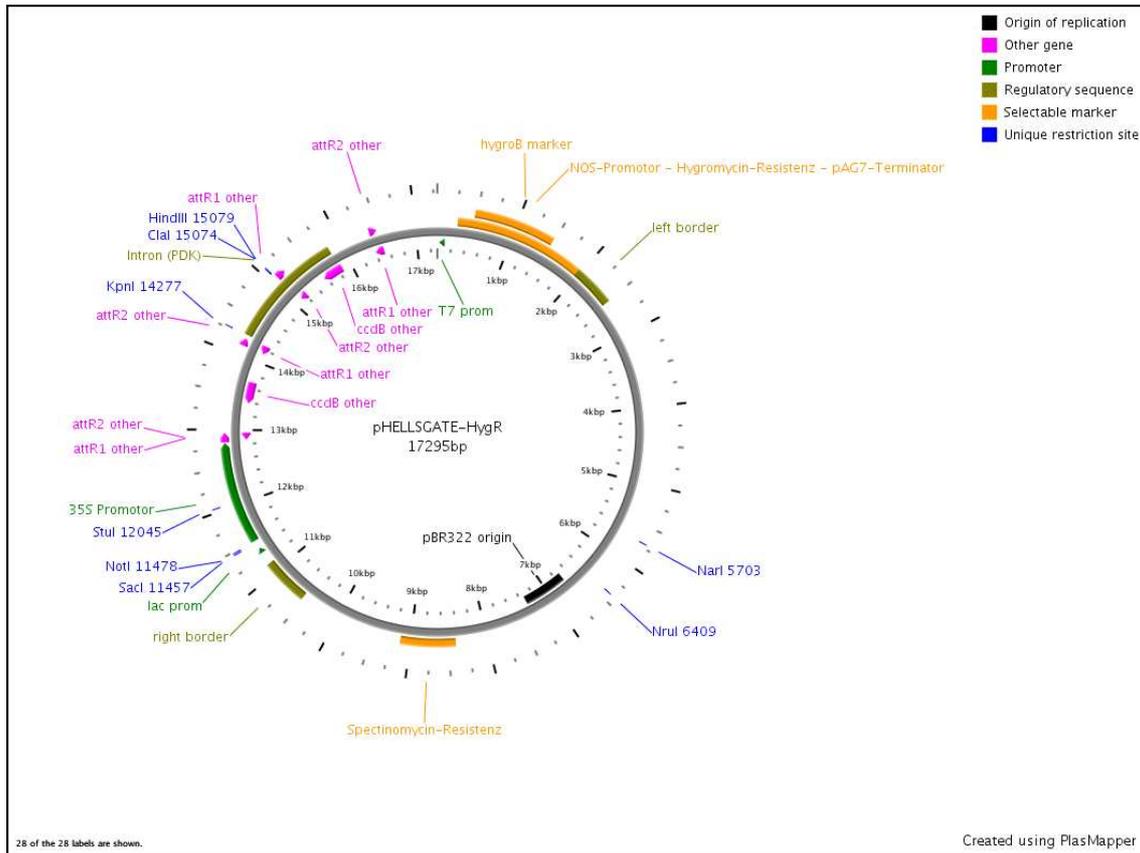
Die Interaktion der RNAi-Pflanzen mit verschiedenen Pathogenen war ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit. Zunächst wurde die kompatible Interaktion von Kartoffel mit dem Oomyceten *P. infestans* analysiert. Pflanzen mit reduziertem Gehalt an JA oder verminderter JA-Perzeptionsfähigkeit zeigen dabei in der *P. infestans*-Biomasse-Bestimmung auf Blättern oder Knollen keine Veränderung im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Weiterhin wurden R1-Gen-tragende Pflanzen generiert, in denen der JA-Weg RNAi-vermittelt ausgeschaltet war. Die Analyse der inkompatiblen Interaktion dieser Pflanzen mit *P. infestans* ergab keine Veränderungen zu Wildtyp-R1-Pflanzen hinsichtlich des makroskopischen Phänotyps oder des Wachstums des Oomyceten im Blattgewebe. Daher kann geschlußfolgert werden, dass die R1-Gen-vermittelte Resistenz der Kartoffelpflanzen gegen *P. infestans* unabhängig von dem JA-Signalweg ist.

Abschließend wurde ein weiteres Pathogen, der nekrotrophe Pilz *B. cinerea*, auf sein Verhalten auf den JA-defizienten bzw. -insensitiven Kartoffelpflanzen untersucht. Im Gegensatz zu dem aus *Arabidopsis* bekannten Einfluss des JA auf die Interaktion mit diesem Pathogen, ergaben die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente keine Abhängigkeit der Abwehr gegen *B. cinerea* von einem funktionalen JA-Weg.

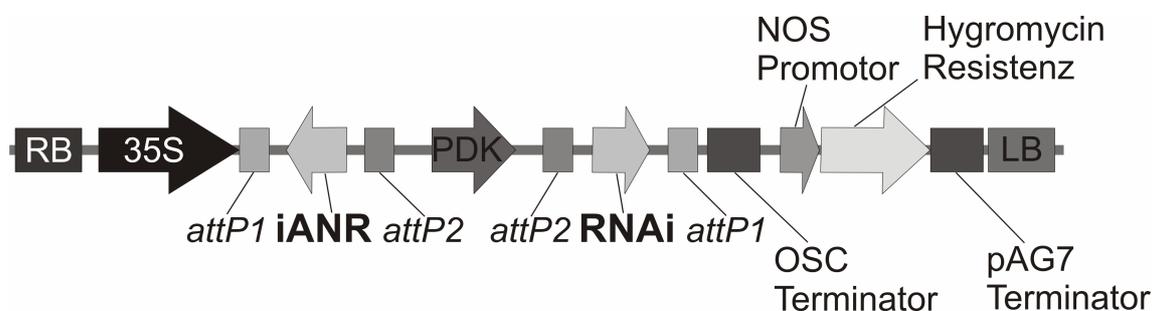
A-I: pHELLSGATE8-R^{Hyg}-Vektorkarte

Karte erstellt mit PlasMapper Version 2.0 (Dong et al., 2004)

Die ursprünglich in pHELLSGATE8 ((Wesley et al., 2001), Genbank-Eintrag AF489904) vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette wurde von L. Eschen-Lippold gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ausgetauscht.



A-II: RNAi-Konstrukt in pHELLSGATE8-R^{Hyg} (Schema nach (Wesley et al., 2001))



RB-right border; 35S – 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus; attP1/attP2 – Rekombinatiostellen; RNAi – RNA Interferenzkonstrukt; PDK – Pyovirus Orthophosphat Kinase (in der Funktion des Introns); OSC Terminator – Octopin Synthase Terminator, NOS Promotor – Nopalalin Synthase Promotor; LB – left border

A-III: RNAi-Konstrukte für die Klonierung in pHELLSGATE8-R^{Hyg}

StAOC (AY135641) – 741 bp

```

1 atggccactg tttcctcagc ctctgctgct cttagagcca tttcttcttc ctcatacaag
61 ctaccctctg ccttccaaat tacttctctt tctcaaaaga tccaatcttt aaaactccct
121 aaccctctca tttctcaaac tcataaaactt actaccacct ccactactgc ttccagatca
181 ttttcctgca agagccagaa cagctcaaca gattcaacta acactgaagt tcaagaactt
241 agtgtctatg agctcaatga acgtgaccgt ggaagccctg cttatcttcg attgagccaa
301 aagaatgtca attcactcgg agatcttgtc ccctttagca acaagctata tactgcagac
361 ctaaagaaga gaattggaat aacagcagga ctctgcattc tgatcaagca cgaagaagag
421 aagaaggag atcgctatga agctgtttac agcttctact tcggcgatta cggtcaaadc
481 gccgttcagg gatcgtactt aacctatgaa gacagttacc tcgccgtcac cggcggatcc
541 ggcatatttg ctggggtttc cggtaagta aaattgcagc aactcatctt ccctttcaag
601 ctattctaca ctttttactt gaaggggatc cccgatctgc catctgagtt gttgtgtacg
661 gcggttcttc cgtcgcggac ggtagagcca acacctgaag ctaaagcttg tgaggatggg
721 gccgactga aaaattacta a

```

RNAi-Region (407 bp)

Primer: StAOC_5 tcttctcatacaagctac
 StAOC_3cacc caccctgtaaacagcttcatag

Restriktionsenzym-Schnittstellen (Southern-Analyse):

PstI CTGCAG (358 bp, 383 bp)
 SacI GAGCTC (255 bp, 486 bp)
 BglII AGATCT (322 bp, 419 bp)
 EcoRI -

StOPR3 (keine vollständige Sequenz vorhanden)

EST TA29350

Homologie zu AtOPR3 Aminosäuresequenz

```

GATTTCAAGTTCCACGAAAACGACCCCCACAGTCCACAATTCATGCCGTCCATTTTTATC
TTTTCCACCATTAAAGCACACCTTTTCTGTATCTCATCATCCTAAATACTCACTCTTCTTT
CTTCTGAGTTCTACAGATCCTCTTTCAACAACAATGGCTAAAACGACATCGTCTTCAGCT
CAAGATGGAAGCAATCCCCTCTTCTCTCCTTACAAGATGGCAAAGTTCAATCTATCCCAC
AGGATAGTATTGGCTCCGATGACAAGGTGCAGAGCATTGAATAATATTCCCTTCGGCGGCG
CTGGGGGAATATTACGAGCAGAGAGCGACGGCCGGTGGATTTCTGATCACTGAAGGCACT
ATGATTTCTCCGACTTCAGCTGGGTTTCCTCATGTGCCAGGGATTTTCACAAAGGAGCAA
GTAGAGGAATGGAAGAAAATAGTTGATGTAGTGCATGCAAAGGGTGCTGTCATATTTTGT
CAGTTGTGGCATTTGGTTCGTGCATCTCATGAAGTGTATCAACCTGCTGGAGCTGCACCA
ATATCATCTACTGAGAAGCCTATATCAAAGAGGTGGAGAATTCTGATGCCTGATGGAAT
CATGGGATTTTATCCAAAACCAAGAGCAATTGGAACCTATGAGATCTCACAAGTGGTTGAA
GATTATTGCAGGTTCGGCCTTGAATGCTATTGAAGCAGGTTTTGATGGTATTGAAATCCAT
GGAGCTCACGGTTACTTGATTGACCAATTTCTGAAAAGATGGGATCAATGACCGGACAGAT
GAGTATGGTGGATCACTAGCCAACCGGTGCAAATTCATCACACAGGTGGTTCAAGCAGTC
ATCTCAGCAATAGGAGCTGATCGTGTAGGCGTTAGAGTTTCACCAGCAATAGATCATCTT
GATGCCATGGACTCTAATCCACTCAGCCTAGGCTTAGCAGTTGTTGAAAGACTAAACAAA
ATCCAACTCCATTCTGGTTCCAAGCTTGCTATCTTCATGTAACACAGCCACGATACGTA
GCATATGGGCAAACCGAAGCAGGCAGACTTGGCAGTGAAGAGGAGGAGGCGCATTTAATG
AGGACTTTGAGGAACGCATATCAGGGGACATTCAATTTGCAGTGGTGGATACTAGGGAG
CTAGGAATTGAGGCTGTGGCACAAGGTGATGCTGATCTCGTGTCAATGGACGCTTTTTT
ATCTCTAATCCTGATTTGGTTATGAGAATCAAGCTAAATGCACCTCTAAATAAGTATAAC
AGGAAGACATTCTATACTCAAGATCCAGTTGTGGGATACACAGATTACCCTTTTCTTCAA

```

GGAAATGGAAACAACGGACCGTTATCGCGTCTGTGAAAAGAACAGTTGTATTTTGTAAAG
 ACTTGTGAAGCCTGATTTTGTGGGCAATTTATTTACTTGGTAAAGTATGTATTTTAAAG
 TTGTATATGCATCTATGTGAGGGATGTTCTCTTTTAGAGCCTAGTACCAGCCAAGCCTCC
 TCGATTTGCTAACAAAGAGTCGGTTATGGAATAGTCTTTTAGTCAGCTTTCTCGTTC'TTAA
 GGACTTTCTGGTGAATGTGAGGAAAGAAATTTGTACTGTTAAAAACAT'TAGGATTTATCAT
 TTATGAGAGTGCTCTAAAAATTACCTATTTCTTGAGCATTGGAATATTGTTCT

RNAi-Region (355 bp)

Primer: StOPR3_5 gcttgccatcttcatgtaacac
 StOPR3_3cacc cacctccattgctccatttcctgaag

Restriktionsenzym-Schnittstellen im EST (Southern-Analyse):

NdeI CATATG (1024 bp, 162 bp, 487 bp)
 BsrI (BsrNI) ACTGGn (1288 bp, 385 bp)
 EcoRI GAATTC (579 bp, 1097 bp)

StCOII (keine vollständige Sequenz vorhanden)

EST TA3876

Homologie zu SlCOII Aminosäuresequenz

GTGGTGGCAGATCGATGCGATTACTAGAAAAGCATATAACTATGGCGTTGTGTTATACAGC
 GAAGCCGGAGCAGCTATCTAGAAGGTTTCCACATCTTGAATCGGTTAAACTGAAAGGGAA
 ACCAAGAGCTGCTATGTTAATTTGATACCGGAAGATTGGGGAGGATATGTTACACCTTG
 GGTGTGGAGATTACTAAGTCGTTTAAATAAATTGAAAGCGCTTCATTTT**CGTAGAATGAT**
TGTTAGAGATTTCGGATCTCGAATTGCTTGCGAATCGTCGTGGGAAAGTTC'TTCAAGTTTT
GAAGCTGGATAAGTGTTCTGGATTTTCTACTGATGGTCTTCTGCATATTTCTCGTTCCTG
CAAGAACTTAAGAACTTTGTTAATGGAAGAGAGTTATATAAATTGAGAAAGATGGAGAATG
GGCACATGAACTAGCATCGAACAACACTGTTCTTGAGAATTTGAACTTTTACATGACGGA
CTTCTGCAAGTTAGGGCTGAAGATCTTGAATTGATAGCAAGAAATTTGAAATCTCTTGT
CTCTATGAAAATTAGCGAGTGTGAAATTACGAATCTTCTTGGCTTCTTTAGAGCTGCGGC
 TGCATTGGAGGAGTTTGGTGGTGGCGCATTTAATGACCAACCAGAGCTTGTGAAAATGG
 CTATAATGAGCAATCGGGAAAAATATGCCGCACTAGTTTTCCCTCCAAGATTATGCCAATT
 GGGCTTGACATACTTAGGGAAAAATGAGATGTCCATTCTCTTTCCTATTGCGTCTCGTCT
 GAGGAAATGGATCTTCTTTATGCACTTCTTGACACAGCAGCCCACTGTTTCTTACTGCA
 AAGGTGTCCCAACTTGAAAATTTCTTGAGACAAGGAATGTTGTGGGGATAGAGGATTGGG
 AAGTGCTTGGCCAGTACTGTAAAGAGGTTAAAGCGGCTCAGGATTGAGAGAAGAGCTGAT
 GATCAGGAGATGGAGGATGAAGAAAGTGC

RNAi-Region (333 bp)

Primer: StCOII_5 cgtagaatgattgtagagattcg
 StCOII_3cacc caccacactcgctaattttcatagagac

Restriktionsenzym-Schnittstellen im EST (Southern-Analyse):

BglII AGATCT (503 bp, 486 bp)
 AflII (BspTI) CTTAAG (368 bp, 621 bp)

A-IV: Sequenzen und Primer der Kandidatengene (s. Tabelle C-1):

Fett/kursiv markiert sind die 60mer Oligos des Agilent 44K Chips
(in Klammern stehen die *Identifizier* des Chips)

StJAZ (bf_mxflxxx_0060e05.t3m.scf_272)

AAATGAGAAGAAATTGTAATGGGGAGCTTAGGCTTATGCCAACTTCTCTT
TCAACTTATTCTCCTAACAAATTGCTATAATACCTCTATTTTTCAATGGA
GGAGGATAAAGAAAGCACAGAATTAGAGAACAGATCTCAGCCGTTAACAA
TATTTTACAGTGGAAAATCTGTGGTTTCTCATGTTACTGACCTTCAGGCT
AAAGCTATAATATATCTTGCAAGTAGAGAAACGGAGGAGAAAAACAAACAA
GACTTCGTCACCAATGTCTGA**ACCGTCATCAGCATTATTACAACCTCAAA**
CTGTGAAGAAATCTCTACAAAGATTTCTACAAAAAAGAAAAAATAGAATT
GAAACAATTTGCCATATCATCACTAGCTTAATTTAGTTCCATTATTTGT
ACATATGTATAGTATCTTTGGATCT

Primer für Klonierung des RNAi-Konstruktes (361 bp) in pENTRTM:

StZIM_5 GAAATTGTAATGGGGAGCTTAGG
StZIM_3cacc caccTGATATGGCGAAATTGTTTCA

Primer zum Testen der RNAi-Pflanzen:

StZIM_5 s.oben
StZIMout_3 AATGGAACTAAATTAAGCTAGTGATGA

Primer für qRT-PCR:

StZIMqPCR_5 TGGAGGAGGATAAAGAAAGCACAGA
StZIMqPCR_3 TGATGACGGTTCAGACATTGGTG

StAP2TF (MICRO.14730.C1_959)

GAAAAAAAAAGAAGTGAAGACAAGCACAAAGTAGCTAACACACAAAAGAG
GGCCAACGCCAGGGCCTGCTGCCACTGCTTATAAACAGAAACGGCCAGCA
CCATTTCTCCGCCGGCTTTTCTTTTCGTCATCATCCTTATTTTCGTATATA
TATCTCCTTTCTTATTGGAGAAAGGAAAATTTCTAATTTATACTACTATT
ATTTTCTTACATTTTAAATTTGATGGCGAAAACATCAAAATCGAATACTA
CTGCAACTTCATCATCTTCTTCATCTAGCAACAAATGTGATAGTAAAGCG
AAACGTAGCAACAAAATTGATAGCAATGCTATTGGTAAAGTGAACGAAC
GCGAAAGAGCGTTCCCTAGAGACTCTCCTCCTCAACGTAGCTCAATTTACA
GAGGAGTTACTCGGCACCGATGGACCGGCCGATACGAAGCTCATCTATGG
GATAAAAATTGCTGGAATGAAACACAGAACAAAAAGGAAGACAAGTTTA
TTTGGGAGCCTATGATGATGAAGAAGCAGCTGCACATGCATATGACTTAG
CGGCGTTAAAGTATTGGGGTCAAGACACCGTCCCTTAATTTCCCTGTAGCT
ACGTATGAAAATGAGCTAAAGGAAATGGAAGGTCAATCAAAAAGAGAGTA
TATTGGTTCTTTGAGAAGAAAAGTAGTGGGTTTTCAAGGGGAGTATCAA
AATATAGAGGTGTAGCAAGACACCACCACAATGGAAGAT**TGGGAGGCTCGA**
ATTGGAAGGGTATTTGGCAATAAATATCTCTACCTTGGAAACATATGCTAC
TCAAGAGGAAGCAGCAACCGCATATGATATGGCAGCTATTGAATACCGTG
GACTAAACGCCGTTACAAATTTTGACCTTAGCCGTTACATTTAAATGGCTA
CGTCCCTCCGACCAACAAATGATAATACCATTAATAACCCTGAACCAAA
CCCTAACCT**TATTGACATTCATCTCATGCCTACAAATTTAACCCAACAAC**
AAAGCTCCGGCTGCGATGTAACTGTTGCGGCTCCGCCACCTGGATGTGGC
GGAGCCGCGACTTCATCAGCAGCACTAGAAAATTTTGGATGCAGTCTACAAA
GTTCAAGGAAATGCTCGAAAGAACATCGGAGGTAATTGAATGCCCGGAAA
CTCCACCGGAGCCAGACCGACCACGGAGGAGCTTCCCTGATGATATACAA
ACCTATTTTGGATTGCCAAGAATCAAGTAGCTTCATTGAGGAGCATGATAT
TATTTTTGGTGACTTGGATTCTTTAACATTGCCAATGTTTCAGTGTGAGC
TTATTAATTAATTAATAACTATGGACGTGAGATATAAAAAATTATTTGTGT
ATATTACTATTTTAAAGTTAAGGAGAGAGTATAATTTGGGGAGGCAACAA
AAACAAAAAGGAAAATGGAAACAGATAATTTCTTTAAAAATGATTTTAT
CTTTCCAGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Primer für Klonierung des RNAi-Konstruktes (413 bp) in pENTR™:

StAP2TF_5 CACCACCACAATGGAAGATG
StAP2TF_3acc GCATTCAATTACCTCCGATG

Primer zum Testen der RNAi-Pflanzen/Primer für qRT-PCR:

StAP2TFout_5 GAGCGTTCCTAGAGACTCTCCTCCTC
StAP2TFout_3 TGATACTCCCTTGAAAACCCACTAC

StABC (MICRO.15286.C1_549)

CCGGCGATCCCGTCGCCGGAGAAAACTTGTTACGAACACAAAATTCCTC
 CTGAACAATATCTCCGGCGAGGCCCGGGACGGCGAGATAGTCGCCGTCCT
 GGGTGCATCAGGGTCGGGAAAAATCGACCCTGATCGATGCCCTTGCGAATA
 GGATCGCGAAGGAGAGTTTAAAAGGAATGATAACGTTGAACGGAGAGCCA
 CTCGATTCGAGATTGTTGAAAGTAATCTCAGCATATGTAATGCAAGATGA
 TCTTTTATATCCAATGTTGACAGTTGAAGAAACGTTAATGTTTGCAGCTG
 AATTCAGATTGCCACGTACTTTGTCAAAAATCAAAAAAGAAAATGAGAGTT
 CAAGCTTTGATTGATCAATTAGGACTACGAAATGCTGCAAAAAACAATCAT
 TGGTGATGAGGGTCATCGTGGAGTGTCTGGTGGTGAAGACGACGAGTTT
 CTATTGGAATTGACATTATACATGACCCATCATATGGTTTTTTAGACGAA
 CCAACCTCAGGTCTTGATTGACTAGTGCATACATGGTGGTGAAGTCCT
TCAACGAATTGCTCAAAGTGGAAGTATCGTGATCATGTCAATCCATCAGC
CAAGTTATCGAATCCTCGGGTNATCGGATCGGATGGCTCTCCTTGTCCCG
 TGGTCAAACGGTTTATAGCGGGTCACCTATGAACCTCCACATTTTTTTTG
 CTGATTTGGGTCACCAATTCCAGA

Primer für Klonierung des RNAi-Konstruktes (413 bp) in pENTR™:

StABC_5 TCGATTGAGATTGTTGAAAG
StABC_3acc caccGATTGATAACTTGGCTGATG

Primer für qRT-PCR:

StABCqPCR_5 GAACCAACCTCAGGTCTTGATTCCG
StABCqPCR_3 CGTTTGACCACGGGACAAGG

Primer zum Testen der RNAi-Pflanzen:

StABCqPCR_3 s.oben (mit einem der oben aufgeführten 5'-Primer)

StTUBBY (SSBN002D24u.scf_741)

TCGAAGTGCTCGCCCTCGTCCTTCTAAAGACAACTTCAAGCCAAGTATG
 GCAGCAACATCACTGCTGGAACACTAGGAAGACAGAATCATAGACCTGGA
 GATGCTGCTGATTCTAAGGTACCATTTGCAAACCTCCCTTATCAGCTAAGAA
 GGGCTTCAAGAGGCCCGAAAAAATCAAGTGTGGATCGACTACCGAGACTG
 TCAATCCACAAATTAAGTACAAGCTAAGGAATCATCACAAACATAATATT
 AAGGTTAAAAAGGAGCATCGAGTTAAGGCTGTAACCAAAGAGAGGAAGAG
 GGCTCAGCAAATTACTTTTGCCAGCGCCGCTGGAAATCTGAGTTTTGTAG
 TTGCTCAAAATACAAAGGGAATATGGGGAAAAATCTGATGACAGTTTGATT
 GGACATGTAACAGCTAATCTTCTGGGATCAAAATACCAAATATGGGGCCA
 GGGCAGTCCATAATTCCACAACCAAACAATCAAAATTTGTTGGGCGCTGTAA
 CATTTCATGCCTACCATCGCGACCTGGACTGGAAGCTACAGAAGGATAAAA
 GCATGCATACCAAAACACCAGTCCATGCAGTTAAAATGTACAGCTCAGCA
 CATCAATGGACTACCCGAGATTGGGAGGAGCATATGGACAAAGTGAATC
 AGTTGTTTTCGAAGATTCTTCATTACAATAAGGTCTCAAGACAGTATGAG
 TTAGATTTTAGAGATAGAGGAAGGCAGGACTCCGAATCC**AGAGCTCGGT**
TAAGAATTTTCAGCTGACTATGGAGAAAAATGGAAGGCAACATTCTACAA
 CTTA

Primer für Klonierung des RNAi-Konstruktes (308 bp) in pENTR™:

StTUBBY_5n GCTGTAACATTCATGCCTACCATC
StTUBBY_3accn caccGTTGTAGAATGTTGCCTTCCAT

Primer für qRT-PCR:

StTUBBYqPCR_5 CCGCAGATTGGGAGGAGCA

StTUBBYqPCR_3 GAATGTTGCCTTCCATTTTTCTCCA**StUBOX** (138C01AF.esd_640)

CTTATAAGATTGATCTCCTTCTTTGATTAATCTTGAAATTTCCCAAATA
 ATCTACTAAAAATATTCCTCTTTTTGTTTTGGTCATATTTGCAACTTT
 TACAAATGGAAGAAATTCAAGTACCTCCTTATTTTATTTGTCCAATTTCT
 CTAGAGATGATGAAAGATCCCTGTCACGATCTTCAACTGGAAATAACATA
 TGATCGAGAAAACATCGAAAAATGGATATTCTCAGCAAAGAACTCTT
 GTCCGGCTACGAAACAGTCTCTTACATGCATAGAGTTGACCCAAATGTT
 ACTCTTCGACGATTAATCCAATCGTGGTGTACTATCAATTCGTCCCATGG
 TATTGAAAGGTTCCCTACACCAAAGCCTCCGGTTAGCAAACCACAAATAA
 TAAAGCTCCTAAAAGAAGCAAAATCGCCTAAGATGCTAATGAATTCCTC
 AAGAGACTCAGATCCATAGCTTCTGAGAATGATGCTAACAAACGTTGCAT
 GGAATCCGCGGGGCAATGGAGTTCTTAGCTTCTATTATTAATAATTCTGA
 ATGAAGTGTGGAAGAAGACGAGGGTTTCATGAGTACTAAAGATGAAGCG
 CTTAGCATCCTCTATCAACTCAAATTATCTGAAAATGG**ATTGAGGTCACT**
CATCATGAGTGGCAATGGAGAATTCATTGAGTCATTGACACGTGTCATGC
 AACATGGGAGCTACGA

Primer für Klonierung des RNAi-Konstruktes (380 bp) in pENTR™:

StUBOX_5 GACGATTAATCCAATCGTGGTGT
StUBOX_3acc CACCTCAATGACTCAATGAATTCTCCA

Primer für qRT-PCR:

StUBOXout_5 GATCCCTGTCACGATCTTCAACTG
StUBOXout_3 AGGCTTTGGTGTAGGGAACCTTC

StMAPKKK (MICRO.17670.C1_540)

CTTGGCTGTGTGGTGGCGGAAATGGCAACTGGTAATCCAGTGTGGAGATG
 TTCAGATATAACTAAATTGTTGATGACAATTGGATTGGGTGATCAATTAC
 CTGAAATTCCTCAAAATTTATCGGAAGAAGGAAAAGATTTTCTTGAAAAA
 TGCTTGGTGAAGGACCCGAAAAAGAGATGGACAGCTGAGATGCTTCTAAA
 ACATCCCTTTGTTGCTGATGAAGATGACACTGTTTTATTGAATGAAGAAA
 GATGCAACAGTGGCAGCCCTTCAACATCTCCAAGGTGCCATTTGATTTTC
 CCAGATTGGGTATCTAATAACTCGGCTGAATCCTCAGTAACATGTTCAAT
 TACATCACTGCCCTCACCGCGTTTCAAGAATCGATGAAGTGGAGCGATG
 GGTCAATGGTCTACATACCAACAGAGAGAATTCGGAATTAAGTGTGTGAA
 TGTAGACCTGAATTTGAATGGTCTACTGCTGATGGCTGGGTGAGCGTTAG
 GTGATGTCAATTTTGTAGTAAAAAATTTAGTCATAGACA**ATTTCAGAGT**
TCTGAAGATTTTTGCTAGCCAATTTAGTGATTAGGCTAGGCCATTTGCTT
 CAATTTTTTTGTACAAAATACATACATGAATTTCTATATGACGACGATGG
 ATTGAAACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Primer für Klonierung des RNAi-Konstruktes (423 bp) in pENTR™:

StMAPKKK_5 GAGATGGACAGCTGAGATGCTTC
StMAPKKK_3acc CACCAAATGGCCTAGCCTAATCACT

StMYH19 (MICRO.8681.C2_1326)

CACAACACAGCAGCAGCAGAGATTTGTAAATTTTCATAATTTGTAAGCAA
 CTCATACATGTACAATACTGTTTCATAGACCAGTACAGTAAAATTTGTGCTG
 CTCTTTTTCTGGATTTTCTCGAATTATTCAATATTTGGATTGATGATGAC
 GGAGAAAATCGATCGAAATGGTAACGAGAACGGAGAGTTGAAGAAGAAGA
 GGAAGCGGAGGAAAATAGGAGTGTCAAGGGTTCAGAACTCTATGGAAT
 TGCAAACAGGTTTTCGCTAATTGCAAACCTGGCGTTGTGCCGTACCCGGA
 AAATGTTGAACCTGTCAAGGCAGTTTTGGATAAGATGACTGAAGCAGATG
 TTGGCCTAAGACCAATAATGCCATATTTCAAGTCAAAGTATCAGATAGA
 CCTCCTAAATAACATACTTGCATCTCCATGAATGTGACAAAATTTCTCGGT
 ATGCAGCCAATTAGGTCGACCTTTCTAAAATTTAATATCGTTTAGGTGA
 CTTAATAGTTAAATTTCAATATATTGTCAGTTTATAGAAGTTAAAATC

GCAATTTCACTTCTAACTCTTGATTGAAGATTTAAAGTTTGTTCATATTT
 TGTTAGATTGGTATCTTTTGCTTACCACCAAAGCAGTCATTCCTCTTCA
 TAACCATCCTGGAATGACAGTTTTTCAGCAAGCTTCTCTTTGGGAAAATGC
 ACATAAAGTCTTATGATTGGGCGGACAATCTCCTTCCTGAATCAACTACC
 CCAAATGCCAATATTTCTGACAGGGATTGTACAGGACTGCGTTTTGCAAA
 ATTGAAGGTGAATTCCAAGTTTAAAGCTCCTTGCAAACTTCAATCCTCT
 ATCCAGCTGACGGAGGTAATATGCACTGCTTACAGCAAAGACAGCCTGC
 GCCGTACTAGATGTTCTTGGCCACCTTATTTGTGATCCTGAAGGTCGCCA
 CTGCCAATACTACTATGACTTCCCCTTTGCCAACATCTCAGTGAATGGCT
 TGTCACTACCAGGAACAGCAAAGTGAGTATGCATGGCTCAAAGAGAGA
 GAGAAACCTGAGGACTTAACTGTAGCTGGAGCACTGTATAGTGGACCAA
 TTTAGTGTAGTAAACCGATGGATCAATTGCTTGTGTTGAAGAAGAAGAGG
 ATTTTCTTTTTTTGCTCAACTTTTTACTCTTTCCAGTGATGAATGAATAG
 TCAAAAAGGGATAAAGTTAGGAGGAAGAGTTTTTTTTTTTTTGTGCGAAGA
 GCTCATGTACATGTACATATTCAGACAGATCGGAACAGGTAAGGAAGAAG
 GAACTGAGAATGTATGTATTCTCAA**AATTGTATGTATAAACGAATGTTTT**
CCTTTGGTTTTGAGAAGACTCGTAAGAAAGGGAGTCGT

Primer für Klonierung des RNAi-Konstruktes (385 bp) in pENTR™:
StMYH19_5 TCAGTACCAGAGGAACAGCAAAGTG
StMYH19_3cacc CACCACGACTCCCTTCTTACGAGT

StMYST1 (BF_LBCHXXXX_0019D05_T3M.SCF_438)

ACAATACTACACAAAAATATAGGCAATATGGTTTTGTGGATCGATACACTG
 ATTATATCCAAATAAAGATTTGGTGTATAAAGTTGGTGTAGTGATTATA
 AAAAAGATTGGTTCTTTGCTCATGTAACCAGGAAAAC TAGAAGCAAGAAT
 TATATACCAACAACATGGCAAATTTCAATTTGAACTCCCAAGTGTGATCC
 AAAGGGAACCTTATACACTACGTGTGGCACTGGCTTCTGCAACCTATTCCC
 ATTTACAGGGGAGGATCAACAACCCCTCTAGAACAATGCCTCACTTTGAA
 ACTCCATCAATTGGGAGGAGTAATGCAATAGCTAGACATGGAATACATGG
 ATTATATTGGCTCTTTAATTTTCAAATTC AAGGATTATATCTACAAAAGG
 GAGAAAATACAATATATTTGAAGCAAATTAAGGTGG**TAATCCTTTCTAT**
GGCCATCAATATGACTACATTCGTTTTGGAAGGACCTCCACAACAAAATTA
 ATCAATTAAGTGAATATTATACATATATAAATTAGGAGGATTTTCCACTTT
 AAGTCAATCAATATGTTAATAGTGTTTTCTTTTTTCTTACATGATATTGA
 GTGGGGGTTATTTTCTTTATTGATTATCATTATTCTTTGTAATTGATTA
 CCTTGACAATTATGTAAGCATATATCTTAATTCCTTGATTGTAATAGTAT
 GATAATCAATAGCAAGTTCATTTTTTCTCGTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAA

Primer für Klonierung des RNAi-Konstruktes (375bp) in pENTR™:
StMYST1_5 TCTTTGCTCATGTAACCAGGAA
StMYST1_3cacc caccGAGGTCCTTCCAAACGAATG

A-V:
BcCutA (Z69264) - 2848 bp

aagcttttctcaatatggggg**agccttatgtcccttcccttg**tccttgctgctgat**ctcac**
cattttccatttctcttcacctctttctcctccgtgattcaaccacacctttagaatct
 ttaatgcctcggcagttgaagacatacacgggctcgtcaattatcgcacattgtactac
 tcaccaacttaatgaaatactggcatctaaacacggattcaaaagatgcgagatgtaca
 gacagacactcgcaggtcatgacaaaattccccgctcggactccacattggaattttgaga
 gtccaagcaaaaaagttacaatggtgttatgttgcatacacaatacaaaatcttccttactt
 tttctccacacagggcaccaccatcctccttatgcttctttcatccttaacgtttcaaaa
 gtcggattcatctgaaaaagttacatcaaaagcaatttttcgtctcataactaattgatat
 attggcaaaaataatcaatgtcaagtcgaggtatccacttcaaaaggtatcaaaagcacc
 tatccccggctaccaacatgtttaagccccgcaaaacatacaaaaacgggtctaaagatct
aggaacgggaggtgatatgccaagtgagatcctttgtaccaatcgcacatctcaagaatg
 tttttgcaactctgccataagcgccgagcatgtgctttgttcttctccccagatatatcg

tattaacgtctatTTTTCCGTCATCCCTAAATTGGGATTGTACTGCCGGGAAGTTTCCA
 agatgtcagattccaggtccgatgaataactattctggcatcgatgCGAGGCTAGTGCAGC
 TGCAGTTGGTTGAAGTGCCTGTCCAAGCTAGAGCCTTAATTATTAGCGCATAGAGGAAAA
 agctcggcttagaggtctagtgatcatacacagagtcgaacattcattgagataacagta
 ctgtaccccatattgaagggtaatcattgctaaattggTTTTcatgaggagctgtgtgga
 gctcaccaccgctatTTCTCCTCGGCACTTCTACTTTTTAATAATAGAAACGTTGTAT
 AACCTTCGTCTGGTGTGTGATAGCATCTAGGACTAAGCCCGGTGGTTGTCTGTGT
 GTTGAATACTCGGTATTTAGCAAGTTTCTACTTGTACTGGCCGACAAGCATCTAGATACT
 ATTATCGGCTTGAACCTTCTCCCAAGGCTCCGAGGAATTAAGCATATGTTATGATCTC
 ACGGTGTTCCCAAAAAATAATGACGTTCTCGGTTGTGGGTTCAACTTTGAAGAT
 AAAGTCAAGATGATTTCTTTCAACGCAATTTCTCTCATCACTGATCATCGTCTATA
 CATCTTTCACTGATATCTTACTAATCTTCTATTCTCATTGACTACTCATTATTCTTGT
 AAAAAATCAATACATCAATTTCAAAATGAAGACCTCAGCTCAACAACCTCTGTCCGCT
 CTCTCTCTCTCTCTCGTCTTAGCCGCTCCAACAGGTTCCATTGAAGCTAGAGCATGC
 TCAGATGTGACGGTCTCTTTGCCGTTGGAACGACTGAGACTGGAACCTCTCGTACTGTA
 GTCGGACCACCTTCTCGCCGCTCTCAAATCTGCTCTGGGTCTCTCAGTCACCATG
 AATGGTGTGACTACCCAGCAGATGTTCCAGGATTTTGAAGGAGGCGATCTGCTGGC
 AGTCAGACTATGTATGTTTTCTTTTTCTGAGATTTCAAGCTGACTAGTTGTTTTCTCT
 TAAAAACATTTACTCACATCTCAATACAGGGCCACAATGGTCACATCAACCTTATCCAGC
 TGCCAGACACAAAACCTCGTCTCTGCTACTCCAAGGTGGCCAACCTCGTACATAAC
 GCCGCCAAAACTTTTACCAGCCGAAACAACAGCTAAAATCAGCTCTGCCGTTATCTTCCGCT
 GACCAGGTTCTGCCAACCCCTTTACATATTCACAATATGGCATGAAATCTGAAACTA
 ACACAATTACCAGACAATGGAGATCCAGTCCAAGGTGTCTCAGCCGATAGAACAGATATC
 ATTTGTCAAGCTGGAGATAACATCTGTCAAGGCGGAAGCTTGATCTTACTGGCTCATCTG
 ACTTATGGAATGGATACGACGGCAGCAGCGGCAATTTGTTAAGAAAGCAGCCGGATTGTAG
 GCGGATGAGTATCCGCACTGCGGATTTGGATTTGGATGGAGTTACTTGAATGATATGATA
 CGACTGGGCGAGCCCTTCACTCTCGAAATTTGGCATGGAGTTTTTACGTTTCTGGCAGTA
 AAGGCTTTTTCTGGTACATTTTACTTTTTCTCCCTACTGGACTTTCTGGCTCTTCTTT
 TCTGTAGGCAACAGCACTTCAATTTGGGATGAGTATCTCGACTGTAGAGATCTCGT
 CAGACGGTATTGGATTGGCTAGGCCAGTAGGGGTTTACTTATATTTCTGCTTCTTGTCTT
 GCAGGTCAGCATTTTTATTTTACACACATCAAATATCAAATATCAAAAGGCTGGTTCGAG
 AATGGTTTATAATCTGAATTGACATTTCTCTGCGAATCCGTTTATGACTTGTGATTTGAGC
 TATCTTCTTTGGTGGATCAATAGAAGAGAAAAAGCCGAGATATTGACTTAATTATCTCAT
 TTACATATTGGAATAAGTCACATACGAATTACAAAAGATATAAGGAGATGCTAGTTTTCG
 AGGGTTTGAAGTATTAAGTATAGATATAGCTTACCCTCTAGTAGTTGAACCTGTATACGT
 GATTAAGAGTAGCAGTCGCAAGAATTC

Primer:

BcCutA_5 (=CG11, Gachon et. al, 2004)

agccttatgtccctcccttg

BcCutA_3_58 (CG12, Gachon et. al, 2004)

gaagagaaatggaaatggtgag

BcCutA_3_600

*cataccctcccgttct***A-VI:****StRbohB (AB050661)**

tcacaactttcgTTTTCATCTGAGGCAAGTTTCCAAGGAATTGAAAAGAAATGACTTCTTCT
 AATAAGTTTCAGAAAATTGATAGGAGTAAGTCTGGTGTCTCGTGTCTACGTGGACTT
 CAGTTTATGAACAAGAATGTAGGAACCTGAAGGATGGTCTGAGGTTGAATCGCGATTCTGAT
 CAACTTGTGTTAATGGAATGCTAACAAAATCATTGTTGGTCAATGCATAGGTATGAAG
 GAATCAAGT**GAGTTTGTCTGAGGAATTATTTGATGCT**CTAGCTAGGAAGAGATGCATCACA
 TCTCCCGCGGT**GACTAAAGATGAGCTACGCGAATT**CTGGGAACAAATAACAGATACTAGC
 TTTGATGCCCGGCTGCAAACCTTCTTCTGACATGGTGGACAAAGATGCAGATGGGAGAATT
 ACTCAAGAAGAGGTTGAAAGAGATCATCAGTCTTAGTG

Forward: stnox-CCCCF

gagtttgctgaggaattatTTGATGCT

Reverse: stnox-CCCCR

aattcgcgtagctcatctTTAGTCA

Taq-Man-Sonde: stnox-CCCM1-FAM

atgcatcacatctccc

A-VII: Primer und Annealing-Temperaturen

Gen	Genbank-Nr.	Primer	Primer-Sequenz (5'-3')	AT (°C)	Fragmente [bp]	Anzahl Cyclen
StAOS2	AJ457081	StAOS2fwd	ttctctcaccacaacaattccat	50	450	36
		StAOS2rev	ttcaatthttcatggttggttc			
StAOC	AY135641	StAOC_5	tcttcctcatacaagctac	48	406	33
		StAOC_3cacc	caccctgtaaacagcttcatag			
StOPR3		StOPR3_5	gcttgccatcttcatgtaacac	52	355	33
		StOPR3_3cacc	cacctccattgctccatttccttgaag			
StCOI1		StCOI1_5	cgtagaatgattgtagagattcg	50	333	33
		StCOI1_3cacc	caccacactcgtaatttcatagagac			
StLOX3	X96406	StLoxH3_5	ggagagtcgtgtggagaagc	50	450	33
		StLoxH3_3	tgagggccatagatttcagg			
StEF1a		StEF1a_5	TGACAAACTTAAGGCTGAACGTGAG	52	724	30-33
		StEF1a_3	CTTAACATTGAACCCAACATTGTCAC			
		StEF1a_FF	ccttgacgctcttgaccagattaa	-	256 (+StEF1a_3)	(qPCR)
StZIM		StZIMRNAi_5	GAAATTGTAATGGGGAGCTTAGG	52	361	36
		StZIMRNAi_3cacc	caccTGATATGGCGAAATTGTTTCA			
		StZIMout_3	AATGGAACATAAATTAAGCTAGTGATGA	52	385 (+StZIMRNAi_5)	36
		StZIMqPCR_5	GAAATTGTAATGGGGAGCTTAGG	-	185	(qPCR)
StZIMqPCR_3	TGATATGGCGAAATTGTTTCA					
StAP2TF		StAP2TF_5	CACCACCACAATGGAAGATG	52	413	36
		StAP2TF_3cacc	GCATTCAATTACCTCCGATG			
		StAPTFout_5	GAGCGTTCCTAGAGACTCTCCTCCTC	52	343	36
StAPTFout_3	TGATACTCCCCTTAAAACCCACTAC					
StABC		StABC_5	TCGATTTCGAGATTGTTGAAAG	52	413	27-30
		StABC_3cacc	caccGATTTCGATAACTTGGCTGATG			
		StABCqPCR_5	GAACCAACCTCAGGTCTTGATTTCG	-	163	(qPCR)
		StABCqPCR_3	CGTTTGACCACGGGACAAGG			
StTUBBY		StTUBBY_5n	GCTGTAACATTCATGCCTACCATC	52	308	36
		StTUBBY_3caccn	caccGTTGTAGAATGTTGCCTTCCAT			
		StTUBBYqPCR_5	CCGCAGATTGGGAGGAGCA	-	181	(qPCR)
		StTUBBYqPCR_3	GAATGTTGCCTTCCATTTTCTCCA			
StUBOX		StUBOX_5	GACGATTAATCCAATCGTGGTGT	52	380	36
		StUBOX_3cacc	CACCTCAATGACTCAATGAATTCTCCA			
		StUBOXout_5	GATCCCTGTCACGATCTTCAACTG	52	213	36
		StUBOXout_3	AGGCTTTGGTGTAGGGAACCTTTC			
StMYH19		StMYH19_5	TCAGTACCAGAGGAACAGCAAAGTG	52	385	36
		StMYH19_3cacc	CACCACGACTCCCTTTCTTACGAGT			
StMAPKKK		StMAPKKK_5	GAGATGGACAGCTGAGATGCTTC	52	423	36
		StMAPKKK_3cacc	CACCAAATGGCCTAGCCTAATCACT			
StMYST1		StMYST1_5	TCTTTGCTCATGTAACCAGGAA	52	375	36
		StMYST1_3cacc	caccGAGGTCCTTCCAACGAATG			
BcCutA	Z69264	BcCutA_5 (=CG11)	agccttatgtcccctcccttg	-	58	(qPCR)
		BcCutA_3_58 (CG12)	gaagagaaatggaaaatggtgag			
		BcCutA_3_600	catatcacctcccgtttcct	48	600 (+ Bc_CutA_5)	40
StRbohB	AB050661	stnox-CCCCF	gagtttgctgaggaattatttgatgct	-	60	(qPCR)
		stnox-CCCCR	aattcgctgactcatcttttagtca			
		stnox-CCCCM1-FAM	atgcatcacatctccc			
Pi08-3		Pi08-3_F	CAATTCGCCACCTTCTTCGA	-	60	(qPCR)
		Pi08-3_R	GCCTTCCTGCCCTCAAGAAC			
		Pi08-3_FAM	CGTACGGCCAATGTA			

A-VIII: Verwendete Sonden

Gen	Accession-No.
StCAO	TC130280
StAOS2	AJ457081
StLOX3	X96406
StLOX1	AAB67865
StPR1	TC126356
StPR5	TC112036
StPR10	TC179748
StPIN2	X04118

A-IX:

Tabelle 1: OPDA-, JA- bzw. JA-Ile-Akkumulation in Pep-13 behandelten Kartoffelpflanzen

Übersicht Experiment 1: Blätter von Wildtyp Kartoffelpflanzen wurden mit 100 µM Pep-13 bzw. W2A vollständig infiltriert. Die aus den GC-MS-Daten erhaltenen Mittelwerte und Standardfehler sowie die mittels einseitiger t-Test-Statistik (n=3) errechneten Signifikanzklassen sind dargestellt.

Behandlung	hpi	OPDA		JA		JA-Ile	
		[nmol/gFW]	SE	[nmol/gFW]	SE	[nmol/gFW]	SE
-	0	1,44	0,3	0,06	0,0	0,01	0,00
Pep-13	3	2,04	0,3	0,37	0,1	0,03	0,01
Pep-13	6	2,34	0,7	0,25	0,1	0,05	0,02
Pep-13	9	3,20	0,5	0,23	0,0	0,03	0,01
Pep-13	12	2,32	0,2	0,24	0,2	0,06	0,03
Pep-13	24	7,39	1,9	9,53	1,3	1,40	0,17
Pep-13	48	13,27	4,1	16,76	5,2	4,02	1,38
W2A	3	1,83	0,2	0,16	0,1	0,06	0,04
W2A	6	2,05	0,4	0,09	0,0	0,04	0,00
W2A	9	2,05	0,4	0,11	0,0	0,04	0,01
W2A	12	1,25	0,3	0,04	0,0	0,02	0,01
W2A	24	2,06	1,2	0,19	0,1	0,03	0,01
W2A	48	1,87	0,3	0,35	0,1	0,19	0,04

n=3; t-Test zum Signifikanzniveau 95%;

A-X:

Tabelle 2: Quantifizierung der nekrotischen Blattfläche nach Pep-13-Infiltration

	Kontrollen									StAOC-RNAi					
	WT			B2			E4			F1			Z4		
	MW	SE		MW	SE		MW	SE		MW	SE		MW	SE	
Exp. 1	9915	4332	a	12736	3513	a	12117	4405	a	5166	2044	b	3207	1391	b
Exp. 2	23233	14778	a	21486	7387	a	15712	10405	a	6943	2868	b	10992	3311	b
Exp. 3	19998	6148	a	19890	5725	a				8597	4428	b	13624	3597	b

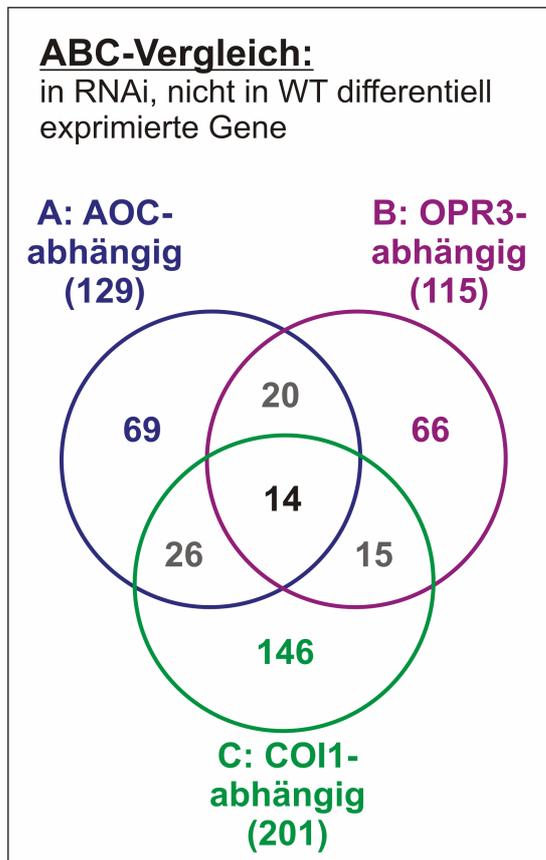
	StOPR3-RNAi						StCOI1-RNAi					
	A3			Z2			H1			X5		
	MW	SE		MW	SE		MW	SE		MW	SE	
Exp. 1	3530	817	b	3202	1162	b	4383	2023	b	2419	651	b
Exp. 2	10207	5311	b	6949	1372	b	6148	2820	b	5316	1215	b
Exp. 3	8724	3644	b	12888	3720	b	8308	3083	b	4114	1773	b

Einfaktorielle Varianzanalyse, Dunnett's post hoc Test ($p < 0.05$)

A-XI:

In Pep-13-behandelten RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp fehl-regulierte Gene

Die Mengen A, B und C (s. Abb. C-14, B-D) als Menge der nach Pep-13-Infiltration in den jeweiligen RNAi-Linien differentiell exprimierten Gene, die aber im Wildtyp nicht signifikant differentiell reguliert sind wurden in einem neuen Venn-Diagramm zusammengefasst.



- 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. *Plant J* **48**: 28-44
- Adie B. A., Perez-Perez J., Perez-Perez M. M., Godoy M., Sanchez-Serrano J. J., Schmelz E. A., Solano R. (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 1665-1681
- Anderson J. P., Badruzaufari E., Schenk P. M., Manners J. M., Desmond O. J., Ehlert C., Maclean D. J., Ebert P. R., Kazan K. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 3460-3479
- Andersson M. X., Kourtchenko O., Dangl J. L., Mackey D., Ellerstrom M. (2006) Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **47**: 947-959
- Asai S., Ohta K., Yoshioka H. (2008) MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **20**: 1390-1406
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M., Sheen J. (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977-983
- Audenaert K., De Meyer G. B., Hofte M. M. (2002) Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol* **128**: 491-501
- Baker A., Graham I. A., Holdsworth M., Smith S. M., Theodoulou F. L. (2006) Chewing the fat: beta-oxidation in signalling and development. *Trends Plant Sci* **11**: 124-132
- Ballvora A., Ercolano M. R., Weiss J., Meksem K., Bormann C. A., Oberhagemann P., Salamini F., Gebhardt C. (2002) The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J* **30**: 361-371
- Bar M., Avni A. (2009) EHD2 inhibits ligand-induced endocytosis and signaling of the leucine-rich repeat receptor-like protein LeEix2. *Plant J*
- Bari R., Jones J. D. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* **69**: 473-488
- Bednarek P., Osbourn A. (2009) Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* **324**: 746-748
- Bednarek P., Pislewska-Bednarek M., Svatos A., Schneider B., Doubsky J., Mansurova M., Humphry M., Consonni C., Panstruga R., Sanchez-Vallet A., Molina A., Schulze-Lefert P. (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* **323**: 101-106
- Bednarek P., Schulze-Lefert P. (2009) Role of plant secondary metabolites at the host-pathogen interface. In J Parker, ed, *Molecular aspects of plant disease resistance (Annual plant reviews)*, Vol 34. Wiley-Blackwell, pp 220-250
- Benschop J. J., Mohammed S., O'Flaherty M., Heck A. J., Slijper M., Menke F. L. (2007) Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1198-1214
- Berrocal-Lobo M., Molina A., Solano R. (2002) Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* **29**: 23-32
- Bethke G., Unthan T., Uhrig J. F., Poschl Y., Gust A. A., Scheel D., Lee J. (2009) Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *PNAS* **106**: 8067-8072
- Bhattacharjee S., Hiller N. L., Liolios K., Win J., Kanneganti T. D., Young C., Kamoun S., Haldar K. (2006) The malarial host-targeting signal is conserved in the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog* **2**: e50
- Birch P. R., Armstrong M., Bos J., Boevink P., Gilroy E. M., Taylor R. M., Wawra S., Pritchard L., Conti L., Ewan R., Whisson S. C., van West P., Sadanandom A.,

- Kamoun S.** (2009) Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *J Exp Bot* **60**: 1133-1140
- Birch P. R., Boevink P. C., Gilroy E. M., Hein I., Pritchard L., Whisson S. C.** (2008) Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 373-379
- Blechert S., Bockelmann C., Fusslein M., Von Schrader T., Stelmach B., Niesel U., Weiler E. W.** (1999) Structure-activity analyses reveal the existence of two separate groups of active octadecanoids in elicitation of the tendril-coiling response of *Bryonia dioica* Jacq. *Planta* **207**: 470-479
- Blechert S., Brodschelm W., Holder S., Kammerer L., Kutchan T. M., Mueller M. J., Xia Z. Q., Zenk M. H.** (1995) The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *PNAS* **92**: 4099-4105
- Block A., Li G., Fu Z. Q., Alfano J. R.** (2008) Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 396-403
- Block A., Schmelz E., Jones J. B., Klee H. J.** (2005) Coronatine and salicylic acid: the battle between Arabidopsis and Pseudomonas for phytohormone control. *Mol Plant Pathol* **6**: 79-83
- Blume B., Nürnberger T., Nass N., Scheel D.** (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**: 1425-1440
- Boller T., Felix G.** (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 379-406
- Boller T., He S. Y.** (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* **324**: 742-744
- Bos J. I., Kanneganti T. D., Young C., Cakir C., Huitema E., Win J., Armstrong M. R., Birch P. R., Kamoun S.** (2006) The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **48**: 165-176
- Brader G., Tas E., Palva E. T.** (2001) Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in Arabidopsis by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiol* **126**: 849-860
- Brodersen P., Petersen M., Bjorn Nielsen H., Zhu S., Newman M. A., Shokat K. M., Rietz S., Parker J., Mundy J.** (2006) Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J* **47**: 532-546
- Brown R. L., Kazan K., McGrath K. C., Maclean D. J., Manners J. M.** (2003) A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1.2* gene of Arabidopsis. *Plant Physiol* **132**: 1020-1032
- Browse J.** (2008) Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annu Rev Plant Biol*
- Brunner F., Rosahl S., Lee J., Rudd J. J., Geiler C., Kauppinen S., Rasmussen G., Scheel D., Nürnberger T.** (2002) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *Embo Journal* **21**: 6681-6688
- Büttner D., Bonas U.** (2002) Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *Embo J* **21**: 5313-5322
- Büttner D., Bonas U.** (2006) Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol* **9**: 193-200
- Chang J. H., Rathjen J. P., Bernal A. J., Staskawicz B. J., Michelmore R. W.** (2000) avrPto enhances growth and necrosis caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato lines lacking either *Pto* or *Prf*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 568-571
- Chen Z., Agnew J. L., Cohen J. D., He P., Shan L., Sheen J., Kunkel B. N.** (2007) *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *PNAS* **104**: 20131-20136

- Cheong Y. H., Chang H. S., Gupta R., Wang X., Zhu T., Luan S.** (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**: 661-677
- Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J. D. G., Felix G., Boller T.** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497-U412
- Chini A., Fonseca S., Chico J. M., Fernandez-Calvo P., Solano R.** (2009) The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *Plant J*
- Chini A., Fonseca S., Fernandez G., Adie B., Chico J. M., Lorenzo O., Garcia-Casado G., Lopez-Vidriero I., Lozano F. M., Ponce M. R., Micol J. L., Solano R.** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671
- Chinnusamy V., Zhu J. K.** (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 133-139
- Chisholm S. T., Coaker G., Day B., Staskawicz B. J.** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803-814
- Chow B., McCourt P.** (2006) Plant hormone receptors: perception is everything. *Genes Dev* **20**: 1998-2008
- Chung H. S., Howe G. A.** (2009) A Critical Role for the TIFY Motif in Repression of Jasmonate Signaling by a Stabilized Splice Variant of the JASMONATE ZIM-Domain Protein JAZ10 in Arabidopsis. *Plant Cell*
- Chung H. S., Koo A. J., Gao X., Jayanty S., Thines B., Jones A. D., Howe G. A.** (2008) Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* **146**: 952-964
- Clarke S. M., Cristescu S. M., Miersch O., Harren F. J., Wasternack C., Mur L. A.** (2009) Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **182**: 175-187
- Clay N. K., Adio A. M., Denoux C., Jander G., Ausubel F. M.** (2009) Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science* **323**: 95-101
- Cohen Y. R.** (2002) beta-aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens (vol 86, pg 448, 2002). *Plant Disease* **86**: 691-691
- Colcombet J., Hirt H.** (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* **413**: 217-226
- Collins N. C., Thordal-Christensen H., Lipka V., Bau S., Kombrink E., Qiu J. L., Huckelhoven R., Stein M., Freialdenhoven A., Somerville S. C., Schulze-Lefert P.** (2003) SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* **425**: 973-977
- Damasceno C. M., Bishop J. G., Ripoll D. R., Win J., Kamoun S., Rose J. K.** (2008) Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from phytophthora species suggests coevolution with plant endo-beta-1,3-glucanases. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 820-830
- Dangl J. L., Jones J. D.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833
- de Torres-Zabala M., Truman W., Bennett M. H., Lafforgue G., Mansfield J. W., Rodriguez Egea P., Bogre L., Grant M.** (2007) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *Embo J* **26**: 1434-1443
- De Vos M., Van Oosten V. R., Van Poecke R. M. P., Van Pelt J. A., Pozo M. J., Mueller M. J., Buchala A. J., Metraux J. P., Van Loon L. C., Dicke M., Pieterse C. M. J.** (2005) Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 923-937
- del Pozo O., Pedley K. F., Martin G. B.** (2004) MAPKKK alpha is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *Embo Journal* **23**: 3072-3082
- Denoux C., Galletti R., Mammarella N., Gopalan S., Werck D., De Lorenzo G., Ferrari S., Ausubel F. M., Dewdney J.** (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular Plant* **1**: 423-445

- Desaki Y., Miya A., Venkatesh B., Tsuyumu S., Yamane H., Kaku H., Minami E., Shibuya N.** (2006) Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. *Plant Cell Physiol* **47**: 1530-1540
- Deslandes L., Olivier J., Peeters N., Feng D. X., Khounlotham M., Boucher C., Somssich I., Genin S., Marco Y.** (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *PNAS* **100**: 8024-8029
- Devoto A., Ellis C., Magusin A., Chang H. S., Chilcott C., Zhu T., Turner J. G.** (2005) Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* **58**: 497-513
- Devoto A., Nieto-Rostro M., Xie D. X., Ellis C., Harmston R., Patrick E., Davis J., Sherratt L., Coleman M., Turner J. G.** (2002) COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *Plant J* **32**: 457-466
- Dicke M., van Loon J. J., Soler R.** (2009) Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat Chem Biol* **5**: 317-324
- Diekmann W., Herkt B., Low P. S., Nürnberger T., Scheel D., Terschuren C., Robinson D. G.** (1994) Visualization Of Elicitor-Binding Loci At The Plant-Cell Surface. *Planta* **195**: 126-137
- Dodds P. N., Lawrence G. J., Catanzariti A. M., Teh T., Wang C. I., Ayliffe M. A., Kobe B., Ellis J. G.** (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *PNAS* **103**: 8888-8893
- Dong X., Stothard P., Forsythe I. J., Wishart D. S.** (2004) PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res* **32**: W660-664
- Dorey S., Kopp M., Geoffroy P., Fritig B., Kauffmann S.** (1999) Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiol* **121**: 163-172
- Dreher K., Callis J.** (2007) Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann Bot (Lond)* **99**: 787-822
- Eberharter A., Becker P. B.** (2002) Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* **3**: 224-229
- Egusa M., Ozawa R., Takabayashi J., Otani H., Kodama M.** (2009) The jasmonate signaling pathway in tomato regulates susceptibility to a toxin-dependent necrotrophic pathogen. *Planta* **229**: 965-976
- Engelhardt S., Lee J., Gabler Y., Kemmerling B., Haapalainen M. L., Li C. M., Wei Z. M., Keller H., Joosten M., Taira S., Nurnberger T.** (2009) Separable roles of the *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* accessory protein HrpZ1 in ion-conducting pore formation and activation of plant immunity. *Plant J* **57**: 706-717
- Enkerli J., Felix G., Boller T.** (1999) The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiol* **121**: 391-397
- Eschen-Lippold L., Rothe G., Stumpe M., Göbel C., Feussner I., Rosahl S.** (2007) Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants. *Phytochemistry* **68**: 797-801
- Farmaki T., Sanmartin M., Jimenez P., Paneque M., Sanz C., Vancanneyt G., Leon J., Sanchez-Serrano J. J.** (2007) Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *J Exp Bot* **58**: 555-568
- Farmer E. E., Davoine C.** (2007) Reactive electrophile species. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 380-386
- Fauconnier M. L., Rojas-Beltran J., Dupuis B., Delaplace P., Frettinger P., Gosset V., du Jardin P.** (2008) Changes in oxylipin synthesis after *Phytophthora infestans* infection of potato leaves do not correlate with resistance. *Plant Physiol Biochem* **46**: 823-831

- Felix G., Boller T.** (2003) Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem* **278**: 6201-6208
- Felix G., Duran J. D., Volko S., Boller T.** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**: 265-276
- Feussner I., Wasternack C.** (2002) The lipoxygenase pathway. *Ann Rev Plant Biol* **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. *Plant Cell* **6**: 751-759
- Feys B. J., Parker J. E.** (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet* **16**: 449-455
- Fonseca S., Chini A., Hamberg M., Adie B., Porzel A., Kramell R., Miersch O., Wasternack C., Solano R.** (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* **5**: 344-350
- Fontanilla J. M., Montes M., De Prado R.** (2005) Induction of resistance to the pathogenic agent *Botrytis cinerea* in the cultivation of the tomato by means of the application of the protein "Harpin"(Messenger). *Commun Agric Appl Biol Sci* **70**: 35-40
- Fry W.** (2008) *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol Plant Pathol* **9**: 385-402
- Gachon C., Saindrenan P.** (2004) Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol Biochem* **42**: 367-371
- 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
- Gao X., Shim W. B., Göbel C., Kunze S., Feussner I., Meeley R., Balint-Kurti P., Kolomiets M.** (2007) Disruption of a maize 9-lipoxygenase results in increased resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with mycotoxin fumonisin. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 922-933
- Gao X., Starr J., Göbel C., Engelberth J., Feussner I., Tumlinson J., Kolomiets M.** (2008) Maize 9-lipoxygenase ZmLOX3 controls development, root-specific expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 98-109
- Gaulin E., Drame N., Lafitte C., Torto-Alalibo T., Martinez Y., Ameline-Torregrosa C., Khatib M., Mazarguil H., Villalba-Mateos F., Kamoun S., Mazars C., Dumas B., Bottin A., Esquerre-Tugaye M. T., Rickauer M.** (2006) Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *Plant Cell* **18**: 1766-1777
- Gaulin E., Jauneau A., Villalba F., Rickauer M., Esquerre-Tugaye M. T., Bottin A.** (2002) The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *J Cell Sci* **115**: 4565-4575
- Gechev T. S., Van Breusegem F., Stone J. M., Denev I., Laloi C.** (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* **28**: 1091-1101
- Geiler C.** (2001) Induktion von Abwehrreaktionen in *Solanum tuberosum* L. durch den Oligopeptid-Elicitor Pep-13 aus *Phytophthora sojae*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Gimenez-Ibanez S., Hann D. R., Ntoukakis V., Petutschnig E., Lipka V., Rathjen J. P.** (2009) AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr Biol* **19**: 423-429
- Glawischnig E.** (2007) Camalexin. *Phytochemistry* **68**: 401-406
- Glazebrook J.** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205-227
- Glazebrook J., Chen W., Estes B., Chang H. S., Nawrath C., Metraux J. P., Zhu T., Katagiri F.** (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J* **34**: 217-228

- Göbel C. (2001) Untersuchungen zur Funktion von Oxylipinen bei der Pathogenantwort in *Solanum tuberosum* L. Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Göbel C., Feussner I., Hamberg M., Rosahl S. (2002) Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1584**: 55-64
- Göbel C., Feussner I., Rosahl S. (2003) Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. *J Biol Chem* **278**: 52834-52840
- Göbel C., Feussner I., Schmidt A., Scheel D., Sanchez-Serrano J., Hamberg M., Rosahl S. (2001) Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J Biol Chem* **276**: 6267-6273
- Göhre V., Robatzek S. (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 189-215
- Göhre V., Spallek T., Haweker H., Mersmann S., Mentzel T., Boller T., de Torres M., Mansfield J. W., Robatzek S. (2008) Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol* **18**: 1824-1832
- Gómez-Gómez L., Boller T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* **5**: 1003-1011
- Gómez-Gómez L., Felix G., Boller T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**: 277-284
- Gonzalez-Lamothe R., Tsitsigiannis D. I., Ludwig A. A., Panicot M., Shirasu K., Jones J. D. (2006) The U-box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato. *Plant Cell* **18**: 1067-1083
- Gonzalez-Teuber M., Eilmus S., Muck A., Svatos A., Heil M. (2009) Pathogenesis-related proteins protect extrafloral nectar from microbial infestation. *Plant J* **58**: 464-473
- Govrin E. M., Levine A. (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* **10**: 751-757
- Granado J., Felix G., Boller T. (1995) Perception of Fungal Sterols in Plants (Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells). *Plant Physiol* **107**: 485-490
- Grunewald W., Vanholme B., Pauwels L., Plovie E., Inze D., Gheysen G., Goossens A. (2009) Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Rep*
- Gust A. A., Biswas R., Lenz H. D., Rauhut T., Ranf S., Kemmerling B., Gotz F., Glawischnig E., Lee J., Felix G., Nurnberger T. (2007) Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *J Biol Chem* **282**: 32338-32348
- Halim V. A. (2006) The Role of Salicylic Acid and Octadecanoids for Pathogen Defense in Potato. Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Halim V. A., Altmann S., Ellinger D., Eschen-Lippold L., Miersch O., Scheel D., Rosahl S. (2009) PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *Plant J* **57**: 230-242
- Halim V. A., Eschen-Lippold L., Altmann S., Birschwilks M., Scheel D., Rosahl S. (2007) Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1346-1352
- Halim V. A., Hunger A., Macioszek V., Landgraf P., Nürnberger T., Scheel D., Rosahl S. (2004) The oligopeptide elicitor Pep-13 induces salicylic acid-dependent and -independent defense reactions in potato. *Phys Mol Plant Pathol* **64**: 311-318
- Halim V. A., Vess A., Scheel D., Rosahl S. (2006) The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biol* **8**: 307-313
- Hamberg M., Sanz A., Castresana C. (1999) alpha-oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an alpha-dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J Biol Chem* **274**: 24503-24513
- Hann D. R., Rathjen J. P. (2007) Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **49**: 607-618

- Hardham A. R., Jones D. A., Takemoto D.** (2007) Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 342-348
- Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I.** (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* **305**: 855-858
- Hause B., Maier W., Miersch O., Kramell R., Strack D.** (2002) Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol* **130**: 1213-1220
- He P., Shan L., Sheen J.** (2007) Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell Microbiol* **9**: 1385-1396
- He S. Y., Huang H. C., Collmer A.** (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**: 1255-1266
- He Y., Fukushige H., Hildebrand D. F., Gan S.** (2002) Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *Plant Physiol* **128**: 876-884
- Heese A., Hann D. R., Gimenez-Ibanez S., Jones A. M., He K., Li J., Schroeder J. I., Peck S. C., Rathjen J. P.** (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *PNAS* **104**: 12217-12222
- Höfgen R., Willmitzer L.** (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic Acids Res* **16**: 9877
- Hogenhout S. A., Van der Hoorn R. A., Terauchi R., Kamoun S.** (2009) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 115-122
- Howe G. A.** (2004) Jasmonates as signals in the wound response. *J Plant Growth Regul* **23**: 223-237
- Howe G. A., Lee G. I., Itoh A., Li L., DeRocher A. E.** (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol* **123**: 711-724
- Hyun Y., Choi S., Hwang H. J., Yu J., Nam S. J., Ko J., Park J. Y., Seo Y. S., Kim E. Y., Ryu S. B., Kim W. T., Lee Y. H., Kang H., Lee I.** (2008) Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Dev Cell* **14**: 183-192
- Isayenkov S., Mrosk C., Stenzel I., Strack D., Hause B.** (2005) Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiol* **139**: 1401-1410
- Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K.** (2001) The DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 2191-2209
- Ito Y., Kaku H., Shibuya N.** (1997) Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *Plant J* **12**: 347-356
- Jabs T., Tschöpe M., Colling C., Hahlbrock K., Scheel D.** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *PNAS* **94**: 4800-4805
- Jakab G., Cottier V., Toquin V., Rigoli G., Zimmerli L., Mettraux J. P., Mauch-Mani B.** (2001) beta-Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur J Plant Pathol* **107**: 29-37
- Jakab G., Ton J., Flors V., Zimmerli L., Mettraux J. P., Mauch-Mani B.** (2005) Enhancing Arabidopsis salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol* **139**: 267-274
- Jiang R. H., Tripathy S., Govers F., Tyler B. M.** (2008) RXLR effector reservoir in two Phytophthora species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *PNAS* **105**: 4874-4879
- Jones J. D., Dangl J. L.** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329
- Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiyama C., Dohmae N., Takio K., Minami E., Shibuya N.** (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *PNAS* **103**: 11086-11091

- Kamoun S, Smart C D** (2005) Late Blight of Potato and Tomato in the Genomics Era. *Plant Disease* **89**: 692-699
- Kamoun S.** (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Ann Rev Phytopathol* **44**: 41-60
- Kamoun S.** (2007) Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 358-365
- Kamoun S., Klucher K. M., Coffey M. D., Tyler B. M.** (1993) A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact* **6**: 573-581
- Kamoun S., Lindqvist H., Govers F.** (1997) A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 1028-1030
- Kamoun S., van West P., Vleeshouwers V. G., de Groot K. E., Govers F.** (1998) Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* **10**: 1413-1426
- Kanneganti T. D., Huitema E., Cakir C., Kamoun S.** (2006) Synergistic interactions of the plant cell death pathways induced by *Phytophthora infestans* Nepl-like protein PiNPP1.1 and INF1 elicitor. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 854-863
- Kanzaki H., Saitoh H., Ito A., Fujisawa S., Kamoun S., Katou S., Yoshioka H., Terauchi R.** (2003) Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol* **4**: 383-391
- Kanzaki H., Saitoh H., Takahashi Y., Berberich T., Ito A., Kamoun S., Terauchi R.** (2008) NbLRK1, a lectin-like receptor kinase protein of *Nicotiana benthamiana*, interacts with *Phytophthora infestans* INF1 elicitor and mediates INF1-induced cell death. *Planta* **228**: 977-987
- Katou S., Yoshioka H., Kawakita K., Rowland O., Jones J. D., Mori H., Doke N.** (2005) Involvement of PPS3 phosphorylated by elicitor-responsive mitogen-activated protein kinases in the regulation of plant cell death. *Plant Physiol* **139**: 1914-1926
- Katsir L., Chung H. S., Koo A. J., Howe G. A.** (2008a) Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 428-435
- Katsir L., Schillmiller A. L., Staswick P. E., He S. Y., Howe G. A.** (2008b) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *PNAS* **105**: 7100-7105
- Kawamura Y., Hase S., Takenaka S., Kanayama Y., Yoshioka H., Kamoun S., Takahashi H.** (2009) INF1 Elicitor Activates Jasmonic Acid- and Ethylene-mediated Signalling Pathways and Induces Resistance to Bacterial Wilt Disease in Tomato. *J Phytopathol* **157**: 287-297
- Kay S., Hahn S., Marois E., Hause G., Bonas U.** (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**: 648-651
- Kessler A., Halitschke R., Baldwin I. T.** (2004) Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science* **305**: 665-668
- Khatib M., Lafitte C., Esquerre-Tugaye M. T., Bottin A., Rickauer M.** (2004) The CBEL elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* activates defence in *Arabidopsis thaliana* via three different signalling pathways. *New Phytologist* **162**: 501-510
- Kirsch C., Logemann E., Lippok B., Schmelzer E., Hahlbrock K.** (2001) A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated CMPG1 gene in *Petroselinum crispum*. *Plant J* **26**: 217-227
- Kliebenstein D. J., Rowe H. C.** (2008) Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. *Plant Science* **174**: 551-556
- 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. *Plant J* **26**: 509-522
- Kloosterman B., De Koeyer D., Griffiths R., Flinn B., Steuernagel B., Scholz U., Sonnewald S., Sonnewald U., Bryan G. J., Prat S., Banfalvi Z., Hammond J. P., Geigenberger P.,**

- Nielsen K. L., Visser R. G., Bachem C. W. (2008) Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using the POCI array. *Funct Integr Genomics* **8**: 329-340
- Knight V. I., Wang H., Lincoln J. E., Lulai E. C., Gilchrist D. G., Bostock R. M. (2001) Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts. *Phys Mol Plant Pathol* **59**: 277-286
- Kolomiets M. V., Hannapel D. J., Chen H., Tymeson M., Gladon R. J. (2001) Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* **13**: 613-626
- Koornneef A., Leon-Reyes A., Ritsema T., Verhage A., Den Otter F. C., Van Loon L. C., Pieterse C. M. (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* **147**: 1358-1368
- Kou Y., Qiu D., Wang L., Li X., Wang S. (2009) Molecular analyses of the rice tubby-like protein gene family and their response to bacterial infection. *Plant Cell Rep* **28**: 113-121
- Kourtchenko O., Andersson M. X., Hamberg M., Brunnstrom A., Gobel C., McPhail K. L., Gerwick W. H., Feussner I., Ellerstrom M. (2007) Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in Arabidopsis: jasmonate signaling dependence. *Plant Physiol* **145**: 1658-1669
- Krinke O., Flemr M., Vergnolle C., Collin S., Renou J. P., Taconnat L., Yu A., Burketova L., Valentova O., Zachowski A., Ruelland E. (2009) Phospholipase D activation is an early component of the salicylic acid signaling pathway in Arabidopsis cell suspensions. *Plant Physiol* **150**: 424-436
- Kroj T., Rudd J. J., Nürnberger T., Gabler Y., Lee J., Scheel D. (2003) Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J Biol Chem* **278**: 2256-2264
- Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T., Felix G. (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* **16**: 3496-3507
- Kusaba M. (2004) RNA interference in crop plants. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 139-143
- Kusaba M., Miyahara K., Iida S., Fukuoka H., Takano T., Sassa H., Nishimura M., Nishio T. (2003) Low glutelin content1: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. *Plant Cell* **15**: 1455-1467
- Kwon C., Bednarek P., Schulze-Lefert P. (2008) Secretory pathways in plant immune responses. *Plant Physiol* **147**: 1575-1583
- La Camera S., Balague C., Göbel C., Geoffroy P., Legrand M., Feussner I., Roby D., Heitz T. (2009) The Arabidopsis patatin-like protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 469-481
- Lai C. P., Lee C. L., Chen P. H., Wu S. H., Yang C. C., Shaw J. F. (2004) Molecular analyses of the Arabidopsis TUBBY-like protein gene family. *Plant Physiol* **134**: 1586-1597
- Landgraf P., Feussner I., Hunger A., Scheel D., Rosahl S. (2002) Systemic accumulation of 12-oxo-phytodienoic acid in SAR-induced potato plants. *Eur J Plant Pathol* **108**: 279-283
- Laudert D., Weiler E. W. (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J* **15**: 675-684
- 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*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 789-800
- Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R., Pugin A. (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* **14**: 2627-2641
- Leon-Reyes A., Spoel S. H., De Lange E. S., Abe H., Kobayashi M., Tsuda S., Millenaar F. F., Welschen R. A., Ritsema T., Pieterse C. M. (2009) Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol* **149**: 1797-1809

- Li J., Brader G., Kariola T., Palva E. T.** (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* **46**: 477-491
- Li J., Brader G., Palva E. T.** (2004a) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* **16**: 319-331
- Li L., Zhao Y., McCaig B. C., Wingerd B. A., Wang J., Whalon M. E., Pichersky E., Howe G. A.** (2004b) The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* **16**: 126-143
- Libault M., Wan J., Czechowski T., Udvardi M., Stacey G.** (2007) Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 900-911
- Ligterink W., Kroj T., zur Nieden U., Hirt H., Scheel D.** (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**: 2054-2057
- Lipka V., Dittgen J., Bednarek P., Bhat R., Wiermer M., Stein M., Landtag J., Brandt W., Rosahl S., Scheel D., Llorente F., Molina A., Parker J., Somerville S., Schulze-Lefert P.** (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. *Science* **310**: 1180-1183
- Liu Y., Ren D., Pike S., Pallardy S., Gassmann W., Zhang S.** (2007) Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J* **51**: 941-954
- Livaja M., Zeidler D., von Rad U., Durner J.** (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to the bacteria-derived PAMPs harpin and lipopolysaccharide. *Immunobiology* **213**: 161-171
- Lorenzo O., Chico J. M., Sanchez-Serrano J. J., Solano R.** (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1938-1950
- Lorenzo O., Piqueras R., Sanchez-Serrano J. J., Solano R.** (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165-178
- Ma W., Guttman D. S.** (2008) Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 412-419
- Mackey D., Holt B. F., 3rd, Wiig A., Dangl J. L.** (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**: 743-754
- Mateos VF., Rickauer M., Esquerre-Tugaye M. T.** (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding an elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* that shows cellulose-binding and lectin-like activities. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 1045-1053
- McConn M., Browse J.** (1996) The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant. *Plant Cell* **8**: 403-416
- McGrath K. C., Dombrecht B., Manners J. M., Schenk P. M., Edgar C. I., Maclean D. J., Scheible W. R., Udvardi M. K., Kazan K.** (2005) Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiol* **139**: 949-959
- Melotto M., Mecey C., Niu Y., Chung H. S., Katsir L., Yao J., Zeng W., Thines B., Staswick P., Browse J., Howe G. A., He S. Y.** (2008) A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J* **55**: 979-988
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K., He S. Y.** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969-980
- Meyer A., Puhler A., Niehaus K.** (2001) The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **213**: 214-222

- Miersch O., Neumerkel J., Dippe M., Stenzel I., Wasternack C.** (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol* **177**: 114-127
- Miersch O., Weichert H., Stenzel I., Hause B., Maucher H., Feussner I., Wasternack C.** (2004) Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. *Lukullus*) elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves. *Phytochemistry* **65**: 847-856
- Mishina T. E., Zeier J.** (2007) Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant J* **50**: 500-513
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H., Shibuya N.** (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *PNAS* **104**: 19613-19618
- Morrissey J. P., Osbourn A. E.** (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 708-724
- Mou Z., Fan W., Dong X.** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935-944
- Mucyn T. S., Clemente A., Andriotis V. M., Balmuth A. L., Oldroyd G. E., Staskawicz B. J., Rathjen J. P.** (2006) The tomato NBARC-LRR protein Prf interacts with Pto kinase in vivo to regulate specific plant immunity. *Plant Cell* **18**: 2792-2806
- Mueller S., Hilbert B., Dueckershoff K., Roitsch T., Krischke M., Mueller M. J., Berger S.** (2008a) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 768-785
- Mueller S., Hilbert B., Dueckershoff K., Roitsch T., Krischke M., Müller M. J., Berger S.** (2008b) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 768-785
- Müller M. J.** (2004) Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 441-448
- Mur L. A., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C.** (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* **140**: 249-262
- Mur L. A., Kenton P., Lloyd A. J., Ougham H., Prats E.** (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* **59**: 501-520
- Murashige T., Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Navarro L., Bari R., Achard P., Lison P., Nemri A., Harberd N. P., Jones J. D.** (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* **18**: 650-655
- Navarro L., Dunoyer P., Jay F., Arnold B., Dharmasiri N., Estelle M., Voinnet O., Jones J. D.** (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436-439
- Navarro L., Zipfel C., Rowland O., Keller I., Robatzek S., Boller T., Jones J. D.** (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* **135**: 1113-1128
- Ndamukong I., Abdallat A. A., Thurow C., Fode B., Zander M., Weigel R., Gatz C.** (2007) SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive *PDF1.2* transcription. *Plant J* **50**: 128-139
- Nennstiel D., Scheel D., Nürnberger T.** (1998) Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*). *FEBS Lett* **431**: 405-410
- Nicot N., Hausman J. F., Hoffmann L., Evers D.** (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* **56**: 2907-2914
- Nühse T. S., Peck S. C., Hirt H., Boller T.** (2000) Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J Biol Chem* **275**: 7521-7526

- Nürnberg T., Kemmerling B.** (2009) Pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and PAMP-triggered immunity. In J Parker, ed, *Molecular aspects of plant disease resistance (Annual plant reviews)*, Vol 34. Wiley-Blackwell, pp 16-47
- Nürnberg T., Nennstiel D., Hahlbrock K., Scheel D.** (1995) Covalent cross-linking of the *Phytophthora megasperma* oligopeptide elicitor to its receptor in parsley membranes. *PNAS* **92**: 2338-2342
- Nürnberg T., Nennstiel D., Jabs T., Sacks W. R., Hahlbrock K., Scheel D.** (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**: 449-460
- O'Donnell P. J., Schmelz E. A., Moussatche P., Lund S. T., Jones J. B., Klee H. J.** (2003a) Susceptible to intolerance - a range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. *Plant J* **33**: 245-257
- O'Donnell P. J., Schmelz E., Block A., Miersch O., Wasternack C., Jones J. B., Klee H. J.** (2003b) Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiol* **133**: 1181-1189
- Osman H., Vauthrin S., Mikes V., Milat M. L., Panabieres F., Marais A., Brunie S., Maume B., Ponchet M., Blein J. P.** (2001) Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol Biol Cell* **12**: 2825-2834
- Pajeroska-Mukhtar K. M., Mukhtar M. S., Guex N., Halim V. A., Rosahl S., Somssich I. E., Gebhardt C.** (2008) Natural variation of potato *allene oxide synthase 2* causes differential levels of jasmonates and pathogen resistance in Arabidopsis. *Planta* **228**: 293-306
- Panstruga R., Dodds P. N.** (2009) Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science* **324**: 748-750
- Pauw B., Memelink J.** (2004) Jasmonate-responsive gene expression. *J Plant Growth Regul* **23**: 200-210
- Pauwels L., Morreel K., De Witte E., Lammertyn F., Van Montagu M., Boerjan W., Inze D., Goossens A.** (2008) Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. *PNAS* **105**: 1380-1385
- Peart J. R., Lu R., Sadanandom A., Malcuit I., Moffett P., Brice D. C., Schauser L., Jaggard D. A., Xiao S., Coleman M. J., Dow M., Jones J. D., Shirasu K., Baulcombe D. C.** (2002) Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *PNAS* **99**: 10865-10869
- Pedley K. F., Martin G. B.** (2004) Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. *J Biol Chem* **279**: 49229-49235
- Penninckx I. A., Thomma B. P., Buchala A., Metraux J. P., Broekaert W. F.** (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 2103-2113
- Peterhänsel C., Freialdenhoven A., Kurth J., Kolsch R., SchulzeLefert P.** (1997) Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *Plant Cell* **9**: 1397-1409
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H. B., Lacy M., Austin M. J., Parker J. E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A. B., Mundy J.** (2000) Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111-1120
- Picard D.** (2008) A stress protein interface of innate immunity. *EMBO Rep* **9**: 1193-1195
- Pieterse C. M. J., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Van Wees S. C. M.** (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**: 308-316
- Pieterse C. M. J., van Wees S. C. M., van Pelt J. A., Knoester M., Laan R., Gerrits N., Weisbeek P. J., van Loon L. C.** (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 1571-1580
- Pozo M. J., Van Der Ent S., Van Loon L. C., Pieterse C. M. J.** (2008) Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **180**: 511-523

- Pre M., Atallah M., Champion A., De Vos M., Pieterse C. M., Memelink J.** (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* **147**: 1347-1357
- Prost I., Dhondt S., Rothe G., Vicente J., Rodriguez M. J., Kift N., Carbonne F., Griffiths G., Esquerre-Tugaye M. T., Rosahl S., Castresana C., Hamberg M., Fournier J.** (2005) Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol* **139**: 1902-1913
- Qutob D., Kemmerling B., Brunner F., Kufner I., Engelhardt S., Gust A. A., Luberacki B., Seitz H. U., Stahl D., Rauhut T., Glawischnig E., Schween G., Lacombe B., Watanabe N., Lam E., Schlichting R., Scheel D., Nau K., Dodt G., Hubert D., Gijzen M., Nürnberger T.** (2006) Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell* **18**: 3721-3744
- Raacke I. C., Mueller M. J., Berger S.** (2006) Defects in *allene oxide synthase* and *12-oxo-phytodienoic acid reductase* alter the resistance to *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea*. *J Phytopathol* **154**: 740-744
- Ramonell K., Berrocal-Lobo M., Koh S., Wan J., Edwards H., Stacey G., Somerville S.** (2005) Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol* **138**: 1027-1036
- Rancé I., Fournier J., Esquerre-Tugaye M. T.** (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *PNAS* **95**: 6554-6559
- Ren C. M., Zhu Q., Gao B. D., Ke S. Y., Yu W. C., Xie D. X., Peng W.** (2008) Transcription factor WRKY70 displays important but no indispensable roles in jasmonate and salicylic acid signaling. *J Integr Plant Biol* **50**: 630-637
- Ren D., Yang H., Zhang S.** (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**: 559-565
- Ribot C., Zimmerli C., Farmer E. E., Reymond P., Poirier Y.** (2008) Induction of the Arabidopsis *PHO1/H10* gene by 12-oxo-phytodienoic acid but not jasmonic acid via a CORONATINE INSENSITIVE1-dependent pathway. *Plant Physiol* **147**: 696-706
- Ritter A., Goulitquer S., Salaun J. P., Tonon T., Correa J. A., Potin P.** (2008) Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *New Phytol* **180**: 809-821
- Robatzek S., Bittel P., Chinchilla D., Kochner P., Felix G., Shiu S. H., Boller T.** (2007) Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Mol Biol* **64**: 539-547
- Robatzek S., Chinchilla D., Boller T.** (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev* **20**: 537-542
- Römer P., Hahn S., Jordan T., Strauss T., Bonas U., Lahaye T.** (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* **318**: 645-648
- Ron M., Avni A.** (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* **16**: 1604-1615
- Rose J. K., Ham K. S., Darvill A. G., Albersheim P.** (2002) Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell* **14**: 1329-1345
- Rotblat B., Enshell-Seijffers D., Gershoni J. M., Schuster S., Avni A.** (2002) Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J* **32**: 1049-1055
- Royo J., Leon J., Vancanneyt G., Albar J. P., Rosahl S., Ortego F., Castanera P., Sanchez-Serrano J. J.** (1999) Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *PNAS* **96**: 1146-1151
- Royo J., Vancanneyt G., Perez A. G., Sanz C., Stormann 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. *J Biol Chem* **271**: 21012-21019
- Rushton P. J., Torres J. T., Parniske M., Wernert P., Hahlbrock K., Somssich I. E.** (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *Embo J* **15**: 5690-5700
- Samuel M. A., Hall H., Krzymowska M., Drzewiecka K., Hennig J., Ellis B. E.** (2005) SIPK signaling controls multiple components of harpin-induced cell death in tobacco. *Plant J* **42**: 406-416
- Santagata S., Boggon T. J., Baird C. L., Gomez C. A., Zhao J., Shan W. S., Myszkowski D. G., Shapiro L.** (2001) G-protein signaling through tubby proteins. *Science* **292**: 2041-2050
- Sasabe M., Takeuchi K., Kamoun S., Ichinose Y., Govers F., Toyoda K., Shiraishi T., Yamada T.** (2000) Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *Eur J Biochem* **267**: 5005-5013
- Sasabe M., Toyoda K., Shiraishi T., Inagaki Y., Ichinose Y.** (2002) cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: *NtPDR1* is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Lett* **518**: 164-168
- Sasaki-Sekimoto Y., Taki N., Obayashi T., Aono M., Matsumoto F., Sakurai N., Suzuki H., Hirai M. Y., Noji M., Saito K., Masuda T., Takamiya K., Shibata D., Ohta H.** (2005) Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* **44**: 653-668
- Schaller F., Biesgen C., Mussig C., Altmann T., Weiler E. W.** (2000) 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* **210**: 979-984
- Schaller F., Schaller A., Stintzi A.** (2005) Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J Plant Growth Regul* **23**: 179-199
- Schaller F., Zerbe P., Reinbothe S., Reinbothe C., Hofmann E., Pollmann S.** (2008) The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*: localization and cyclization. *FEBS J* **275**: 2428-2441
- 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. *PNAS* **97**: 11655-11660
- Schilmiller A. L., Koo A. J., Howe G. A.** (2007) Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiol* **143**: 812-824
- Schmidt A., Grimm R., Schmidt J., Scheel D., Strack D., Rosahl S.** (1999) Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase. *J Biol Chem* **274**: 4273-4280
- Schmittgen T. D., Livak K. J.** (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**: 1101-1108
- Schwessinger B., Zipfel C.** (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 389-395
- 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. *PNAS* **98**: 4788-4793
- Seo S., Katou S., Seto H., Gomi K., Ohashi Y.** (2007) The mitogen-activated protein kinases WIPK and SIPK regulate the levels of jasmonic and salicylic acids in wounded tobacco plants. *Plant J* **49**: 899-909
- Shan L., He P., Li J., Heese A., Peck S. C., Nürnberger T., Martin G. B., Sheen J.** (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe* **4**: 17-27
- Shen Q. H., Saijo Y., Mauch S., Biskup C., Bieri S., Keller B., Seki H., Ulker B., Somssich I. E., Schulze-Lefert P.** (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* **315**: 1098-1103
- Shirasu K.** (2009) The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 139-164

- Shoji T., Ogawa T., Hashimoto T.** (2008) Jasmonate-induced nicotine formation in tobacco is mediated by tobacco *CO11* and *JAZ* genes. *Plant Cell Physiol* **49**: 1003-1012
- Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Mauch F.** (2003) Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: beta-aminobutyric acid but not BTH protects potato and Arabidopsis from infection. *Mol Plant Pathol* **4**: 237-248
- Smart C. D., Myers K. L., Restrepo S., Martin G. B., Fry W. E.** (2003) Partial resistance of tomato to *Phytophthora infestans* is not dependent upon ethylene, jasmonic acid, or salicylic acid signaling pathways. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 141-148
- Somers D. E., Fujiwara S.** (2009) Thinking outside the F-box: novel ligands for novel receptors. *Trends Plant Sci* **14**: 206-213
- Speth E. B., Lee Y. N., He S. Y.** (2007) Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 580-586
- Spoel S. H., Dong X.** (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* **3**: 348-351
- Spoel S. H., Johnson J. S., Dong X.** (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *PNAS* **104**: 18842-18847
- Spoel S. H., Koornneef A., Claessens S. M., Korzelius J. P., Van Pelt J. A., Mueller M. J., Buchala A. J., Metraux J. P., Brown R., Kazan K., Van Loon L. C., Dong X., Pieterse C. M.** (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**: 760-770
- Spoel S. H., Mou Z., Tada Y., Spivey N. W., Genschik P., Dong X.** (2009) Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* **137**: 860-872
- Staswick P. E.** (2008) JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci* **13**: 66-71
- Staswick P. E.** (2009) The Tryptophan Conjugates of Jasmonic And Indole-3-Acetic Acids Are Endogenous Auxin Inhibitors. *Plant Physiol*
- Staswick P. E., Tiryaki I.** (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2117-2127
- 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 on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405-1415
- Staswick P. E., Yuen G. Y., Lehman C. C.** (1998) Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J* **15**: 747-754
- Stein M., Dittgen J., Sanchez-Rodriguez C., Hou B. H., Molina A., Schulze-Lefert P., Lipka V., Somerville S.** (2006) Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell* **18**: 731-746
- Stenzel I., Hause B., Miersch O., Kurz T., Maucher H., Weichert H., Ziegler J., Feussner I., Wasternack C.** (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **51**: 895-911
- Stintzi A., Browse J.** (2000) The Arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *PNAS* **97**: 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. *PNAS* **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. *Plant J* **32**: 585-601
- Stukkens Y., Bultreys A., Grec S., Trombik T., Vanham D., Boutry M.** (2005) NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana glauca*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiol* **139**: 341-352
- 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. *Plant Cell* **18**: 764-779

- Szemenyei H., Hannon M., Long J. A.** (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* **319**: 1384-1386
- Taguchi F., Shimizu R., Inagaki Y., Toyoda K., Shiraishi T., Ichinose Y.** (2003) Post-translational modification of flagellin determines the specificity of HR induction. *Plant Cell Physiol* **44**: 342-349
- Takahashi Y., Nasir K. H., Ito A., Kanzaki H., Matsumura H., Saitoh H., Fujisawa S., Kamoun S., Terauchi R.** (2007) A high-throughput screen of cell-death-inducing factors in *Nicotiana benthamiana* identifies a novel MAPKK that mediates INF1-induced cell death signaling and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii*. *Plant J* **49**: 1030-1040
- Takemoto D., Hardham A. R., Jones D. A.** (2005) Differences in cell death induction by Phytophthora Elicitins are determined by signal components downstream of MAP kinase kinase in different species of *Nicotiana* and cultivars of *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*. *Plant Physiol* **138**: 1491-1504
- Takeuchi K., Taguchi F., Inagaki Y., Toyoda K., Shiraishi T., Ichinose Y.** (2003) Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity. *J Bacteriol* **185**: 6658-6665
- 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 Physiol* **139**: 1268-1283
- Takken F. L., Tameling W. I.** (2009) To nibble at plant resistance proteins. *Science* **324**: 744-746
- Tameling W. I. L., Takken F. L. W.** (2008) Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur J Plant Pathol* **121**: 243-255
- Tao Y., Xie Z., Chen W., Glazebrook J., Chang H. S., Han B., Zhu T., Zou G., Katagiri F.** (2003) Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**: 317-330
- Tejeda-Sartorius M., Martinez de la Vega O., Delano-Frier J. P.** (2008) Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. *Physiol Plant* **133**: 339-353
- Thaler J. S., Owen B., Higgins V. J.** (2004) The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiol* **135**: 530-538
- Thatcher L. F., Manners J. M., Kazan K.** (2009) *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in Arabidopsis. *Plant J* **58**: 927-939
- Theodoulou F. L., Job K., Slocombe S. P., Footitt S., Holdsworth M., Baker A., Larson T. R., Graham I. A.** (2005) Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol* **137**: 835-840
- Thilmony R., Underwood W., He S. Y.** (2006) Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J* **46**: 34-53
- Thines B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G., Nomura K., He S. Y., Howe G. A., Browse J.** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661-665
- Thoma I., Loeffler C., Sinha A. K., Gupta M., Kruschke 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. *Plant J* **34**: 363-375
- Thomma Bphj, Eggermont K., Penninckx Iama, Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B. P. A., Broekaert W. F.** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *PNAS* **95**: 15107-15111
- Thordal-Christensen H., Zhang Z. G., Wei Y. D., Collinge D. B.** (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* **11**: 1187-1194

- Tian M., Benedetti B., Kamoun S.** (2005) A Second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol* **138**: 1785-1793
- Tian M., Huitema E., Da Cunha L., Torto-Alalibo T., Kamoun S.** (2004) A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem* **279**: 26370-26377
- Tian M., Win J., Song J., van der Hoorn R., van der Knaap E., Kamoun S.** (2007) A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant Physiol* **143**: 364-377
- Tsitsigiannis D. I., Keller N. P.** (2007) Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol* **15**: 109-118
- Tsuda K., Sato M., Glazebrook J., Cohen J. D., Katagiri F.** (2008) Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J* **53**: 763-775
- Turlings T. C., Ton J.** (2006) Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odours to enhance the control of agricultural pests. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 421-427
- Tyler B. M.** (2002) Molecular basis of recognition between phytophthora pathogens and their hosts. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 137-167
- Tyler B. M.** (2009) Entering and breaking: virulence effector proteins of oomycete plant pathogens. *Cell Microbiol* **11**: 13-20
- Tyler B. M., Tripathy S., Zhang X., Dehal P., Jiang R. H., Aerts A., Arredondo F. D., Baxter L., Bensasson D., Beynon J. L., Chapman J., Damasceno C. M., Dorrance A. E., Dou D., Dickerman A. W., Dubchak I. L., Garbelotto M., Gijzen M., Gordon S. G., Govers F., Grunwald N. J., Huang W., Ivors K. L., Jones R. W., Kamoun S., Krampis K., Lamour K. H., Lee M. K., McDonald W. H., Medina M., Meijer H. J., Nordberg E. K., Maclean D. J., Ospina-Giraldo M. D., Morris P. F., Phuntumart V., Putnam N. H., Rash S., Rose J. K., Sakihama Y., Salamov A. A., Savidor A., Scheuring C. F., Smith B. M., Sobral B. W., Terry A., Torto-Alalibo T. A., Win J., Xu Z., Zhang H., Grigoriev I. V., Rokhsar D. S., Boore J. L.** (2006) *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**: 1261-1266
- Uppalapati S. R., Ayoubi P., Weng H., Palmer D. A., Mitchell R. E., Jones W., Bender C. L.** (2005) The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *Plant J* **42**: 201-217
- Uppalapati S. R., Ishiga Y., Wangdi T., Kunkel B. N., Anand A., Mysore K. S., Bender C. L.** (2007) The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 955-965
- Valls M., Genin S., Boucher C.** (2006) Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* **2**: 798-807
- Van der Biezen E. A., Jones J. D.** (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**: 454-456
- Van der Ent S., Koornneef A., Ton J., Pieterse C. M.J.** (2009) Induced Resistance - Orchestrating Defence Mechanisms Through Crosstalk And Priming. In J Parker, ed, *Molecular aspects of plant disease resistance (Annual plant reviews)*, Vol 34. Wiley-Blackwell, pp 344-370
- van der Hoorn R. A., Kamoun S.** (2008) From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**: 2009-2017
- van der Luit A. H., Piatti T., van Doorn A., Musgrave A., Felix G., Boller T., Munnik T.** (2000) Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol* **123**: 1507-1516
- van der Vlugt-Bergmans C. J., Wagemakers C. A., van Kan J. A.** (1997) Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 21-29
- van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J.** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Ann Rev Phytopathol* **44**: 135-162

- van Wees S. C., de Swart E. A., van Pelt J. A., van Loon L. C., Pieterse C. M. (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **97**: 8711-8716
- Van Wees S. C. M., Van der Ent S., Pieterse C. M. J. (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 443-448
- Vanholme B., Grunewald W., Bateman A., Kohchi T., Gheysen G. (2007) The tify family previously known as ZIM. *Trends Plant Sci* **12**: 239-244
- Vellosillo T., Martínez M., Lopez M. A., Vicente J., Cascon T., Dolan L., Hamberg M., Castresana C. (2007) Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* **19**: 831-846
- Verberne M. C., Brouwer N., Delbianco F., Linthorst H. J., Bol J. F., Verpoorte R. (2002) Method for the extraction of the volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material. *Phytochem Anal* **13**: 45-50
- Vierstra R. D. (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* **8**: 135-142
- Vijayan P., Shockey J., Levesque C. A., Cook R. J., Browse J. (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *PNAS* **95**: 7209-7214
- Vleeshouwers V. G., van Dooijeweert W., Govers F., Kamoun S., Colon L. T. (2000) The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* **210**: 853-864
- Vleeshouwers V. G., Driesprong J. D., Kamphuis L. G., Torto-Alalibo T., Van't Slot K. A. E., Govers F., Visser R. G. F., Jacobsen E., Kamoun S. (2006) Agroinfection-based high-throughput screening reveals specific recognition of INF elicitors in *Solanum*. *Mol Plant Pathol* **7**: 499-510
- Vollenweider S., Weber H., Stolz S., Chetelat A., Farmer E. E. (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant J* **24**: 467-476
- Walley J. W., Rowe H. C., Xiao Y., Chehab E. W., Kliebenstein D. J., Wagner D., Dehesh K. (2008) The chromatin remodeler SPLAYED regulates specific stress signaling pathways. *PLoS Pathog* **4**: e1000237
- Walters D. R., McRoberts N. (2006) Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends Plant Sci* **11**: 581-586
- Wan J., Zhang X. C., Neece D., Ramonell K. M., Clough S., Kim S. Y., Stacey M. G., Stacey G. (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 471-481
- Wang C., Zien C. A., Afithile M., Welti R., Hildebrand D. F., Wang X. (2000) Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 2237-2246
- Wang D., Pajerowska-Mukhtar K., Culler A. H., Dong X. N. (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* **17**: 1784-1790
- Wang L., Tsuda K., Sato M., Cohen J. D., Katagiri F., Glazebrook J. (2009) *Arabidopsis* CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog* **5**: e1000301
- Wasternack C. (2006) Oxylipins: biosynthesis, signal transduction and action. In P Hedden, ed, *Annual Plant Reviews, Plant Hormone Signaling*, Vol 24
- Wasternack C. (2007) Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**: 681-697
- Weber H., Chetelat A., Caldelari D., Farmer E. E. (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* **11**: 485-494
- Wesley S. V., Helliwell C. A., Smith N. A., Wang M. B., Rouse D. T., Liu Q., Gooding P. S., Singh S. P., Abbott D., Stoutjesdijk P. A., Robinson S. P., Gleave A. P., Green A. G., Waterhouse P. M. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**: 581-590

- Whisson S. C., Boevink P. C., Moleleki L., Avrova A. O., Morales J. G., Gilroy E. M., Armstrong M. R., Grouffaud S., van West P., Chapman S., Hein I., Toth I. K., Pritchard L., Birch P. R. (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**: 115-118
- Wiermer M., Feys B. J., Parker J. E. (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 383-389
- Wise R. P., Moscou M. J., Bogdanove A. J., Whitham S. A. (2007) Transcript profiling in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 329-369
- Wolf D. (2005) Die Rolle des F-Box-Proteins COI1 in *S. tuberosum*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Xiang T., Zong N., Zou Y., Wu Y., Zhang J., Xing W., Li Y., Tang X., Zhu L., Chai J., Zhou J. M. (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* **18**: 74-80
- 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
- Xu L., Liu F., Lechner E., Genschik P., Crosby W. L., Ma H., Peng W., Huang D., Xie D. (2002) The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 1919-1935
- Yang K. Y., Liu Y., Zhang S. (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *PNAS* **98**: 741-746
- Yang W., Devaiah S. P., Pan X., Isaac G., Welti R., Wang X. (2007) AtPLAI is an acyl hydrolase involved in basal jasmonic acid production and Arabidopsis resistance to *Botrytis cinerea*. *J Biol Chem* **282**: 18116-18128
- Yasuda M., Ishikawa A., Jikumaru Y., Seki M., Umezawa T., Asami T., Maruyama-Nakashita A., Kudo T., Shinozaki K., Yoshida S., Nakashita H. (2008) Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 1678-1692
- Yoshihara T., Omer E. A., Koshino H., Sakamura S., Kikuta Y., Koda Y. (1989) Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* **53**: 2835-2837
- Yoshioka H., Numata N., Nakajima K., Katou S., Kawakita K., Rowland O., Jones J. D., Doke N. (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* **15**: 706-718
- Zhang J., Shao F., Li Y., Cui H., Chen L., Li H., Zou Y., Long C., Lan L., Chai J., Chen S., Tang X., Zhou J. M. (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* **1**: 175-185
- Zhang S., Liu Y., Klessig D. F. (2000) Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J* **23**: 339-347
- Zhao Y., Thilmony R., Bender C. L., Schaller A., He S. Y., Howe G. A. (2003) Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J* **36**: 485-499
- Zhou J. M., Chai J. (2008) Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr Opin Microbiol* **11**: 179-185
- Ziegler J., Stenzel I., Hause B., Maucher H., Hamberg M., Grimm R., Ganai M., Wasternack C. (2000) Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J Biol Chem* **275**: 19132-19138
- Zimmerli L., Hou B. H., Tsai C. H., Jakab G., Mauch-Mani B., Somerville S. (2008) The xenobiotic beta-aminobutyric acid enhances Arabidopsis thermotolerance. *Plant J* **53**: 144-156
- Zimmermann S., Nurnberger T., Frachisse J. M., Wirtz W., Guern J., Hedrich R., Scheel D. (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *PNAS* **94**: 2751-2755
- Zipfel C. (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* **20**: 10-16

- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J. D., Boller T., Felix G.** (2006)
Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**: 749-760
- Zipfel C., Rathjen J. P.** (2008) Plant immunity: AvrPto targets the frontline. *Curr Biol* **18**: R218-220
- Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E. J., Jones J. D., Felix G., Boller T.** (2004)
Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* **428**: 764-767

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet und wörtlich oder inhaltlich aus anderen Arbeiten entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Diese Dissertation wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle (Saale), Juli 2009

Simone Altmann

PERSÖNLICHE ANGABEN:

Name: Simone Altmann
Geburtsdatum: 22.04.1982
Geburtsort: Beckendorf –Neindorf

SCHULBILDUNG

1988-1992 Grundschole in Halberstadt
1992-1997 „Eike-von-Repgow-Gymnasium“, Halberstadt
1997-2000 „Käthe-Kollwitz-Gymnasium“, Halberstadt
2000 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am Käthe-Kollwitz-Gymnasium in Halberstadt

STUDIUM

2000-2005 Biochemie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2004-2005 Anfertigung der Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie unter der Betreuung von Dr. S. Rosahl und Prof. Dr. D. Scheel
Thema der Diplomarbeit: „Die Rolle des *oxidative burst* für die Pathogenantwort in *Solanum tuberosum* L.“

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

2005-2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
Anfertigung der Promotion unter Betreuung von Dr. S. Rosahl und Prof. Dr. D. Scheel in der Arbeitsgruppe „Induzierte Pathogenabwehr“ der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie
Titel der Dissertation: „Funktionelle Analyse von 13-Lipoxygenase-abgeleiteten Oxylipinen in der Pathogenabwehr von *Solanum tuberosum* L.“

Halle (Saale), d. 16.07.09

Simone Altmann

PUBLIKATIONEN

Halim VA*, **Altmann S***, Ellinger D, Eschen-Lippold L, Miersch O, Scheel D, Rosahl S.
PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *Plant J.*
2009 Jan; 57 (2):230-42. Epub 2008 Oct 25.

* Gleichberechtigte Co-Autoren

Halim VA, Eschen-Lippold L, **Altmann S**, Birschwilks M, Scheel D, Rosahl S.
Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2007 Nov; 20(11):1346-52.

PRÄSENTATIONEN

S. Altmann, V. A. Halim, L. Eschen-Lippold, D. Scheel and S. Rosahl (2008)
13-Lipoxygenase-derived oxylipins function in PAMP-induced defense responses of potato The
6th Kurt Mothes Workshop Secondary Metabolism,
Jena, Germany, September 18-19, (Vortrag)

S. Altmann, V.A. Halim, L. Eschen-Lippold, D. Scheel and S. Rosahl (2008)
13-Lipoxygenase derived oxylipins function in basal defence of potato
Plant Science Student Conference, Gatersleben, Germany, July 1-4 (Vortrag)

S. Rosahl, **S. Altmann**, L. Eschen-Lippold, V.A. Halim, D. Ellinger, D. Scheel (2008)
Both JA and SA are required for PAMP signalling in potato
Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, "Plant Innate Immunity",
Keystone, Colorado, USA, February 10-15, (Poster)

L. Eschen-Lippold, **S. Altmann**, V.A. Halim, C. Gebhardt, C. Göbel, I. Feussner, D. Scheel, S.
Rosahl (2007) *The role of oxylipins for pathogen defense in potato*
International Symposium "Communication in Plants and their Response to the Environment",
organized by the Collaborative Research Center SFB 648
„Molecular mechanisms of information processing in plants“
Halle (Saale), Germany, May 10-12, (Poster)

S. Altmann, V. A. Halim, L. Eschen-Lippold, M. Birschwilks, C. Göbel, I. Feussner, D. Scheel
and S. Rosahl (2006) *The importance of oxylipins for basal defense in potato*,
2nd International Conference on Eicosanoids, Bioactive Lipids and Plant Oxylipins,
Berlin, Germany, May 24-27, (Poster)