

**Analyse der Funktion des 9-Oxylipin-Stoffwechsels
und von SNARE-Homologen
für die Pathogenabwehr der Kartoffel**

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 Herrn Lennart Eschen-Lippold

geboren am 15.11.1978 in Hannover

Gutachter:

1. Herr Prof. Scheel (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle)
2. Herr Prof. Klösgen (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
3. Herr Prof. Feussner (Albrecht-von-Haller-Institut, Universität Göttingen)

Halle (Saale), 10.11.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014767

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014767>]

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.
Diese Arbeit wurde an keiner anderen Fakultät oder Universität zur Begutachtung eingereicht.
Ich bewerbe mich mit dieser Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), 16.06.2008

Lennart Eschen-Lippold

Publikationen

Eschen-Lippold, L, Rothe, G, Stumpe, M, Göbel, C, Feussner, I und Rosahl, S (2007). "Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants." *Phytochemistry* **68**(6): 797-801.

Halim, V A, Eschen-Lippold, L, Altmann, S, Birschwilks, M, Scheel, D und Rosahl, S (2007). "Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**(11): 1346-1352.

Halim, V A, Altmann, S, Ellinger, D, Eschen-Lippold, L, Miersch, O, Scheel, D und Rosahl, S (2008). "PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid". *Plant Journal* doi: [10.1111/j.1365-3113.2008.03688.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.03688.x)

Abkürzungsverzeichnis.....	i
1. Pflanzliche Pathogenabwehr.....	1
1.1. Salicylsäure, Jasmonsäure und ihre Derivate als Signale der Pathogenabwehr.....	5
1.2. Weitere Routen und Produkte des Oxylipinweges.....	9
1.3. Das komplexe Zusammenspiel pflanzlicher Hormone in der Pathogenabwehr.....	11
1.4. Die Rolle der Sekretion während der Pathogenabwehr.....	13
1.5. Die Rolle von SA und JA für die Pathogenabwehr der Kartoffel.....	16
1.6. Zielstellung.....	17
2. Material und Methoden.....	19
2.1. Material.....	19
2.1.1. Pflanzen.....	19
2.1.2. Bakterien.....	19
2.1.3. <i>Phytophthora infestans</i>	20
2.2. Methoden.....	20
2.2.1. Medien.....	20
2.2.2. Pflanzenanzucht (Normalbedingungen).....	21
2.2.3. Gewinnung von Kartoffelwurzelproben.....	21
2.2.4. Oxidativer Stress: Starklicht und Wasserstress.....	21
2.2.5. Wurzelwachstums-Versuche in Sterilkultur.....	22
2.2.6. Miniknollenbildung in Sterilkultur.....	22
2.2.7. Stabile Transformation von Kartoffelpflanzen mittels <i>A. tumefaciens</i>	22
2.2.8. Erhaltung und Dauerkultur von <i>P. infestans</i>	23
2.2.9. Zoosporensuspensionen von <i>P. infestans</i> für Infektionsexperimente.....	23
2.2.10. Infektions- und Infiltrationsexperimente.....	24
2.2.10.1. Inokulation von Kartoffelpflanzen mit <i>P. infestans</i> -Zoosporensuspension.....	24
2.2.10.2. Infiltration von Kartoffelblättern mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	24
2.2.10.3. Inokulationsexperimente mit <i>Colletotrichum coccodes</i> (Wallr.) Hughes.....	24
2.2.11. Realtime-PCR.....	25
2.2.12. Anilinblau-Färbung.....	25
2.2.13. Trypanblau-Färbung.....	25
2.2.14. Klonierungen.....	25
2.2.15. Klonierungsvektoren.....	25
2.2.16. Amplifizierung von Genfragmenten aus genomischer DNA.....	26
2.2.17. DNA-Fragment-Isolierung aus Agarosegelen.....	26
2.2.18. Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren.....	26
2.2.19. Restriktionsansätze für Klonierungen.....	26
2.2.20. Klonierung von <i>pHELLSGATE8-Hyg^R</i> (<i>HPTII</i>).....	26
2.2.21. Klonierung von <i>pHELLSGATE8-DAO1 / -DSDA</i>	27
2.2.22. Herstellung kompetenter Zellen (DH5 α).....	27
2.2.23. Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α -Zellen.....	28
2.2.24. Herstellung und Transformation von kompetenten <i>A. tumefaciens</i> AGL0-Zellen..	28
2.2.25. Plasmid-DNA-Präparation aus <i>E. coli</i>	28
2.2.26. Plasmid-DNA-Präparation aus <i>A. tumefaciens</i>	29
2.2.27. Kolonie-PCR zur Identifikation positiver Bakterien-Klone.....	29
2.2.28. Automatische DNA-Sequenzierung.....	29
2.2.29. Isolierung von gesamt-RNA aus Kartoffelblättern.....	30
2.2.30. Northern-Blot-Analyse.....	30
2.2.31. Isolierung von genomischer DNA aus Kartoffelblättern.....	30
2.2.32. Southern-Blot-Analyse.....	30
2.2.33. Western-Blot-Analyse.....	30
2.2.34. Salicylsäure-Bestimmung.....	30

2.2.35. Jasmonsäure-Bestimmung.....	31
2.2.36. Statistische Signifikanzberechnung der Unterschiedlichkeit von Messwerten.....	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1. Charakterisierung der <i>StLOX1</i> - und <i>St9DES</i> -RNAi-Pflanzen.....	32
3.1.1. Untersuchungen zur Knollenbildung.....	32
3.1.2. Mikroskopische Untersuchungen nach <i>P. infestans</i> -Infektion.....	33
3.1.3. Infektionsexperimente mit anderen bodenbürtigen Pilzen.....	37
3.1.4. Inokulation mit <i>Colletotrichum coccodes</i>	37
3.1.5. Inokulation mit <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	38
3.1.6. Inokulation mit <i>Verticillium dahliae</i>	39
3.1.7. Abiotischer Stress.....	40
3.1.7.1. Starklichtbehandlung.....	40
3.1.7.2. Schwermetallbehandlung (CuSO ₄).....	41
3.1.7.3. Wasserstress-Experimente.....	42
3.2. TIGR-Microarrays.....	42
3.3. Charakterisierung von <i>StAOS3</i> -RNAi-Pflanzen.....	46
3.4. Die Rolle von <i>StLOX1</i> / <i>St9DES</i> für die <i>R</i> -Gen-vermittelte Resistenz gegen <i>P. inf.</i> ..	49
3.4.1. Transgene Ansätze.....	49
3.4.2. Chemisch induzierte Resistenz.....	54
3.5. Die Rolle des Kandidatengens <i>StSYRI</i> für die basale Resistenz.....	57
3.6. Die Rolle des Kandidatengens <i>StSNAP33</i> für die basale Resistenz.....	66
4. Diskussion.....	71
4.1. Die Rolle des 9LOX-Weges in der basalen Resistenz gegen <i>P. infestans</i>	71
4.2. Die Rolle des 9LOX-Weges in der <i>R</i> -Gen-vermittelten Resistenz gegen <i>P. infestans</i>	73
4.3. Die Rolle des 9LOX-Weges in der Interaktion mit bodenbürtigen Pilzen.....	75
4.4. Die Rolle des 9LOX-Weges in der chemisch-induzierten Resistenz gegen <i>P. inf.</i>	76
4.5. Die Rolle des 9LOX-Weges in abiotisch-induziertem oxidativen Stress.....	78
4.6. Charakterisierung der <i>StAOS3</i> -RNAi-Pflanzen.....	79
4.7. Charakterisierung der <i>StSYRI</i> -RNAi- und <i>StSNAP33</i> -RNAi-Pflanzen.....	80
5. Zusammenfassung.....	85
A. Anhang.....	86
Literatur.....	101
Danksagung.....	120
Lebenslauf.....	121

9DES	9-Divinylether-Synthase
A	Anhang
ABA	Abscisinsäure
AOS3	Allenoxid-Synthase 3
Avr	Avirulenzgen
cfu	<i>colony forming units</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tage nach Inokulation / Infiltration
Et	Ethylen
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
Et-OH	Ethanol
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i>
EV	kennzeichnet Pflanzen, die mit einem Leeren Vektor-Konstrukt transformiert wurden
F _m	maximale Chlorophyll-Fluoreszenz im Dunkel-adaptierten Zustand
F _v	variable Chlorophyll-Fluoreszenz
GFP	grün fluoreszierendes Protein
hpi	Stunden nach Inokulation / Infiltration
hpt	Stunden nach Behandlung
HR	hypersensitive Reaktion
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	JA-Isoleucin
LB	<i>lysogeny broth</i>
LOX1	9-Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MS	Murashige-Skoog-Medium
NPTII	Neomycin-Phosphotransferase II
OD	optische Dichte
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure
pAG7	<i>Agrobacterium</i> Gen 7 Terminator
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pep-13	Peptid-Elicitor aus einer Phytophthora Transglutaminase
Pi	<i>Phytophthora infestans</i>
pnos	Nopalinsynthase Promoter
Psm	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
R	Resistenzgen
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SA	Salicylsäure
SAG	Salicylsäure-Glukosid
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SNAP33	SYNAPTOSOME-ASSOCIATED PROTEIN OF 33 KDA
SYR1	SYNTAXIN-RELATED 1
TE	Tris-EDTA Puffer
TIGR	The Institute for Genomic Research
TMV	Tabakmosaikvirus
TTSS	Typ III Sekretionssystem
WT	Wildtyp (Sorte Désirée)

1. Pflanzliche Pathogenabwehr

Pflanzen sind in ihren natürlichen Ökosystemen einer Vielzahl von potentiellen Pathogenen ausgesetzt. Dazu zählen Mikroorganismen wie Pilze, Oomyceten, Bakterien und Viren, aber auch Nematoden und Insekten. Um erfolgreich gegen Pathogene bestehen zu können, steht Pflanzen ein komplexes Abwehrsystem zur Verfügung, das aus konstitutiv vorhandenen und induzierbaren Mechanismen besteht.

In den meisten Pflanze – Pathogen-Interaktionen stellen die Pflanzen keine Wirte für die Pathogenspezies dar, eine Kolonisierung ist nicht möglich (Mysore und Ryu, 2004; Thordal-Christensen, 2003; Heath, 2000). Diese Nichtwirtsresistenz beruht einerseits auf passiven Barrieren, andererseits auf induzierbaren Mechanismen. Zu den passiven Barrieren zählen dauerhaft ausgebildete Strukturen, z. B. Dornen oder Stacheln, Behaarung und die Cuticula (Sitte und Strasburger, 1999), außerdem konstitutiv synthetisierte antimikrobielle Verbindungen bzw. deren Vorstufen (Osbourn, 1999, 1996; Papadopoulou *et al.*, 1999). Diese können z. B. durch Fraßschäden freigesetzt werden. Induzierbare Mechanismen beruhen auf der spezifischen Rezeptor-abhängigen Erkennung von Molekülen von Pathogenen (P / MAMP = *pathogen- / microbe-associated molecular pattern*). Zusammen mit den passiven Barrieren werden PAMP-vermittelte Abwehrmechanismen als basale Resistenz bezeichnet (Sanabria *et al.*, 2008; de Wit, 2007). PAMPs sind in der Regel Oberflächen-exponiert und nicht im Wirt vorhanden. Außerdem haben sie für das jeweilige Pathogen eine lebensnotwendige Funktion. Aus diesen Gründen sind sie hoch konserviert (Sanabria *et al.*, 2008; Bent und Mackey, 2007; Nürnberger und Lipka, 2005; Nürnberger und Brunner, 2002). Als PAMPs wurden unter anderem Lipopolysaccharide (LPS), der Elongationsfaktor EF-Tu und Flagellin aus Gram-negativen Bakterien, pilzliches Chitin und eine Transglutaminase aus *Phytophthora* spp. identifiziert (Zipfel und Felix, 2005; Nürnberger *et al.*, 2004). Im Falle der Transglutaminase aus *Phytophthora* spp. ist ein 13 Aminosäuren langes Peptid (Pep-13) für die Elicitierung einer Abwehrantwort ausreichend und notwendig (Nürnberger *et al.*, 1994). Im bakteriellen Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) wurde ein 18 Aminosäuren langes N-acetyliertes Peptid aus dem N-Terminus identifiziert (elf18), das die Abwehr induziert (Kunze *et al.*, 2004).

Die PAMP-induzierte Abwehr ist ein vielschichtiges System. Es kann zu Ionen-Flüssen über die Zellmembran, der Bildung und Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (*oxidative burst*), Zellwand-Verstärkungen und Auflagerungen, der Aktivierung von MAPK-Kaskaden (*mitogen activated protein kinase*), der Generierung von Salicylsäure (SA)-,

Jasmonsäure (JA)-, Ethylen (Et)- und Stickstoffmonoxid (NO)-Signalen, Abwehrgenexpression und programmiertem Zelltod kommen (Tsuda *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2007; Mysore und Ryu, 2004; Hahlbrock *et al.*, 2003; Dong, 1998). Im Falle der Nichtwirtsresistenz reichen die basalen Resistenzmechanismen zur erfolgreichen Verteidigung gegen ein attackierendes Pathogen aus (PTI = *PAMP-triggered immunity*; s. Abb. 1).

Im Laufe der Evolution adaptierten bestimmte Rassen von Pathogenen an die Abwehr einzelner Pflanzenspezies und schafften es, diese Form der Resistenz zu brechen. Aus Nichtwirts-Pflanzen wurden Wirte. Diese Pathogen-Rassen entwickelten Effektor-Proteine, die aktiv in die Wirtszellen geschleust werden und dort eine für die Infektion bzw. Multiplikation förderliche oder notwendige Funktion haben. In diesem Falle findet die Erkennung des Pathogens auf Pflanzenseite zwar weiterhin statt, allerdings greifen die sekretierten Effektoren in die PAMP-vermittelte basale Abwehrantwort ein und schwächen diese ab bzw. unterdrücken sie so weit, dass die Ausbildung einer effektiven Resistenz unterbunden wird (ETS = *effector-triggered susceptibility*; s. Abb. 1). Bei Gram-negativen Bakterien erfolgt die Sekretion der Effektoren in die Pflanzenzelle über das sogenannte „Typ III Sekretions-System“ (TTSS = *type III secretion system*), das von den Bakterien während der Infektion ausgebildet wird und direkt die Pflanzenzelle penetriert (Büttner und Bonas, 2006, 2003). Im Falle von phytopathogenen Oomyceten konnte die Effektor-Sekretion noch nicht im Detail aufgeklärt werden. Bekannt ist, dass sekretierte Effektoren ein konserviertes RXLR-Aminosäure-Motiv im N-Terminus tragen, das für den Transport über die Wirtsmembran ins Zellinnere nötig ist (Bhattacharjee *et al.*, 2006). (Morgan und Kamoun, 2007) schlugen ein Modell vor, das Chaperone und ein Translocon einbezieht, wobei nicht geklärt ist, ob diese Maschinerie vom attackierenden Oomyceten oder der Wirtspflanze stammt.

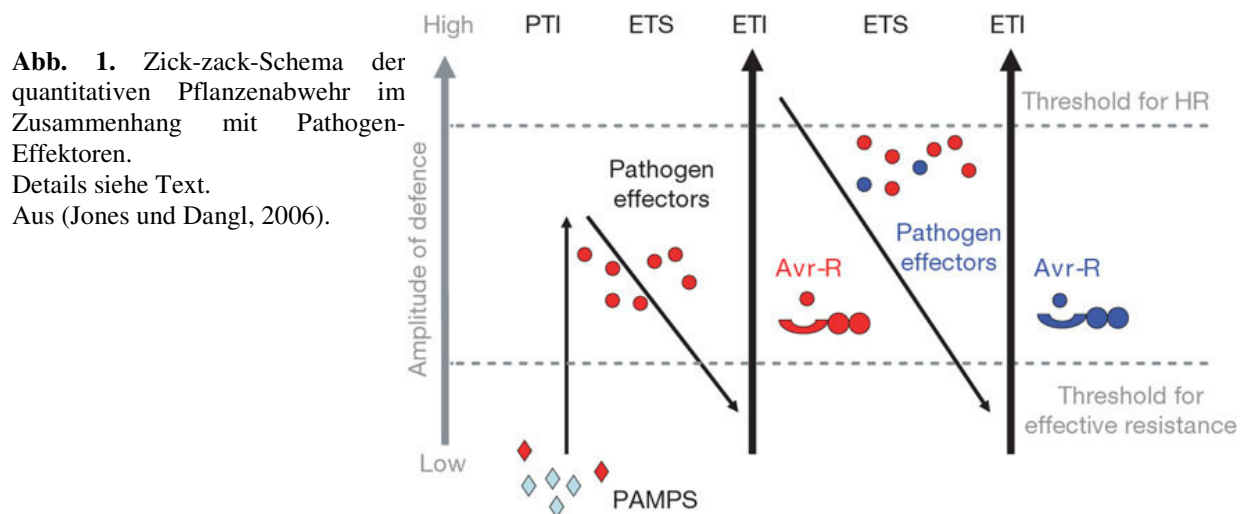
Als evolutive Antwort auf die Effektoren von Pathogenen entwickelten bestimmte Sorten oder Ökotypen einer Pflanzenart Resistenzgene (*R*-Gene), die spezifische Effektoren „erkennen“ und eine sehr starke Resistenzantwort vermitteln. Es handelt sich bei der *R*-Gen-vermittelten Wirts-Pflanzen-Resistenz also um eine rassenspezifische Pathogen-Erkennung und Abwehr. Diese beinhaltet die Ausbildung effektiver Resistenz und führt in vielen Fällen auch zu lokalem hypersensitiven Zelltod (HR = *hypersensitive response*; ETI = *effector-triggered immunity*; s. Abb. 1).

Die Erkennung von Effektorproteinen durch *R*-Proteine erfolgt direkt oder indirekt (*guard*-Hypothese) (Belkhadir *et al.*, 2004; Innes, 2004). Im Falle der indirekten Erkennung

überwacht das R-Protein ein pflanzliches Protein, das „Virulenztarget“. Dabei erkennt es Effektor-vermittelte molekulare Modifikationen desselben. Effektoren die direkt oder indirekt erkannt werden, bezeichnet man als Avirulenzproteine (Avr). Die direkte Interaktion zwischen R- und Avr-Proteinen konnte nur in wenigen Fällen gezeigt werden, z. B. in den Pathosystemen Reis - *Magnaporthe grisea* (*Pita* – *Avr-Pita*), Arabidopsis - *Ralstonia solanacearum* (*RRS1-R* – *PopP2*) und Flachs – *Melampsora lini* (*L5 / L6* – *AvrL567*) (Jia *et al.*, 2000; Deslandes *et al.*, 2003; Dodds *et al.*, 2006).

Es ist heute allgemein akzeptiert, dass die PAMP-vermittelte Abwehr mit der R-Gen-vermittelten Resistenz evolutiv in Zusammenhang steht (Bent und Mackey, 2007; Chisholm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006; Nürnberger und Kemmerling, 2006). Darauf aufbauend wird in dynamischer Co-Evolution ein Wechsel zwischen der Entwicklung neuer Effektoren auf Pathogenseite (ETS) und neuer R-Gene auf Pflanzenseite (ETI) angenommen (Shan *et al.*, 2007).

In Abb. 1 sind die beschriebenen möglichen Ergebnisse von Pflanze – Pathogen-Interaktionen zusammengefasst.



Die PAMP- und R-Gen-vermittelten Resistenzantworten zeigen starke Überlappung, wobei nicht ganz klar ist, inwiefern sie sich gleicher Signalwege bedienen (s.o.) oder unterschiedliche regulative Mechanismen zugrunde liegen. Bei der R-Gen-abhängigen Resistenz werden diese Mechanismen jedoch schneller und stärker aktiviert (Navarro *et al.*, 2004).

Nichtwirtsresistenz und R-Gen-vermittelte Resistenz zeigen in einigen Punkten regulative Konvergenz. So hat das Protein NHO1 (NONHOST RESISTANCE TO *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PHASEOLICOLA* 1) sowohl eine Funktion in der

Nichtwirts-Resistenz gegen *P. syringae* pv. *phaseolicola*, als auch in der R-Gen (*RPS2*, *RPS4*, *RPS5*, *RPM1*)-vermittelten Resistenz gegen Pseudomonaden (Lu *et al.*, 2001). EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1) interagiert *in vivo* mit PAD4 (PHYTOALEXIN-DEFICIENT 4) und SAG101 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101). Die Funktionalität aller drei Proteine ist für die volle Ausbildung der basalen und der R-Gen-vermittelten Resistenz gegen biotrophe Pathogene (*Peronospora parasitica*, *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000) nötig (Feys *et al.*, 2005).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der pflanzlichen Pathogenabwehr ist die systemische Resistenz SAR (*systemic acquired resistance*). Dieser induzierte erhöhte Resistenzzustand entfaltet seine Wirkung in der gesamten Pflanze und wird nach primärer Infektion mit einem Pathogen ausgelöst. Die SAR vermittelt langanhaltende Resistenz gegen verschiedene pathogene Organismen (Grant und Lamb, 2006). In Arabidopsis ist die Ausbildung der SAR Salicylsäure (SA)-abhängig. Sie akkumuliert lokal und systemisch und hat eine wichtige Funktion als Abwehrsignal (Loake und Grant, 2007). Allerdings ist SA selbst nicht das mobile systemische Signal. Hinweise, dass es sich bei dem mobilen Signal um eine Lipid-Verbindung handelt, kommen von Untersuchungen zu *dir1* (*defective in induced resistance 1*; putatives Lipid-Transfer-Protein (Maldonado *et al.*, 2002)) und *sfd1* (*suppressor of fatty acid desaturase deficiency 1*; putative in den Lipid-Stoffwechsel involvierte Dihydroxyaceton-Phosphat [DHAP]-Reduktase (Nandi *et al.*, 2004)). Liegt eines der für diese Proteine kodierenden Gene mutiert oder ausgeschaltet vor, sind die Pflanzen nicht mehr in der Lage, den systemischen Resistenz-Zustand der SAR auszubilden. (Truman *et al.*, 2007) schlugen ein Modell vor, in dem Jasmonsäure (JA) eine frühe Rolle in der Ausbildung der SAR in systemischen Geweben zukommt. Die Autoren zeigten, dass in Arabidopsis noch vor der Akkumulation von SA JA transient akkumuliert, den SAR-Zustand induziert und SA diesen dann manifestiert. Neben SA stellt JA ein weiteres wichtiges Abwehrsignal in Pflanzen dar (Wasternack, 2007).

Entscheidend für die Ausbildung der SAR ist NPR1 (NON-EXPRESSOR OF PR1). Im nicht-induzierten Zustand liegt es als Oligomer im Cytosol vor, bedingt durch intermolekulare Disulfid-Brücken. Nach SA-vermittelter transients Erhöhung des zellulären Reduktionspotentials und damit einhergehender Reduktion der Disulfid-Brücken, geht NPR1 in den monomeren Zustand über und wandert in den Zellkern. Hier induziert dann die direkte Bindung an TGA (TGACG-MOTIF BINDING FACTOR)-Transkriptionsfaktoren die PR-Gen-Expression (Fobert und Despres, 2005; Mou *et al.*, 2003; Despres *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang konnte NIMIN1 (NIM1 [NON-INDUCIBLE IMMUNITY]-INTERACTING

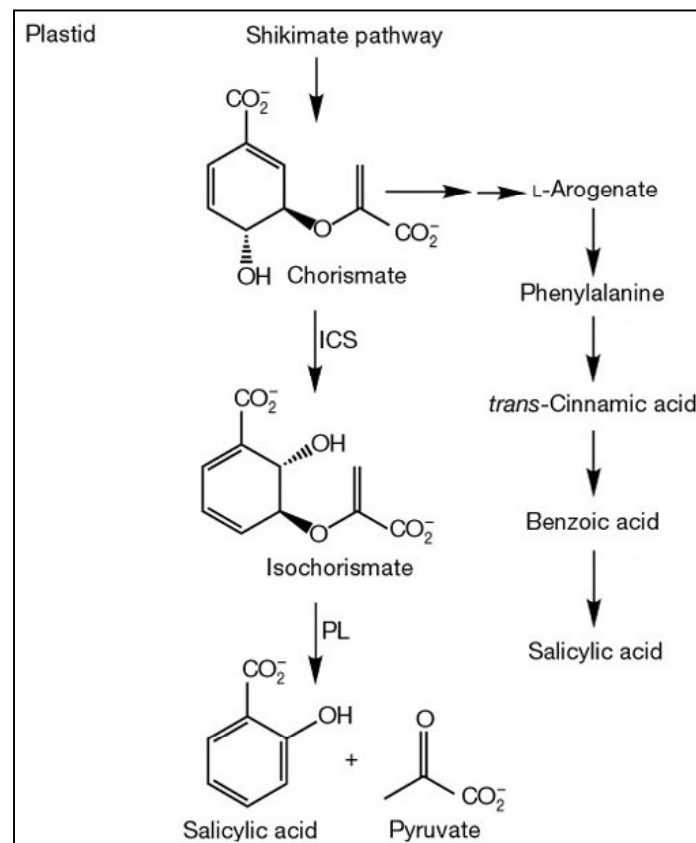
1) als ein negativer Regulator der PR1-Expression identifiziert werden. (Weigel *et al.*, 2005) schlagen ein Modell vor, indem NIMIN1 zusammen mit NPR1 und einem TGA-Faktor einen ternären Komplex bildet, der an den PR1-Promoter bindet, so die Genexpression induziert und NIMIN1 durch negative Modulation diese fein reguliert. Unterhalb von NPR1 wirken WRKY-Transkriptionsfaktoren, die sowohl positive, als auch negative regulative Wirkung auf die SA-abhängige NPR1-vermittelte Genexpression zeigen, also eine Funktion als Aktivatoren oder Repressoren haben (Wang *et al.*, 2006).

Neben der SAR stellt die sogenannte *induced systemic resistance* (ISR) eine weitere Form der induzierten Resistenz dar. Sie wird durch Kolonisierung mit nicht-pathogenen Rhizobakterien induziert und ist ebenfalls von NPR1 abhängig. Jedoch basiert die ISR-Induktion auf JA / Et-Signalen und nicht auf SA (Pieterse *et al.*, 2001, 1998). NPR1 stellt demnach den regulativen Knotenpunkt zwischen beiden Antworten dar.

1.1. Salicylsäure, Jasmonsäure und ihre Derivate als Signale der Pathogenabwehr

SA kann in Pflanzen über zwei Wege synthetisiert werden, den Isochorismat (IC)-Weg und den Phenylpropanoid-Weg (Abb. 2).

Abb. 2. SA-Synthese in Pflanzen.
Details siehe Text.
Verändert nach (Wildermuth *et al.*, 2001).



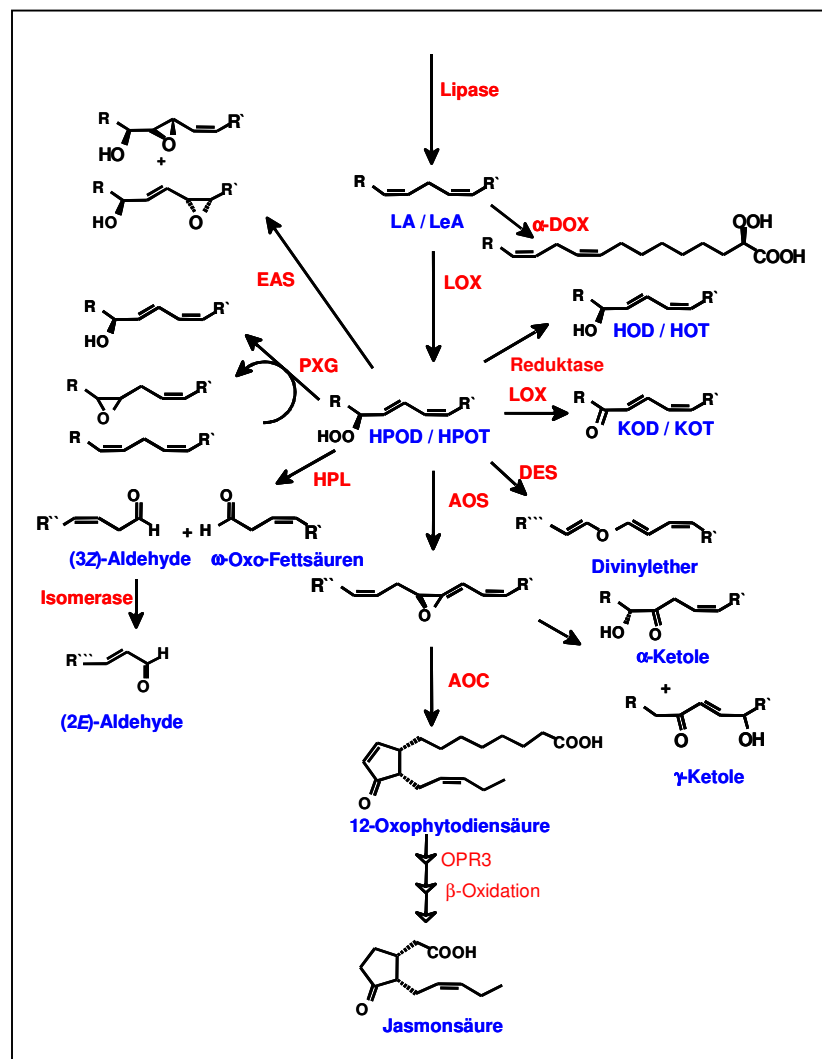
Die Pathogen-induzierte SA-Akkumulation beruht dabei auf der Aktivität der plastidären Isochorismat-Synthase 1 (ICS1 / SID2 [SA INDUCTION-DEFICIENT 2]), die den ersten Schritt des IC-Syntheseweges vollführt. Dabei wird aus dem Shikimat-Weg stammendes Chorismat zu Isochorismat umgesetzt, welches im folgenden Schritt vermutlich durch eine Isochorismat-Pyruvate Lyase (PL) zu freier SA metabolisiert wird (Strawn *et al.*, 2007; Wildermuth *et al.*, 2001).

Der größte Teil der akkumulierenden freien SA wird durch Aktivität der UDP-Glucosyltransferase (UGT) zum SA-2-O- β -D-Glucosid (SAG) umgesetzt (Dean *et al.*, 2005). Auch SA-Aminosäurekonjugaten und dem flüchtigen Ester Methyl-Salicylat (MeSA) wird eine Rolle in der Pathogenabwehr zugesprochen (Loake und Grant, 2007). In Tabak akkumulieren MeSA und SA nach Pathogen-Behandlung (TMV) lokal und systemisch. Dabei geht die MeSA-Akkumulation der SA-Akkumulation voran (Seskar *et al.*, 1998). Die Umwandlung von MeSA zu SA geschieht dabei wahrscheinlich durch SABP2 (SALICYLIC ACID BINDING PROTEIN 2). Dieses cytosolische Protein bindet MeSA mit hoher Affinität und zeigt spezifisch SA-Methylesterase-Aktivität (Forouhar *et al.*, 2005). Das *Silencing* von SABP2 und der damit verbundene Verlust der MeSA-Esterase-Aktivität führt zu abgeschwächter lokaler Resistenz gegen TMV und verhindert die SAR-Ausbildung (Kumar und Klessig, 2003).

Eine detailliertere Analyse der SA-Signaltransduktion wurde mit Pflanzen, deren SA-Akkumulationsfähigkeit durch Expression des *NahG*-Gens inhibiert ist, sowie Mutantenstudien durchgeführt. Das *NahG*-Gen kodiert für eine Salicylat-Hydroxylase aus *Pseudomonas putida*. Es katalysiert die Umsetzung von SA zu inaktivem Catechol. *NahG*-exprimierende Pflanzen erwiesen sich als suszeptibler gegenüber Viren, Bakterien und Pilzen und sind nicht mehr in der Lage, die SAR auszubilden (Delaney *et al.*, 1994; Gaffney *et al.*, 1993). In Mutantenstudien erwiesen sich beispielsweise EDS1 (putative Triacylglycerol-Lipase), PAD4 (putative Triacylglycerol-Lipase) und NDR1 (NON-RACE-SPECIFIC DISEASE RESISTANCE 1; Transmembran-Protein) als notwendig für die transkriptionelle Aktivierung von EDS5, einem MATE-Transporter, dessen Expression der SA-Akkumulation und PR1-Expression vorgeschaltet ist (Nawrath *et al.*, 2002). Diesen Vorgängen übergeordnet agieren CPR1 / -5 / -6 (CONSTITUTIVE EXPRESSOR OF PR 1 / 5 / 6) in der Signaltransduktion, *cpr*-Mutanten akkumulieren konstitutiv SA und zeigen Zwergwuchs (Jirage *et al.*, 2001). Insgesamt betrachtet ergibt sich somit ein komplexes in das SA-Signal involviertes regulatives Netzwerk mit Verknüpfung der einzelnen Signalwege (Glazebrook, 2001).

JA ist ein Produkt des komplexen Oxylinweges in Pflanzen (Abb. 3) (Wasternack, 2007; Rosahl und Feussner, 2004; Feussner und Wasternack, 2002). Die Synthese beginnt mit α -Linolensäure (α -LeA; 18:3) im Chloroplasten, die durch Lipase-Aktivität aus Membranen freigesetzt wird. Zur Zeit können drei Vertreter Lipid-hydrolysierender Enzyme mit der JA-Biosynthese in Verbindung gebracht werden: die Wund-induzierte Phospholipase A₂, die Blüten-assoziierte Phospholipase A₁ (DAD1: DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE 1), sowie das DAD1-Homolog DGL (DONGLE) (Narvaez-Vasquez *et al.*, 1999; Ishiguro *et al.*, 2001; Hyun *et al.*, 2008).

Abb. 3. Oxylinweg in Pflanzen. Details siehe Text bzw. Abschnitt 1.3).



Den ersten Schritt des Oxylinweges katalysiert die 13-Lipoxygenase (13-LOX) durch Einfügen molekularen Sauerstoffs an Kohlenstoff-Position 13 der α -LeA. Dabei entsteht das korrespondierende Hydroperoxid (13S)-Hydroperoxyoctadecatriensäure (13-HPOT). Nach 13-Allenoxidsynthase (13-AOS)-vermittelter Reaktion zum instabilen Allenoxid (12,13-Epoxyoctadecatriensäure), wird dieses durch die Allenoxidcyclase (AOC) zu (9S,13S)-12-

Oxophytodiensäure (OPDA) zyklisiert. Die folgenden Schritte finden in den Peroxisomen statt, wobei der genaue Transportmechanismus von OPDA nicht bekannt ist. Wahrscheinlich geschieht die aktive Aufnahme in die Peroxisomen durch PXA1 (PEROXISOMAL ABC-TRANSPORTER 1) (Zolman *et al.*, 2001). Ein anderes Modell schlägt neben der PXA1-vermittelten Aufnahme auch eine passive Route mittels *ion-trapping* vor (Theodoulou *et al.*, 2005). Die letzten Schritte involvieren neben der OPR3 (OPDA-REDUCTASE 3) (Schaller *et al.*, 2000) auch drei Runden β -Oxidation, die letztendlich JA bilden. Die Aktivierung des OPR3-Reaktionsproduktes OPC-8:0 (3-Oxo-2-(2'-[Z]-Pentenyl)-Cyclopentan-1-Octansäure) für die β -Oxidation erfolgt durch das Acyl-aktivierende Enzym OPCL1 (OPC-8:0-COA LIGASE 1) (Koo *et al.*, 2006). Die beteiligten Enzyme sind ACX (ACYL-COENZYME A OXIDASE), MFP (MULTIFUNCTIONAL PROTEIN [2-TRANS-ENOYL-COA HYDRATASE und L-3-HYDROXYACYL-COA DEHYDROGENASE]) und KAT (L-3-KETOACYL-COA THIOLASE) (Li *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2004).

JA selbst kann eine Reihe von Modifikationen erfahren, denen eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen zugeordnet werden kann (Wasternack, 2007). Hier soll nur auf den JA-Methylester (JAME) und das JA-Isoleucin-Konjugat (JA-Ile) eingegangen werden. In Arabidopsis katalysiert das Enzym JMT (JA-CARBOXYLMETHYL TRANSFERASE) die Bildung von JAME aus JA (Seo *et al.*, 2001). Die Expression des *JMT*-Gens ist lokal und systemisch wundresponsiv, sowie durch JAME selbst induzierbar. *JMT*-Überexpressionslinien zeigen konstitutive JA-Markergen-Transkriptakkumulation, erhöhten JAME-Gehalt im Vergleich zu den Kontrollen, jedoch unveränderten JA-Gehalt und erhöhte Resistenz gegen das nekrotrophe Pathogen *Botrytis cinerea*. Daraus folgend schlagen die Autoren eine Rolle als interzelluläres Abwehrsignal bzw. volatiles Signal zur Kommunikation zwischen benachbarten Pflanzen für JAME vor (Seo *et al.*, 2001).

JA-Ile ist das Produkt von JAR1 (JA-RESISTANT 1), einer JA-Aminosäure-Konjugat Synthase. *jar1*-Mutanten sind JA-insensitiv, das heißt sie zeigen keine Wurzelwachstums-Inhibition bei JA-Behandlung. Nur bei JA-Ile-Gabe selbst kommt es, wie im Wildtyp, zu verkürzten Wurzeln. Desweiteren ist in *jar1* die Expression JA-responsiver Gene stark herabgesetzt, sowie eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *Pythium irregulare* gegeben (Staswick und Tiriyaki, 2004; Staswick *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang wurde das Tabak (*Nicotiana attenuata*)-Homolog JAR4 als notwendig für die Abwehr gegen *Manduca sexta* beschrieben (Kang *et al.*, 2006). Diese Daten zeigen, dass das JA-Ile-Konjugat eine wichtige Funktion in der JA-Signaltransduktion hat.

Eine entscheidende Rolle fällt JA-Ile in der transkriptionellen Aktivierung JA-responsiver Gene zu. In diesem Modell aus Arabidopsis ist *AtCOI1* (*CORONATINE-INSENSITIVE 1*) von großer Bedeutung, das für ein F-Box-Protein kodiert. F-Box-Proteine binden spezifisch regulatorische Proteine, um sie dem Ubiquitin-Proteasom-vermittelten Proteinabbau zuzuführen. Tatsächlich wurde COI1 als Bestandteil des SCF^{COI1}-Ubiquitin-Ligase-Komplexes identifiziert (Xu *et al.*, 2002) und repräsentiert einen zentralen positiven Regulator des JA-Signals (Li *et al.*, 2004). Kürzlich wurde gezeigt, dass JAZ-Repressoren (JA-ZIM-DOMAIN) direkt an den Transkriptionsfaktor JA-responsiver Gene (MYC2) binden und so deren Transkription inhibieren. Akkumuliert die Pflanze allerdings JA-Ile, induziert dieses die Bindung von COI1 an die JAZ-Proteine und dadurch deren Poly-Ubiquitinierung und Proteasom-abhängigen Abbau. Daraus resultierend ist MYC2 frei und induziert die Transkription wundinduzierter Gene (Thines *et al.*, 2007; Chini *et al.*, 2007; Staswick, 2008). Wie JA-Ile die Interaktion von COI1 und JAZ vermittelt, war bislang ungeklärt. (Katsir *et al.*, 2008) veröffentlichten starke Hinweise aus Tomate darauf, dass JA-Ile direkt an COI1 bindet und so wiederum dessen Bindung an JAZ-Proteine induziert. Die Ergebnisse der Autoren schließen eine enzymatische Modifikation von COI1 (induziert durch JA-Ile), die eine Bindung an JAZ-Proteine ermöglicht, weitgehend aus. Auch ein Zusammenhang zwischen dem SCF^{COI1}-Ubiquitin-Ligase-Komplex und dem COP9-Signalosom (CSN) wurde beschrieben. (Feng *et al.*, 2003) zeigten einerseits die direkte Assoziation beider Komplexe, andererseits dass die Expression COI1-abhängiger JA-responsiver Gene ein funktionales CSN benötigt. SCF^{COI1}-Ubiquitin-Ligase-Komplex und CSN scheinen also entscheidende Funktion auf post-transkriptioneller Ebene in der Modulation des JA-Signals zu haben.

1.2. Weitere Routen und Produkte des Oxylipinweges

Generell betrachtet lässt sich der Oxylipinweg in zwei Haupttrouten unterteilen, den 9- und den 13-Lipoxygenaseweg. Ausgangssubstrate können in beiden Fällen α -Linolsäure und α -Linolensäure sein. Im ersten Schritt wird molekularer Sauerstoff entweder an Kohlenstoffatom 9 oder 13 eingefügt, so dass die korrespondierenden 9- und 13-Hydroperoxide resultieren (vgl. 1.2; JA-Synthese). Diese sind wiederum Ausgangspunkte für individuelle Seitenwege (Abb. 3). Im AOS-Weg werden Jasmonate (13-LOX-Weg; s.o.), sowie α - und γ -Ketole (9-LOX-Weg) synthetisiert, im Reduktase-Weg Hydroxy-PUFAs (*polyunsaturated fatty acid*), im LOX-Weg Keto-PUFAs, im HPL (HYDROPEROXID LYASE)-Weg Aldehyde und Oxo-Fettsäuren, im DES (DIVINYLETHER SYNTHASE)-

Weg Divinylether, im Peroxygenase- und EAS (EPOXY-ALKOHOL SYNTHASE)-Weg Epoxyhydroxy- und Trihydroxy-PUFAs (Wasternack, 2007; Rosahl und Feussner, 2004; Feussner und Wasternack, 2002).

Im Folgenden soll in einigen Beispielen näher auf einzelne Oxylipine und ihre Funktion eingegangen werden. Die *in vivo* im 9AOS-Weg (AOS3) synthetisierten α -Ketole konnten, genau wie das Enzym selbst, in den unterirdischen Organen von Kartoffelpflanzen (Knollen, treibende Knollenaugen, Wurzeln, Stolone) nachgewiesen werden (Stumpe *et al.*, 2006). Ihre genaue Funktion ist noch ungeklärt.

Die Produkte der 9DES, die Divinylether Colnel- und Colnelensäure (Itoh und Howe, 2001; Stumpe *et al.*, 2001), akkumulieren nach Pathogen- und Elicitorbehandlung (Weber *et al.*, 1999; Göbel *et al.*, 2001). Sie sind *in vitro* direkt antimikrobiell wirksam durch stark inhibitorische Wirkung auf die Sporenkeimung, z.B. im Fall von zwei *Phytophthora*-Arten und *Botrytis cinerea* (Prost *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 1999). Außerdem führt in Gerste die exogene Applikation von Colnelensäure lokal und systemisch zu erhöhter Resistenz gegen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Cowley und Walters, 2005). Neben der antimikrobiellen Wirkung kann hier eine Signalfunktion nicht ausgeschlossen werden. In Kartoffelpflanzen, deren 9DES-Akkumulation herabgesetzt ist, konnte jedoch kein Effekt auf die Infektion mit *P. infestans* festgestellt werden (Eschen-Lippold *et al.*, 2007, 2004).

Ein Produkt des HPL-Weges ist 12-Oxo-Dodecensäure (Traumatin). Dieser Metabolit ist seit langem als Wund-induziertes Signal bekannt (English *et al.*, 1939). Andere Reaktionsprodukte sind die C₆-Volatile, die für den jeweiligen Pflanzengeruch und beispielsweise auch den Geruch frisch gemähten Rasens verantwortlich sind. Die jeweilige Volatil-Komposition ist Spezies-spezifisch (Hatanaka *et al.*, 1987). In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein weiteres Reaktionsprodukt, Trans-2-Hexenal, die Expression von Abwehrgenen (Phenylpropanoid-Synthesegene, LOX-Reaktionsweg) induziert. Dieser Effekt ist sehr spezifisch, da erstens strukturverwandte Moleküle diesen Effekt nicht zeigen und zweitens nur die oben genannten Gene in ihrer Expression induziert werden und nicht etwa weitere Abwehrgene wie z.B. PR1 (SA-Markergen) oder Thionin2-1 (JA-Markergen) (Bate und Rothstein, 1998). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Applikation von C₆-Aldehyden und Alkoholen sich negativ auf die Blattlaus-Populationsdichte auf Tomate und Tabak auswirkt (Hildebrand *et al.*, 1993), bzw. antisense-HPL Kartoffelpflanzen eine erhöhte Blattlaus-Populationsdichte zeigen (Vancanneyt *et al.*, 2001). Korrelative Daten aus dem Pathosystem Mandel – *Aspergillus carbonarius* deuten darauf hin, dass HPL-Produkte für die Abwehrantwort auf Pflanzenseite von Bedeutung sind. So zeigen junge

Mandelsamen mit hoher 9LOX- und HPL-Aktivität eine starke Resistenz, reife Samen mit deutlich herabgesetzter Aktivität sind dagegen suszeptibel (Mita *et al.*, 2007). Auch in anderen Beispielen zeigt sich, dass der 9LOX-Weg in verschiedenen Pathosystemen von Bedeutung zu sein scheint. So konnte erstmalig in Tabak gezeigt werden, dass die Expression eines 9LOX-antisense-Konstruktes zum Bruch der Resistenz gegen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* und zur erhöhten Suszeptibilität gegen *Rhizoctonia solani* führt (Rance *et al.*, 1998). Auch im Pathosystem Mais – Nematoden (*Meloidogyne incognita*) hat das Silencing einer 9-Lipoxygenase eine erhöhte Suszeptibilität zur Folge (Gao *et al.*, 2008). In der Interaktion zwischen Baumwolle und *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* konnte in diesem Zusammenhang eine starke Induktion einer 9LOX nach Behandlung mit einem avirulenten Stamm gezeigt werden, die bei Behandlung mit virulenten Bakterien stark unterdrückt wurde (Marmey *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu sind für verschiedene pilzliche Pathogene die Produkte des 9LOX-Weges als Suszeptibilität-vermittelnde Faktoren in Mais beschrieben (Gao *et al.*, 2007; Isakeit *et al.*, 2007).

Eine weitere mögliche Funktion des 9LOX-Weges könnte eine gezielte Kanalisierung schädlicher oxidativer Energie in einen kontrollierten Mechanismus während biotischem und abiotischem Stress darstellen (Mueller, 2004). Auf diese Weise hätten Pflanzen die Möglichkeit, unkontrollierte Radikal-vermittelte Lipidperoxidation mit einhergehender unnötiger Membranschädigung zu vermeiden. In diesem Zusammenhang sind Phytoprostane von Bedeutung. Diese Metabolite sind strukturell mit OPDA verwandt und entstehen durch Radikal-vermittelte Lipidperoxidation. Sie induzieren in Arabidopsis während oxidativen Stresses die Expression einer Reihe von Detoxifikations-Enzymen (Loeffler *et al.*, 2005). Diese Induktion wird durch TGA-Transkriptionsfaktoren vermittelt (Mueller *et al.*, 2008). Andererseits verrichten sie selbst, wie auch andere Lipidperoxidations-Produkte, Schaden an Proteinen. Die Phytoprostan-vermittelte Regulation mit Schädigung auf der einen Seite und Signalgenerierung auf der anderen Seite könnte zusammen mit der 9LOX-Aktivität die pflanzliche Abwehr- bzw. Detoxifikations-Antwort während biotischem und abiotischem Stress fein regulieren.

1.3. Das komplexe Zusammenspiel pflanzlicher Hormone in der Pathogenabwehr

Traditionell betrachtet wird der SA primär eine Rolle in der Resistenz gegen biotrophe Pathogene zugeschrieben, die Abwehr nekrotropher Pathogene und herbivorer Insekten auf der anderen Seite basiert dabei auf JA- / Et-Signalen. In diesem Modell wird vielfach eine

antagonistische Wirkung zwischen SA und JA / Et beschrieben. Neue Ergebnisse zeigen, dass dieses einfache Modell zwar oft richtig ist, jedoch scheint das hormonelle Zusammenspiel während der Pathogenabwehr deutlich komplexer zu sein und mehr Teilnehmer zu haben, als bisher angenommen. So wird neben Abscisinsäure (ABA) auch Auxin, Brassinoliden (BL), Cytokinin und Gibberellinsäure (GA) Abwehr-modulierende Funktion zugeschrieben. Auch synergistische Wirkung zwischen SA und JA / Et wurde beschrieben (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Loake und Grant, 2007; Lorenzo und Solano, 2005; Beckers und Spoel, 2006). Beispielsweise zeigten (Truman *et al.*, 2007) eine frühe Funktion der JA während der Ausbildung der SAR in Arabidopsis.

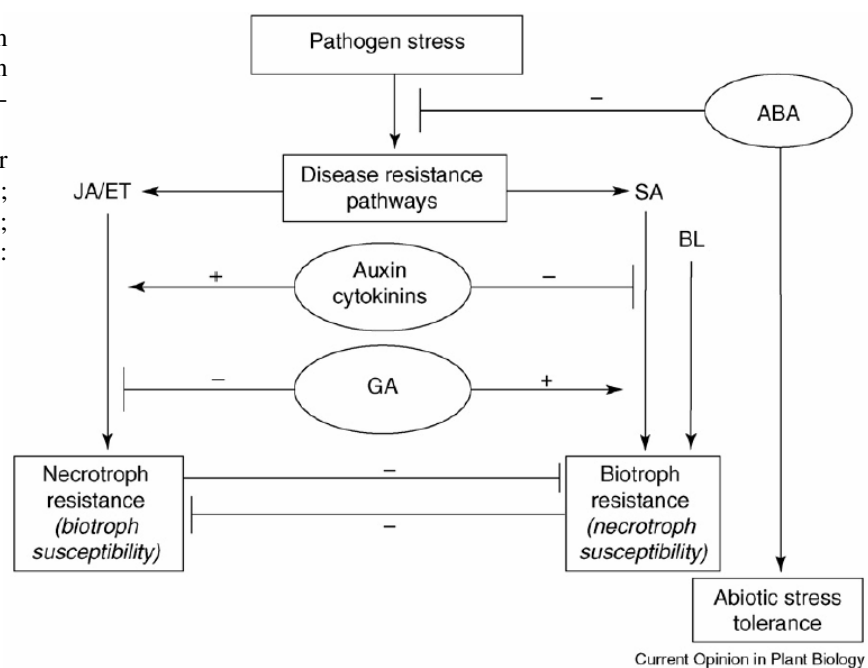
Bezüglich der Komplexität der hormonellen Signalgebung wurde in Arabidopsis gezeigt, dass ABA-Applikation die Expression JA-regulierter Abwehrgene unterdrückt bzw. im Gegenbeispiel ABA-defiziente Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen den nekrotrophen Pilz *Fusarium oxysporum* zeigen (Anderson *et al.*, 2004). Im Pathosystem Arabidopsis - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* konnte mit virulenten Bakterien gezeigt werden, dass SA, JA, Et und Auxin akkumulieren. Ihr Zusammenspiel reguliert die Ausprägung der Krankheitssymptome (O'Donnell *et al.*, 2003). Desweiteren kann auch von Pathogenen selbst der pflanzliche Hormonhaushalt dereguliert werden, um bestimmte Abwehrantworten zu unterdrücken und eine erfolgreiche Kolonisierung zu ermöglichen. Mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) inokulierte Arabidopsis-Pflanzen akkumulieren neben SA und JA auch Auxin und ABA (Schmelz *et al.*, 2003). Dabei zeigten Microarray-Analysen, dass in der Interaktion mit Wildtyp-Bakterien spezifisch Gene der ABA-Synthese, sowie ABA-responsive Gene exprimiert werden. Bakterien mit defektem TTSS (*hrpA*⁻) induzierten diese Antwort nicht. Dieser Mechanismus scheint Effektor-vermittelt zu sein und könnte eine Rolle für die Virulenz des Pathogens bzw. die Krankheitsentwicklung spielen (de Torres-Zabala *et al.*, 2007). Auch in den Pathosystemen Paprika – *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und Arabidopsis – *Plasmodiophora brassicae* konnte eine Rolle weiterer Phytohormone gezeigt werden. Im ersten Fall für Auxin (Marois *et al.*, 2002), im zweiten Fall für Auxin und Cytokinin (Siemens *et al.*, 2006). GA und BL wird ebenfalls eine Rolle in der pflanzlichen Pathogenabwehr zugesprochen. Es ist jedoch anzumerken, dass die genaue Funktion von Auxin, ABA, Cytokinin, GA und BL in der Pathogen-Abwehr in vielen Fällen noch nicht detailliert bekannt ist. Erschwert wird die Analyse der komplexen Zusammenhänge dadurch, dass viele Pathogene in der Lage sind, selbst Phytohormone bzw. verwandte Metabolite zu synthetisieren und so in den Pflanzen-Hormonhaushalt eingreifen (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Das bekannteste Beispiel hierfür ist Coronatin, ein von

Pseudomonas syringae synthetisiertes JA-Analog. Es dient als Virulenzfaktor, der während der Infektion die SA-vermittelte Abwehrantwort unterdrückt und so eine erfolgreiche Infektion ermöglicht (Block *et al.*, 2005; Brooks *et al.*, 2005). In Tomate vermittelt Coronatin eine Induktion der Expression von JA- und Et-Synthese-Enzymen, sowie JA- und Auxin-induzierter Gene (Uppalapati *et al.*, 2005). Coronatin hat auch eine entscheidende Funktion für das Eindringen von Pseudomonaden in die Blätter von Arabidopsis. (Melotto *et al.*, 2006) zeigten, dass eine PAMP-vermittelte Schließung der Stomata Teil der basalen Resistenzantwort ist. Die Autoren zeigten auch, dass von virulenten Pseudomonaden stammendes Coronatin ca. drei Stunden nach der Stomata-Schließung diese spezifisch wieder öffnet und demnach das pflanzliche ABA-Signal zur Schließung der Stomata unterdrückt.

In Abb. 4 ist ein Modell dargestellt, welches das mögliche komplexe Zusammenspiel verschiedener Phytohormone während der Pathogenabwehr bzw. Pflanze-Pathogen-Interaktionen aufzeigt.

Abb. 4. Mögliche Interaktionen zwischen Hormon-Signalwegen während Pflanze-Pathogen-Interaktionen.

+: positiver Effekt; -: negativer Effekt; ABA: Abscisinsäure; BL: Brassinolid; ET: Ethylen; GA: Gibberellinsäure; JA: Jasmonsäure; SA: Salicylsäure. Aus (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007).



1.4. Die Rolle der Sekretion während der Pathogenabwehr

Das Pflanzen-Endomembransystem, bestehend aus Endoplasmatischem Reticulum (ER), Golgi-Apparat und der Vakuole, sowie die Plasmamembran an der Zellperipherie, stehen durch stetigen sekretorischen Vesikeltransport untereinander in Verbindung. Diese

Transportprozesse sind während der gesamten Entwicklung der Pflanze von großer Bedeutung. Entscheidende Funktionen während der Cytokinese und Zellexpansion, dem polarisierten Transport von Auxin, der ABA-Signaltransduktion, abiotischem Stress und der Pathogenabwehr sind beschrieben (Carter *et al.*, 2004).

Während der Pathogenabwehr ist der polarisierte Transport von antimikrobiellen Metaboliten und Proteinen zum Ort des versuchten Eindringens nötig (Schulze-Lefert, 2004), um eine lokale Schwellenkonzentration zu erreichen, die ausreicht, das Pathogen zu stoppen (Hückelhoven, 2007). Dieser definierte Transportmechanismus konnte in mehreren Pathosystemen gezeigt werden.

Auch für die Ausbildung der SAR ist eine koordinierte Expression von *PR*- und Sekretions-Genen, sowie deren Funktionalität essentiell. Mutationen in Genen, die der ER-Proteinfaltungs- und der Sekretionsmaschinerie angehören, führen zu verminderter *PR1*-Sekretion und dem Verlust der systemischen Resistenz gegen *Pseudomonaden* (Wang *et al.*, 2005). Die Grundlage der Sekretionsprozesse bildet die Cytoskelet-Reorganisation, einer der frühesten Mechanismen der Pathogenabwehr bei versuchter Pilz- und Oomyceteninfektion und entscheidend für die Penetrationsresistenz. Sie dient z.B. dem Aktin-abhängigen polarisierten Transport von verstärkendem Zellwandmaterial zur Penetrationsstelle und der zielgerichteten Ausrichtung von ER und Golgi für die Sekretion (Hardham *et al.*, 2007).

Um zu gewährleisten, dass innerhalb des komplexen Vesikeltransport-Netzwerkes die Fusion nur mit dem richtigen Zielkompartiment erfolgt, steuern interagierende SNARE-Proteine (SOLUBLE N-ETHILMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR ATTACHMENT PROTEIN RECEPTOR) den Kontakt zwischen Vesikel und Zielmembran und ermöglichen so die Fusion. Dabei tragen Vesikel und Zielmembran unterschiedliche SNAREs, die spezifisch interagieren und zusammen den ternären SNARE-Komplex bilden. Dieser besteht in der Regel aus einem Vesikel-SNARE (v-SNARE) und zwei Zielmembran (*target*)-SNAREs (t-SNAREs) (Pratelli *et al.*, 2004). SNARE-Proteine können anhand ihrer SNARE-Motivdomänen in vier Familien unterteilt werden: Q_a, Q_b, Q_c (t-SNAREs) und R (v-SNAREs) (Bock *et al.*, 2001). In einem funktionalen ternären SNARE-Komplex finden sich alle vier Motive (s. u.). Vorrangig in *Arabidopsis* und Reis, aber auch anderen Pflanzenspezies, sind eine Vielzahl von verschiedenen SNAREs beschrieben worden (Sutter *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2004; Pratelli *et al.*, 2004). Die Vertreter aus *Arabidopsis* sind phylogenetisch, Gewebespezifisch und in ihrer subzellulären Lokalisation in einer aufwendigen Studie untersucht und intrazellulären Transportrouten zugeordnet worden (Uemura *et al.*, 2004). An dieser Stelle soll nur auf einige Pathogenabwehr-relevante Vertreter eingegangen werden. Die

Arabidopsis-Mutante *pen1* (*penetration 1 = syp121* [syntaxin-related protein 121]) zeigt einen Verlust der Penetrationsresistenz gegen das Nichtwirts-Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*), der mit stark erhöhtem Zelltod einhergeht. Das Gerste-Homolog ROR2 (REQUIRED FOR MLO-RESISTANCE 2) vermittelt dagegen basale Resistenz, ebenfalls gegen *Bgh*. Im *ror2*-Hintergrund kann das *AtPEN1*-Gen zur Komplementation eingesetzt werden (Collins *et al.*, 2003). Der Penetrationsphänotyp in *pen1*-Arabidopsispflanzen korreliert dabei nicht mit einem Verlust der Pathogen-induzierten Cytoskelett-Reorganisation (Takemoto *et al.*, 2006). In weiterführenden Arbeiten konnte kürzlich ein funktionaler pflanzlicher ternärer SNARE-Komplex nachgewiesen werden, der neben PEN1 (Q_a-SNARE) zusätzlich aus AtSNAP33 (SYNAPTOSOME-ASSOCIATED PROTEIN OF 33 kDa, Q_{b+c}-SNARE) und AtVAMP721 / 722 (VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEINS, R-SNARE) besteht (Kwon *et al.*, 2008). Das nächst-verwandte Homolog zu *PEN1* ist *AtSYP122*. Doppelmutanten erwiesen sich als zwergwüchsig und nekrotisch, mit veränderter molekularer Zellwandzusammensetzung und stark erhöhten SA-Mengen. Die Einzelmutanten dagegen zeigen keinen sichtbaren Phänotyp, was auf funktionelle Redundanz beider Proteine hindeutet (Zhang *et al.*, 2007; Assaad *et al.*, 2004). Eine mechanistische Verbindung zwischen Sekretion und frühen Elicitor-induzierten Ca²⁺-Strömen konnte durch den Nachweis der Ca²⁺-abhängigen Phosphorylierung von AtSYP122 in Experimenten mit dem bakteriellen Elicitor flg22 erbracht werden (Nühse *et al.*, 2003). Auch in der *R*-Gen-spezifischen Resistenzantwort in Tabak kommt es zur Phosphorylierung eines Syntaxins (Heese *et al.*, 2005).

Das *PEN1*-Homolog in Tabak ist *NtSYR1*, welches für die ABA-vermittelte Stomata-Schließung nötig ist. In Kompetitor-Studien und Versuchen mit inaktiviertem *NtSYR1* wurde diese ABA-Responsivität zerstört. Die der Stomata-Schließung vorausgehenden Ionenströme über K⁺- und Cl⁻-Kanäle in den Schließzellen blieben aus (Leyman *et al.*, 1999). *NtSYR1* ist an der Zellmembran lokalisiert, seine Expression ist durch ABA induzierbar (Leyman *et al.*, 2000) und in einer Interaktionsstudie konnten Tabak-Homologe des SNAP33-Proteins aus Arabidopsis als putative Partner zur Bildung eines SNARE-Komplexes identifiziert werden (Kargul *et al.*, 2001). In Versuchen mit einem sekretierten Markerprotein konnte dann nachgewiesen werden, dass *NtSYR1* tatsächlich für die Sekretion nötig ist. Nur wenn *NtSYR1* funktional vorliegt, kann das Markerprotein sekretiert werden. Die *NtSYR1*-vermittelte Sekretion wird allerdings nicht wie das Arabidopsis-Homolog *AtSYP121* mit der Pathogenabwehr in Verbindung gebracht, sondern mit der Pflanzenentwicklung und Zell-Homöostase (Geelen *et al.*, 2002).

1.5. Die Rolle von SA und JA für die Pathogenabwehr der Kartoffel

Untersuchungen zur Rolle der SA für die Pathogenabwehr der Kartoffel lieferten gegensätzliche Ergebnisse, die kein klares Bild ergeben (Halim *et al.*, 2006). In frühen Arbeiten wurde jedoch bereits in Infektionsexperimenten mit *Phytophthora infestans* eine positive Korrelation zwischen der hohen Feldresistenz einiger Sorten und erhöhten endogenen SA-Mengen hergestellt (Coquoz *et al.*, 1995). Auch führte die Überexpression des SA-responsiven Gens *StPR5* zu einer Verzögerung der Infektion (Liu *et al.*, 1994). Neue Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit der SA für die basale Resistenz gegen *P. infestans*. *NahG*-exprimierende Pflanzen weisen einen Defekt in der Callose-Bildung und der frühen Abwehr-Genexpression auf (Halim *et al.*, 2007). Diese Arbeit zeigt auch, dass trotz unverändertem sichtbarem Infektionsphänotyp (Läsionsbildung) in *NahG* im Vergleich zum Wildtyp (Yu *et al.*, 1997a) diese Pflanzen ein signifikant höheres Wachstum von *P. infestans* erlauben.

Die Infiltration des PAMPs Pep-13 aus *Phytophthora* spp. führt in Kartoffel lokal neben der SA-Akkumulation, einem *oxidative burst* und Abwehrgen-Expression auch zu einer Akkumulation von OPDA und JA (Halim *et al.*, 2004). In systemischem Gewebe kommt es nach Induktion der systemischen Resistenz durch Infiltration mit dem Nichtwirts-Bakterium *P. syringae* pv. *maculicola* zur Akkumulation von OPDA, der damit eine hypothetische Rolle für die Ausbildung der SAR in Kartoffel zukommt (Landgraf *et al.*, 2002). Zur Generierung eines systemischen SAR-Signals sind sowohl der funktionale JA-, als auch der SA-Syntheseweg nötig, ein negativer *crossstalk* zwischen beiden Signalen, wie in Arabidopsis beschrieben (s.o.), scheint nicht gegeben (Halim, 2006). Erste Hinweise für eine direkte Rolle der JA während der Pathogenabwehr der Kartoffel wurden aus JA- und JAME-Applikationsexperimenten abgeleitet. (Cohen *et al.*, 1993) erzielten in behandelten Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen *P. infestans* sowohl in lokalem, als auch in systemischem Gewebe. Für die Abwehrantwort gegen Insekten spielt die 13LOX *StLOX3* eine Rolle. *Antisense*-Konstrukt-exprimierende Pflanzen wiesen zwar unveränderte JA-Mengen auf, die Proteinase-Inhibitor 2 (PIN2)-Transkript-Akkumulation war jedoch stark unterdrückt. Damit korrelierte eine erhöhte Gewichtszunahme von Kartoffelkäfer- und Zuckerrübeneneulenlarven auf diesen Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen (Royo *et al.*, 1999). Ein anderer Ansatz adressierte die Rolle 13HPL-produzierter Aldehyde. (Vancanneyt *et al.*, 2001) zeigten, dass *St13HPL-antisense*-Pflanzen nach Blattlausbefall reduzierte Aldehyd-Mengen akkumulieren.

Die *Antisense*-Pflanzen erlaubten dabei eine erhöhte Zunahme der Populationsdichte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen.

Generell betrachtet sind in Kartoffel drei LOX-Isoformen vorhanden, LOX1-3 (Royo *et al.*, 1996). LOX1-Isoformen werden vorrangig in unterirdischen Organen exprimiert und zeigen 9LOX-Spezifität. LOX2-Isoformen werden in Blättern exprimiert, LOX3-Isoformen in Wurzeln und schwach in Blättern (StLOX3, s.o.). Beide zeigen 13LOX-Aktivität.

Korrelative Expressionsdaten weisen auf eine Funktion des 9LOX-Weges für die Abwehrantwort gegen *P. infestans* hin (Kolomiets *et al.*, 2000). In Zellkultur-Experimenten zeigte sich, dass der 9LOX-Weg (LOX1-Isoform-vermittelt) mit nachgeschalteter Reduktase-, DES- und EAS-Aktivität der präferentiell stimulierte Oxylinweg in Kartoffel nach Elicitor-Behandlung ist (Göbel *et al.*, 2001). Eine direkte antimikrobielle Wirkung von 9-Oxylinen konnte *in vitro* gezeigt werden (Weber *et al.*, 1999; Prost *et al.*, 2005). Der 9LOX-Weg ist auch während der Lipid-Peroxidation, die der Ausbildung der HR vorausgeht, von Bedeutung. So zeigen 9LOX-RNAi-Pflanzen einen Verlust an 9LOX-produzierten Oxylinen. Damit korrelieren erhöhte autoxidative und 13LOX-Produktmengen (Göbel *et al.*, 2003). In Tabak ist nach Elicitor-Behandlung ebenfalls der 9LOX-Weg dominierend und notwendig für die HR (Cacas *et al.*, 2005; Rusterucci *et al.*, 1999). Aus Tabak stammt auch der erste Hinweis, dass ein Verlust der 9LOX-Aktivität mit dem Verlust von Pathogen-Resistenz einhergehen kann: (Rancé *et al.*, 1998) beschrieben einen Bruch der Isolat-spezifischen Resistenz gegen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Ppn) in 9LOX-antisense Pflanzen.

1.6. Zielstellung

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der Pathogen-induzierbare 9LOX (StLOX1)-Weg in Kartoffel (*Solanum tuberosum*) näher charakterisiert werden. Zum einen sollte der Einfluss der StLOX1 auf die Knollenbildung und der mikroskopische Infektions-Phänotyp nach *P. infestans*-Inokulation in *StLOX1*-RNAi- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen untersucht werden. Ein weiteres Ziel waren Infektionsexperimente mit pilzlichen Pathogenen, die die Rolle des StLOX1-Weges für die Pathogenabwehr klären sollten. Auch der Einfluss von abiotischem Stress auf die RNAi-Pflanzen sollte untersucht werden. Zur Charakterisierung des 9AOS-Zweiges innerhalb des StLOX1-Weges sollten *StAOS3*-RNAi-Pflanzen hergestellt und biochemisch und phänotypisch analysiert werden. Im Fokus des zweiten Teiles dieser Arbeit stand die Regeneration von *StLOX1*-RNAi- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen im gegen *P. infestans* resistenten genetischen Hintergrund Désirée-RI. Diese Pflanzen sollten dann

biochemisch und in ihrer Antwort auf eine Infektion mit *P. infestans* untersucht werden, um die Rolle des *StLOXI*-Weges für die Rasse-Sorten-spezifische Resistenz zu klären. Der dritte Teil behandelte die Überprüfung einer möglichen Funktion der 9-Oxylipine als Signalmoleküle während der Pathogenabwehr. Dazu wurden Microarray-Daten ausgewertet und Kandidatengene funktionell analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Pflanzen

Für die Versuche wurden Wildtyp-Kartoffelpflanzen der Sorte Désirée (WT) verwendet (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée; freundlicherweise von E. Tacke, Bioplant GmbH, Ebstorf zur Verfügung gestellt). Zur Bearbeitung spezifischer Aufgabenstellungen standen weiterhin bereits vorhandene verschiedene transgene Linien im Désirée WT-Hintergrund zur Verfügung: 1.) mit dem *RI*-Resistenzgen gegen *Phytophthora infestans* transformierte Linien (10-5, 10-23 und mit leerem Vektor transformierte Kontrolle) (freundlicherweise von C. Gebhardt, MPIZ, Köln zur Verfügung gestellt [Ballvora *et al.*, 2002]), 2.) mit einem *StLOX1*-RNAi-Konstrukt transformierte Linien (F, J, K, O und mit leerem Vektor transformierte Kontrolle), bei denen die Transkript-Akkumulation der Pathogen-induzierbaren 9-Lipoxygenase (*StLOX1:St:7*; *POTLX-3*; AAB67865) herabgesetzt ist (Göbel *et al.*, 2003), 3.) mit einem *St9DES*-RNAi-Konstrukt transformierte Linien (V1, V2 und mit leerem Vektor transformierte Kontrolle), bei denen die Transkript-Akkumulation der Pathogen-induzierbaren 9-Divinylether-Synthase herabgesetzt ist (Eschen-Lippold *et al.*, 2007). Außerdem standen mit dem *St9DES*-RNAi-Konstrukt transformierte Désirée-*RI* Linien (s.o.) zur Verfügung (*St9DES*-RNAi-*RI*; C1, C2, C3, G1, G2). Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die folgenden transgenen Linien generiert: 1.) *StLOX1*-RNAi-*RI* (Herabsetzung der Transkript-Akkumulation der 9-Lipoxygenase im resistenten Hintergrund *RI* [s.o.]), 2.) *StAOS3*-RNAi (Herabsetzung der Transkript-Akkumulation der 9-Alloxid-Synthase im WT-Hintergrund), 3.) *StSYR1*-RNAi (Herabsetzung der Transkript-Akkumulation des *Nicotiana tabacum*-Homologs *SYNTAXIN-RELATED 1* [*NtSYR1*]), 4.) *StSNAP33*-RNAi (Herabsetzung der Transkript-Akkumulation des *A. thaliana*-Homologs *SYNAPTOSOME-ASSOCIATED PROTEIN 33* [*AtSNAP33*]).

2.1.2. Bakterien

Zu Klonierungszwecken wurden die *E. coli*-Stämme DH₅α (s. 2.2.22) und TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Für die Transformation von Kartoffelpflanzen wurde der *A. tumefaciens*-Stamm AGL0 verwendet (Lazo *et al.*, 1991). Infiltrationsexperimente mit Kartoffelblättern wurden mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2 (*avrRpm1*) (*Psm*) durchgeführt.

2.1.3. *Phytophthora infestans*

Infektionsexperimente wurden mit dem *P. infestans*-Isolat 208m2 durchgeführt (freundlicherweise von F. Mauch, Universität de Fribourg, Schweiz zur Verfügung gestellt), das stabil mit GFP (*green fluorescent protein*) transformiert wurde (Si-Ammour *et al.*, 2003).

2.2. Methoden

2.2.1. Medien

Tab. 1. Medien

<u>2MS-Medium:</u> 4,41 % MS-Salze (Duchefa, Haarlem, NL) 6 % (w/v) plant agar 20 % (w/v) Saccharose pH 5,0	<u>LB-Medium</u> 10 % (w/v) Bacto-Trypton 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract 5 % (w/v) NaCl (15 % [w/v] Agar)
<u>SOB-Flüssigmedium:</u> 20 % (w/v) Bacto-Trypton 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl 25 mM KCl pH 7,0 100 mM MgCl ₂	<u>FG76-Medium:</u> 1 % (v/v) Vitaminlsg. (5 % [w/v] Nicotinsäure, 5 % [w/v] Pyridoxin-HCl, 10 % [v/v] Thiamin-HCl, 20 % [w/v] Glycin) 0,1 mg/ml Carbenicillin 0,1 µg/ml BAP 5 µg/ml NAA in GMS (s.u.)
<u>3MS-Medium:</u> 30 % (w/v) Saccharose 0,5 % (w/v) MES 4,41 % (w/v) MS-Salze (Duchefa) pH 5,8 (6 % [w/v] plant agar)	<u>FG75-Medium:</u> 1 % Vitaminlsg. (s. FG76-Medium) 0,25 mg/ml Carbenicillin 0,002 mg/ml Zeatinriboside 0,02 µg/ml NAA 0,02 µg/ml GA ₃ in GMS (s.u.)
<u>Hafer-Bohne-Medium:</u> 34 % (w/v) Bohnenmehl 17 % (w/v) Hafermehl 8,5 % (w/v) Saccharose 15 % (w/v) Agar	<u>GMS-Medium:</u> 16 % (w/v) Glucose 0,5 % (w/v) MES 4,41 % (w/v) MS-Salze (Duchefa) pH 5,8 (7,5 % [w/v] plant agar)
<u>Soja-Flüssigmedium (Yu <i>et al.</i>, 1997b)</u>	
20 % (w/v) Saccharose 5 % (w/v) Soja-Protein (MP Biomedicals, USA) 5 % (w/v) KNO ₃ 5 % (w/v) KH ₂ PO ₄	2 % (w/v) MgSO ₄ 0,5 % (w/v) CaCl ₂ 0,5 % (w/v) CuSO ₄ pH 5,0

2.2.2. Pflanzenanzucht (Normalbedingungen)

Die Erhaltung und Vermehrung der verwendeten Kartoffellinien wurde in sterilen Meristemkulturen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) mit entsprechenden Selektions-Antibiotika (siehe A.8.) in einer Phytokammer durchgeführt. Dabei kam ein Licht/Dunkel-Regime von 16 h / 8 h mit einer Lichteinstrahlung von 200 μE bei 22 °C, bzw. 18 °C in der Dunkelphase zur Anwendung. Zu Versuchszwecken wurden die Pflanzen in ein durch Dämpfen sterilisiertes 1:1 Erde-Sand-Gemisch (v/v) in Plastiktöpfe (11 x 11 cm; Lamprecht Verpackungen, Göttingen) ausgetopft und in einer Phytokammer unter obigen Bedingungen 3 Wochen angezogen.

2.2.3. Gewinnung von Kartoffelwurzelnproben

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in Töpfen (8 cm, rund; Lamprecht Verpackungen, Göttingen) in Perlit (Kammlott Gärtnereibedarf, Erfurt) in einem Anzuchtschrank mit einem Licht / Dunkel-Regime von 16 h / 8 h (200 μE Lichteinstrahlung) bei 18 °C. Dazu wurden die Töpfe erst mit Plastikfolie ausgekleidet und dann mit Perlit aufgefüllt. Einmal pro Woche wurden die Pflanzen mit MS-Flüssigmedium gegossen, bei zusätzlichem Bedarf mit Wasser. Nach 5 Wochen erfolgte die Ernte der Wurzeln.

2.2.4. Oxidativer Stress: Starklicht und Wasserstress

Starklichtversuche wurden freundlicherweise mit Hilfe von Olaf Barth (AG Humbeck, Uni Halle) durchgeführt. Nach Anzucht der Pflanzen unter Normalbedingungen (s. 2.2.2.), wurde in einem Anzuchtschrank eine Starklicht-Exposition von 54 h (ca. 950 μE) durchgeführt. Danach erfolgte die Messung der maximalen Photosystem II-Effizienz (F_v/F_m) entsprechend (Humbeck *et al.*, 1996).

Bei Überflutungsstress-Versuchen wurden Pflanzen eine Woche unter Normalbedingungen (s. 2.2.2.) angezogen. Dann wurden die Töpfe in Plastikwannen mit Wasser bis zum Rand geflutet (Wasserstandshöhe = Pflanzenwurzelhalse) und für drei Wochen unter Normalbedingungen weiter kultiviert. Als Maß wurde die Überlebensrate bestimmt.

Trockenheitsversuche wurden nach einwöchiger Anzucht unter Normalbedingungen (s. 2.2.2.) durch ein letztes Gießen mit einem definierten Volumen Wasser (400 ml) begonnen. Die Pflanzen wurden unter Normalbedingungen, ohne zu gießen, drei Wochen

weiter kultiviert. Dann wurde 48 Stunden nach kräftigem Gießen die Überlebensrate bestimmt.

2.2.5. Wurzelwachstums-Versuche in Sterilkultur

Spross-Spitzen von steril angezogenen Pflanzen wurden in Glasröhrchen (16 cm lang, 1,8 cm Durchmesser) mit Hoagland-Minimalmedium (0,016 % [w/v] Hoagland-Medium [SIGMA-ALDRICH, München], 0,1 % [w/v] MES, 1 % [w/v] Saccharose, 0,05 % [v/v] Fe-HBED, pH 5.7, 1 % TypA-Agar [SIGMA-ALDRICH, München]) gepflanzt. Die Anzucht erfolgte unter Normalbedingungen (s. 2.2.2). Für die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von CuSO_4 auf das Wurzelwachstum wurden im Medium verschiedene Konzentrationen eingestellt (1, 5, 10, 15, 20, 25 μM). 20 Tage nach Versuchsbeginn erfolgte die Wurzellängen-Messung.

2.2.6. Miniknollenbildung in Sterilkultur

Sterile Spross-Explantate mit einem Nodium wurden in Knolleninduktions-Medium (4,41 % MS-Salze [Duchefa, Haarlem, NL], 8 % Saccharose, 500 $\mu\text{g/ml}$ Chlorcholinchlorid, 5 $\mu\text{g/ml}$ Benzylaminpurin) gepflanzt und ca. 3 Monate im Dunkeln (18 °C) angezogen. Danach wurde die Miniknollenbildung pro Explantat und Pflanzenlinie ausgewertet.

2.2.7. Stabile Transformation von Kartoffelpflanzen mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Kartoffelpflanzen erfolgte in Anlehnung an (Feltkamp *et al.*, 1995). Dazu wurde eine *A. tumefaciens*-Kultur in 20 ml LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 28 °C im Schüttelinkubator angezogen. Die Bakterien wurden in einem 50 ml Reaktionsgefäß 10 min bei 8 °C und 4000 x g pelletiert, zum Waschen dann vorsichtig in 20 ml 10 mM MgCl_2 resuspendiert und erneut 10 min bei 8 °C und 4000 x g pelletiert. Das gewaschene Pellet wurde in 10 ml 3MS-Medium durch vorsichtiges Schwenken gelöst und die fertige Bakteriensuspension auf Eis gestellt.

Blätter der zu transformierenden Kartoffelpflanzen wurden steril von Pflanzen aus Meristemkultur abgeschnitten, mittels Skalpell eingeritzt und dann mit der Unterseite nach oben in Petrischalen auf 10 ml 3MS-Medium, das mit 100 μl der fertigen *A. tumefaciens*-Kultur versetzt wurde, 2 Tage im Dunkeln bei 22 °C schwimmend inkubiert.

Zur Induktion des Kalluswachstums wurden die Blätter daraufhin in Petrischalen mit FG76-Medium gebettet (Kallus-Induktionsmedium).

Nach einwöchiger Inkubation in der Phytokammer (s.o.) wurden die Blätter dann in Petrischalen auf FG75-Medium zur Sproß-Induktion umgesetzt. Alle 14 Tage musste dieser Schritt wiederholt werden. Nach einigen Wochen trieben die Blattkalli einzelne Sprosse, die steril abgeschnitten und auf 3MS-Medium, versetzt mit entsprechendem Antibiotikum, in der Phytokammer (s.o.) kultiviert wurden.

2.2.8. Erhaltung und Dauerkulturen von *P. infestans*

Zum Animpfen von Kulturen für Infektionsexperimente (s. 2.2.10.) und zur Herstellung von Dauerkulturen wurde *P. infestans* auf Hafer-Bohne-Medium in Petrischalen bei 18 °C im Dunkeln angezogen.

Dauerkulturen wurden zum einen direkt mit etwa 0,6 cm großen ausgestochenen Mycelstücken angefertigt, wobei je ein Mycelstück pro 2 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl Glycerin-Wasser Gemisch (1:1, v/v) versetzt wurde. Des weiteren wurden Dauerkulturen aus Sporangien gefertigt, in diesem Fall überimpft man ein ca. 0,6 cm großes Mycelstück auf frisches Hafer-Bohne-Medium im liegenden 50 ml-Erlenmeyerkolben. Die Kultivierung erfolgt dann 10-12 Tage im Dunkeln bei 18 °C. Zur Gewinnung der Sporangien wurden die Kolben mit 10 ml Glycerin-Wasser Gemisch (1:1, v/v) versetzt, kurz stark geschüttelt und sofort 500 µl Aliquots in 2ml Reaktionsgefäße abgefüllt. Beide Typen von Dauerkulturen wurden eine Stunde bei -18 °C gekühlt, dann eine Stunde bei -80 °C gefroren und danach dauerhaft in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.2.9. Zoosporensuspensionen von *Phytophthora infestans* für Infektionsexperimente

Entsprechend den Angaben für Sporangien-Dauerkulturen (s. 2.2.8.) wurde ein im Durchmesser ca. 0,6 cm großes Mycelstück aus einer vollständig mit *P. infestans* bewachsenen Hafer-Bohne-Platte ausgestochen und auf frisches Hafer-Bohne-Medium im liegenden 50 ml-Erlenmeyerkolben überimpft. Nach 11 Tagen Kultivierung im Dunkeln bei 18 °C wurde das Mycel mit 10 ml Wasser überschichtet und der Kolben dann stehend 3 h bei 4 °C im Kühlraum inkubiert. Zur Gewinnung einer reinen Sporensuspension wurde der Kolben kurz vorsichtig geschwenkt und dann durch ein feinmaschiges Käseerei-Seihtuch in ein 50 ml Reaktionsgefäß filtriert, um abgelöstes Mycel und Sporangien von den Sporen zu

trennen. Die Sporendichte der Suspension wurde mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und auf 1×10^5 Sporen / ml eingestellt.

Wenig aggressive Kulturen wurden gewonnen durch mehrmonatige Subkultivierung auf Hafer-Bohne-Medium. Die Sporengewinnung erfolgte wie oben.

2.2.10. Infektions- und Infiltrationsexperimente

2.2.10.1. Inokulation von Kartoffelpflanzen mit *P. infestans*-Zoosporensuspension

Zur Bestimmung des Wachstums von *P. infestans* mittels Realtime-PCR wurden pro Pflanze zwei Blätter mit je 8 10µl-Tropfen der Zoosporensuspension (2.2.9.), gleichmäßig das gesamte Blatt abdeckend, versehen. Die für die Keimung und Infektion nötige relative Luftfeuchte von 100 % wurde durch Umhüllen der inokulierten Blätter mit einem Kordelzug-Plastikbeutel (Roth, Karlsruhe) gewährleistet. Alle Inokulationsstellen einer Pflanze wurden mit einem Korkbohrer Größe 3 ausgestanzt, gepoolt und für die DNA-Extraktion sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.10.2. Infiltration von Kartoffelblättern mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*

Als Vorkultur wurden 2 ml LB-Flüssigmedium aus einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. 1 ml der Vorkultur dienten am nächsten Morgen zum Animpfen von 50 ml LB-Flüssigmedium. Bei 28 °C wurde diese Hauptkultur bis zu einer $OD_{600} = 0,2$ angezogen, dann für 5 min bei 5000 x g und 4 °C abzentrifugiert, das Pellet mit 10 mM $MgCl_2$ gewaschen und die Zellen anschließend in 20 ml 10 mM $MgCl_2$ aufgenommen. Zur Infiltration kam eine $OD_{600} = 0,2$ (entsprechend 1×10^8 cfu/ml) zum Einsatz. Die Infiltration erfolgte mit einer Spritze ohne Kanüle auf der Blattunterseite.

2.2.10.3. Inokulationsexperimente mit *Colletotrichum*-Spezies

C. coccodes (Wallr.) S. Hughes bzw. *C. lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav (beide freundlicherweise von Frau Mariela Mielke und Herrn Prof. Deising, Uni Halle, zur Verfügung gestellt) wurden 5 d bei 18 °C im Dunkeln auf einem Schüttler in 50 ml Soja-Flüssigmedium (Yu *et al.*, 1997b) angezogen, dann in einem 50 ml Reaktionsgefäß 5 min bei 2100 x g (4 °C) das Myzel pelletiert, der Überstand in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt (ad 50ml dest. H_2O) und 10 min bei 6500 x g (4 °C) die Sporen pelletiert. Das Pellet wurde mit ca. 20 ml dest. H_2O gewaschen, wieder 10 min bei 6500 x g (4 °C) zentrifugiert,

der Überstand verworfen und die Sporen in dest. H₂O bzw. Soja-Medium auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die Anzucht der Pflanzen und Ernte der Wurzeln in Inokulationsexperimenten erfolgte entsprechend 2.2.3.

2.2.11. Realtime-PCR

Die Aufarbeitung der Proben geschah mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden), die PCR-Reaktionen mit dem ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung des qPCR Supermix-UDG w/ROX (Invitrogen, Karlsruhe). Zur Datenanalyse wurde die ABI Prism 7000 Sequence Detection-Software v. 1.1 eingesetzt. Alle Arbeiten erfolgten entsprechend den Anweisungen der Hersteller, im Detail ersichtlich aus (Eschen-Lippold *et al.*, 2007).

2.2.12. Anilinblau-Färbung nach (Adam and Somerville, 1996)

Die Blätter wurden in 96 % Et-OH zum Entfärben gekocht, erst mit 50 % Et-OH, dann mit Wasser gewaschen und schließlich 30 min mit Anilinblau-Färbelösung (150 mM KH₂PO₄ [pH 9,5], 0,01 % [w/v] Anilinblau) im Dunkeln gefärbt. Die Proben wurden dann in 50 % (v/v) Glycerin auf Objektträger aufgezogen.

2.2.13. Trypanblau-Färbung adaptiert aus (Keogh *et al.*, 1980; Peterhänsel *et al.*, 1997)

In Färbelösung (Lactophenol: 25 % Glycerin, 25 % DL-Milchsäure, 25 % H₂O, 25 % Phenol; dann 0,1 % Trypanblau hinzu, plus 200% 96 %-Et-OH) gekochte Blätter (bis grüne Färbung entfernt) wurden über Nacht in Chloralhydrat (2,5 g / ml) unter Schwenken entfärbt und in 50 % (v/v) Glycerin auf Objektträger aufgezogen.

2.2.14. Klonierungen

Die Durchführung sämtlicher Standard-Klonierungsschritte erfolgte entsprechend (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.15. Klonierungsvektoren

Zur Klonierung von Genfragmenten wurde der TA-Cloning[®]-Kit mit dem pCR[®]2.1-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Die Klonierung von RNAi-Konstrukten wurde auf der Gateway[®]-Technology (Invitrogen) basierend durchgeführt. Dabei kam der pENTRTM-Vektor des pENTRTM/D-TOPO[®]-Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe) als Gateway[®] Entry-Vektor zum Einsatz. Als Gateway[®] Destination-Vektor wurde der pHELLSGATE8-Vektor (Helliwell *et al.*, 2002; Wesley *et al.*, 2001) verwendet. Die nötige Rekombinationsreaktion zwischen pENTRTM-Vektor und pHELLSGATE8-Zielvektor wurde mit dem Gateway[®] LR ClonaseTM II Enzyme Mix. Alle Reaktionen erfolgten entsprechend den Herstellerangaben (Vektorkarten siehe A.1. und A.2.).

2.2.16. Amplifizierung von Genfragmenten aus genomischer DNA

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit der *Taq* DNA Polymerase, *recombinant* (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend den Herstellerangaben.

2.2.17. DNA-Fragment-Isolierung aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von unter UV-Licht ausgeschnittenen DNA-Banden wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.18. Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren

Ligationen wurden mit dem T4 DNA Ligase-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.19. Restriktionsansätze für Klonierungen

Restriktionsansätze wurden mit Enzymen der Firmen Fermentas (St. Leon-Roth), Roche (Mannheim) und Invitrogen (Karlsruhe) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.20. Klonierung von pHELLSGATE8-Hyg^R (*HPTII*) (s. A.3.)

Der Austausch der Kanamycin-Resistenzkassette im pHELLSGATE8-Vektor (Helliwell *et al.*, 2002) gegen die Hygromycin-Resistenzkassette aus dem pBHTX-Vektor

(Gatz *et al.*, 1992) erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *Eco8II* und *BfrI*. Dazu wurde das *HPTII*-Gen amplifiziert (pnos_5: agaattaaggagtcacgttatga; pAg7-Bfr1_3: cttaagaattcccatcttgaagaaat), mit angefügter BfrI-Schnittstelle (cttaag) am 3'-Ende, und in den *pHELLSGATE8*-Vektor ligiert.

2.2.21. Klonierung von *pHELLSGATE8-DAOI / -DSDA* (vgl. A.4.)

Der Austausch der Kanamycin-Resistenzkassette im *pHELLSGATE8*-Vektor (Helliwell *et al.*, 2002) gegen *DAOI*- bzw. *DSDA*-Kassette (Erikson *et al.*, 2005, 2004) erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *Eco8II* und *BfrI*. Die Austausch-Konstrukte, bestehend aus *nos*-Promoter, *DAOI / DSDA* und *pAG7*-Terminator wurden mittels Fusions-PCR (Hobert, 2002) kloniert. Dazu wurden im ersten Schritt die zu fusionierenden Fragmente amplifiziert (Überhänge, die die Fusion ermöglichen, sind unterstrichen): der *nos*-Promoter aus dem *pHELLSGATE8*-Vektor (pnos-pHG8_5: gggtttctggagttaagctaaagc; pnos_3-daoI_5a: cttctgcgagtcgatggtggtgcagattatttgattg bzw. pnos_3-dsdA_5a: gtttcaacgcagcatggatcctgcagattatttgattg), der *pAG7*-Terminator aus dem *pBHTX*-Vektor ([Gatz *et al.*, 1992]; daoI_3-pAg7_5b: gaagtgtagggcgggattcgatccccgatgagcta bzw. dsdA_3-pAg7_5b: tgcgcttagatgaggatccgatccccgatgagcta; pAg7-BfrI_3: cttaagaattcccatcttgaagaaat) und *DaoI* aus dem VC-RLM208qcz-Plasmid (BASF Plant Science; pnos_3-daoI_5b: caatccaaataatctgcaccaccatgcactcgagaag; daoI_3-pAg7_5a: tagctcatcgggggatcgaatcccgcctacaacttc) bzw. *DsdA* aus dem VC-SUH406qcz-Plasmid (BASF Plant Science; pnos_3-dsdA_5b: caatccaaataatctgcaggatccatgctgcgttgaaac; dsdA_3-pAg7_5a: tagctcatcgggggatcggatcctcatctaagcgca). Im zweiten Schritt wurden die Einzelfragmente in einem PCR-Vorlauf fusioniert (Standard-Bedingungen, 10 Zyklen), mit *pnos* und *pAg7* als Primern. Das Verhältnis zwischen den drei Einzelfragmenten wurde etwa 1:1:1 gewählt. Danach wurde der Ansatz verdoppelt und die beiden äußeren, Fragment-begrenzenden Primer pnos-pHG8_5 (s.o.) und pAg7-BfrI_3 (s.o.), hochkonzentriert zugegeben (500 pmol). Der folgende PCR-Hauptlauf beinhaltete 40 Zyklen unter Standard-Bedingungen.

2.2.22. Herstellung kompetenter Zellen (DH5 α)

250 ml SOB-Flüssigmedium wurden mit 5 ml einer über Nacht bei 37 °C angezogenen Vorkultur angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,48-0,6 weiter inkubiert. Daraufhin wurde die Kultur auf 50 ml Reaktionsgefäße verteilt, 10 min bei 4 °C

und 1200 x g pelletiert, der Überstand abgegossen und die Pellets in 15 ml eiskaltem Transformationspuffer I (35 mM K-Acetat, 45 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15 % [v/v] Glycerin) vorsichtig resuspendiert. Anschließend folgte eine Inkubation 1 bis 2 h auf Eis, dann erneutes Abzentrifugieren bei 4 °C und 2000 x g (5 min), Resuspendierung der Pellets in 4 ml Transformationspuffer II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % [v/v] Glycerin, pH 7.0) und abschließend die Aliquotierung à 100 µl in flüssigem Stickstoff. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.23. Transformation von *E. coli* DH5α-Zellen

4 µl Ligationsansatz wurden zu 100 µl kompetenten Zellen pipettiert, der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert, dann folgte ein Hitzeschock von 30 s bei 42 °C im Heizblock. Sofort wurde wieder 5 min auf Eis inkubiert, anschließend steril 600 µl LB-Flüssigmedium zugegeben. Es folgte eine Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C für ca. eine Stunde. Zuletzt wurden 80 µl und 600 µl auf LB-Platten mit Selektionsantibiotikum (siehe A.8.) ausplattiert. Die deutlich unterschiedlichen Ausstreichvolumina gewährleisteten, dass in jedem Fall Einzelkolonien auf einer der Platten zu finden waren.

2.2.24. Herstellung und Transformation von kompetenten *A. tumefaciens* AGL0-Zellen

Die Herstellung und Transformation kompetenter Zellen erfolgte nach (Höfgen und Willmitzer, 1988), wobei die kompetenten Zellen (200 µl Aliquots) freundlicherweise von Angelika Weinel (IPB, Halle) zur Verfügung gestellt wurden.

2.2.25. Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli*

„Midi-Präparation“ (50 ml LB-Flüssigkulturen)

Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C angezogen. Zur Präparation der Plasmid-DNA kam der Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers zum Einsatz.

„Mini-Präparation“ (2 ml LB-Flüssigkulturen)

Über Nacht bei 37 °C angezogene Kulturen wurden mit dem NucleoSpin[®] Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

2.2.26. Plasmid-DNA-Präparation aus *A. tumefaciens*

Über Nacht wurden 2 ml LB-Flüssigkulturen bei 28 °C im Schüttelinkubator angezogen, dann 1 min bei 13500 x g abzentrifugiert, die Pellets in 100 µl Lysispuffer (9 % [w/v] Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 4 % [w/v] Lysozym) durch heftiges vortexen resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lsg. (1 % [v/v] SDS, 0,2 N NaOH), vorsichtigem Mischen durch Invertieren und 30 min Inkubation bei RT, wurden sofort erst 30 µl alkalische Phenol-Lsg. (Phenol / 1 M NaOH [25:1,5]) dazu pipettiert, kurz gemischt und dann sofort 150 µl 3 M Kalium-Acetat pH 4.8 zugegeben und erneut stark gemischt. Darauf folgte ein 5 minütiger Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 14500 x g. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) zugegeben, kurz gemischt und 3 min bei 14500 x g zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 1 Vol. Chloroform zugegeben, stark gemischt und 2 min bei 14500 x g zentrifugiert. Abschließend wurde die obere wässrige Phase wieder in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, zur Fällung der DNA 500 µl Isopropanol zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 14500 x g (4 °C) und Waschen des Pellets mit 1 ml kaltem 70 % (v/v) Ethanol, wurde wie vorher zentrifugiert, anschließend das Pellet getrocknet und schließlich die DNA in 20 µl Wasser gelöst.

2.2.27. Kolonie-PCR zur Identifikation positiver Bakterien-Klone

In PCR-Gefäßen wurden 20 µl eines Standard-PCR-Mastermixes (laut Hersteller-Angaben) vorgelegt. Einzelne Kolonien wurden mit sterilem Zahnstocher gepickt, erst auf eine neue Masterplate und dann in ein PCR-Gefäß übertragen. Die PCR-Bedingungen waren: erst 2 min bei 94 °C Zellaufschluß, dann 40 Zyklen bestehend aus erst 10 s bei 94 °C Denaturierung, 30 s Anlagerungs-Temperatur, 1 min/kb bei 72 °C Elongation, abschließend 7 min bei 72 °C Elongation. Die Auswertung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.28. Automatische DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung selektierter Klone wurde von der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt. Die Vorbereitung der Plasmid-DNA erfolgte entsprechend den Vorgaben des Angebotes „Value Read“.

2.2.29. Isolierung von gesamt-RNA aus Kartoffelblättern

Die Isolierung von gesamt-RNA erfolgte mit der Trizol-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987).

2.2.30. Northern-Blot-Analyse

Die Northern-Blot-Analyse erfolgte entsprechend (Geerts *et al.*, 1994; Lehrach *et al.*, 1977).

2.2.31. Isolierung von genomischer DNA aus Kartoffelblättern

Ca. 200 mg gemörsertes Blattmaterial wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß gefüllt, 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1,5 % (v/v) SDS) zugegeben, durch Schwenken gemischt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 300 µl 5 M K-Acetat-Lsg. dazu pipettiert, 10 min im Eisbad inkubiert, dann 10 min bei 4 °C und 19000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamyl-alkohol-Gemisch (25:24:1) zugegeben. Nach 15-60 min Inkubation auf einem Schwenker wurde 5 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 800 µl Isopropanol zugegeben und nach vorsichtigem Mischen 10 min bei RT inkubiert. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 19000 x g. Nach Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol, wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt, das Pellet luftgetrocknet und schließlich in 20 µl Wasser gelöst.

2.2.32. Southern-Blot-Analyse

Die Southern-Blot-Analyse erfolgte entsprechend (Schmidt *et al.*, 1999).

2.2.33. Western-Blot

Für Western-Blots wurden Standardmethoden angewendet (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.34. Salicylsäure-Bestimmung

Die Probenaufarbeitung geschah entsprechend (Verberne *et al.*, 2002). Die Probenauftrennung erfolgte mittels HPLC auf einer Phenomenex Säule (Typ Luna 3µ C₁₈(2) 150 x 4,60 mm i.d.; 3 µm). Der Eluent bestand aus 60 % saurem Wasser (pH 2.8, Essigsäure) und 40 % Methanol. Die Flussrate betrug 0,7 ml / min. Jeweils 20 µl Extrakt wurden injiziert.

Die Detektion der Salicylsäure erfolgte mit einem Jasco FP-920 Spectrofluorometer bei einer Excitationswellenlänge von 300 nm und einer Emissionswellenlänge von 410 nm.

2.2.35. Jasmonsäure-Bestimmung

Die Bestimmung erfolgte entsprechend (Göbel *et al.*, 2002).

2.2.36. Statistische Signifikanzberechnung der Unterschiedlichkeit von Messwerten

Die Berechnungen erfolgten im Internet unter den Adressen:

<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html> (ANOVA)

<http://graphpad.com/quickcalcs/index.cfm> (student's T-Test)

Die Durchführung geschah entsprechend den dortigen Angaben.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der *StLOX1*- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen

Zu Beginn dieser Arbeit standen Pflanzen zur Verfügung, deren Pathogen-induzierbare 9-Lipoxygenase *StLOX1* (*StLOX1:St:7*) bzw. 9-Divinylether-Synthase *St9DES* in ihrer Transkriptakkumulation mittels RNA-Interferenz reduziert sind. Die biochemische Charakterisierung der *StLOX1*-RNAi-Pflanzen wurde von Frau Dr. Göbel durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass in den RNAi-Pflanzen nach Pathogen-Infektion enzymatisch gebildete 9-Oxylipine im Vergleich zu den Kontrollpflanzen bis zu 12-fach reduziert vorliegen. Gleichzeitig traten nicht-enzymatisch gebildete 9-Oxylipine und Produkte des 13LOX-Weges in deutlich höheren Mengen als in den Kontrollen auf (Göbel *et al.*, 2003). Die *StLOX1*-RNAi-Pflanzen wurden auch in Infektionsexperimenten mit *P. infestans* verwendet. Der biochemische Phänotyp korreliert aber nicht mit einer veränderten Resistenz bezogen auf die Pathogenbiomasse. Das gleiche gilt für die *St9DES*-RNAi-Pflanzen (Eschen-Lippold *et al.*, 2007, 2004).

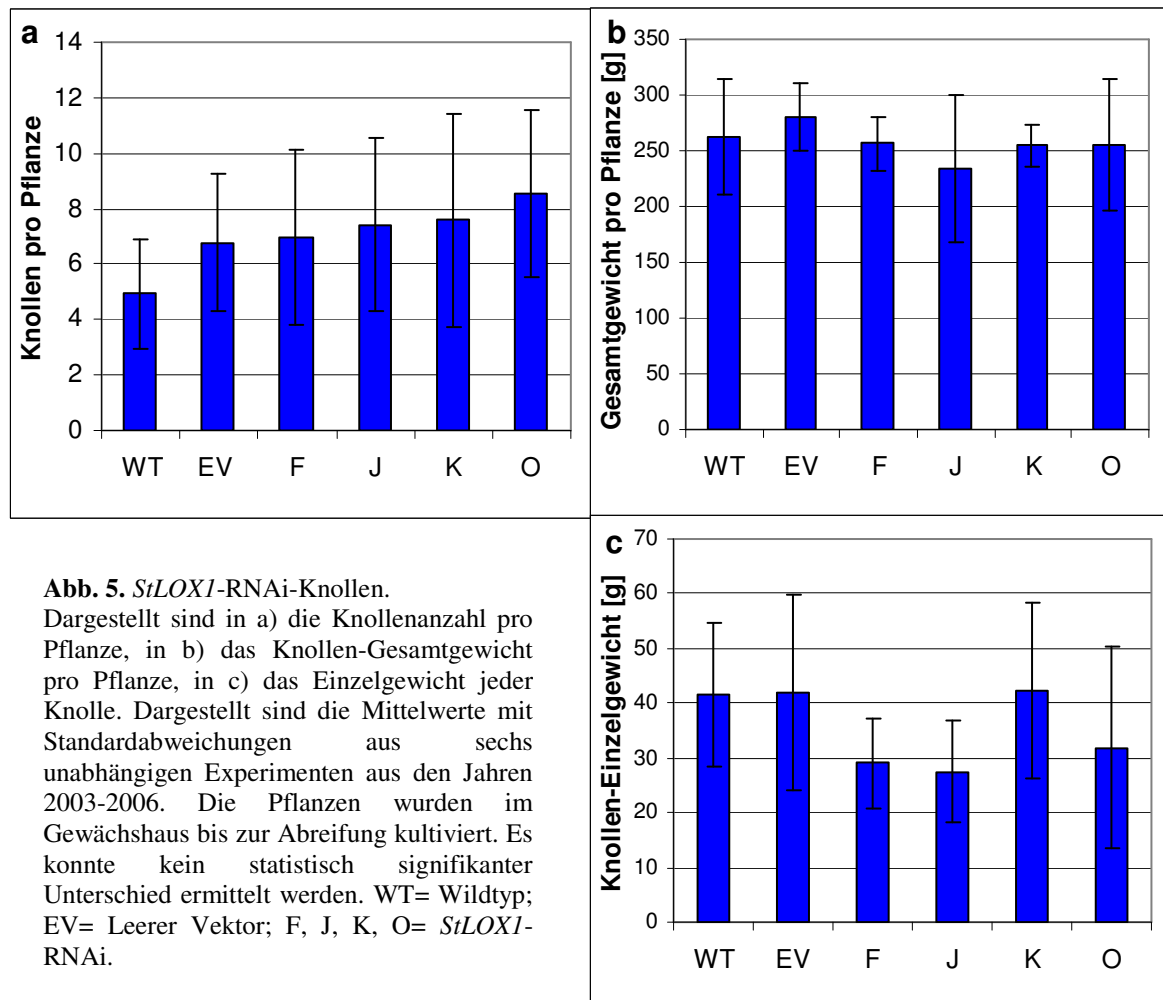
In dieser Arbeit sollte die Rolle des *StLOX1*-Weges in Kartoffel für die Knollenentwicklung, sowie unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die funktionelle Analyse von Kandidatengen aus bereits durchgeführten Microarray-Experimenten mit den *StLOX1*-RNAi-Pflanzen.

3.1.1. Untersuchungen zur Knollenbildung

(Kolomiets *et al.*, 2001) zeigten, dass das *Silencing* der Knollen- und Stolon-exprimierten 9-Lipoxygenase *POTLX-1* (*LOX1:St:8*; AAB67858) zu Defekten in der Knollenbildung führt. So wiesen Knollen von *POTLX-1-antisense* Pflanzen geringere Gewichte und Deformationen auf.

In den *StLOX1*-RNAi-Knollen ist nach Pathogen-Behandlung keine *StLOX1*-Expression mittels Northern-Blot nachweisbar (Eschen-Lippold, 2004). In den RNAi-Pflanzen sollte im Vergleich zu Kontrollpflanzen ein möglicher Einfluss auf die Knollenbildung untersucht werden. Dafür wurden im Gewächshaus bis zur Knollenernte kultivierte Pflanzen in Bezug auf Knollenanzahl, Gesamtgewicht und Einzelgewicht mit Kontrollpflanzen verglichen. Beginnend im Sommer 2003 wurden insgesamt 6 unabhängige Experimente durchgeführt. In Abb. 5 sind die bonitierten Parameter dargestellt. Dabei zeigte

sich, dass keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und *StLOX1*-RNAi-Pflanzen in Bezug auf die Knollenmorphologie vorliegen. Die in (Kolomiets *et al.*, 2001) beschriebenen Unterschiede scheinen also spezifische *POTLX-1-antisense*-Effekte zu sein und kein allgemeiner Effekt des *Silencing* eines 9LOX-Weges in Knollen.



3.1.2. Mikroskopische Untersuchungen nach *P. Infestans*-Infektion

Ergebnisse aus anderen Pathosystemen implizieren verschiedene Funktionen von 9-Lipoxygenasen in der Interaktion mit Pathogenen (vgl. 1.2). Deshalb sollte in Kartoffel untersucht werden, wie sich das *Silencing* des 9LOX-Weges auf die Infektion mit *P. infestans* auswirkt. Dazu wurden *StLOX1*- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen mit *P. infestans* inokuliert und der Infektionsverlauf mikroskopisch untersucht. Dieser Ansatz dient dazu, mögliche Unterschiede, die mittels Realtime-PCR-basierter *P. infestans* Biomasse-Bestimmung nicht herauszustellen sind (Eschen-Lippold *et al.*, 2007, 2004), sichtbar zu machen. Makroskopische Untersuchungen nach *Pseudomonas*-

Infiltration von *StLOXI*-RNAi- und Kontrollpflanzen hatten keinen Unterschied in der Ausprägung des hypersensitiven Zelltodes ergeben (Göbel *et al.*, 2003). Um nun eine mikroskopische Untersuchung nach *P. infestans*-Infektion anzuschließen, wurden Pflanzen in Sterilkultur inokuliert, zu verschiedenen Zeitpunkten Blätter geerntet und Trypanblau-, sowie Anilinblau-Färbungen durchgeführt. Mit Trypanblau werden tote Pflanzenzellen (Keogh *et al.*, 1980) und die *P. infestans*-Strukturen angefärbt, der Verlauf der Infektion ist also direkt auf Pflanzen- und Oomyceten-Seite unter dem Lichtmikroskop sichtbar. Mit Anilinblau wird die von der Pflanze als Reaktion auf das Eindringen des Oomyceten gebildete Callose gefärbt und unter UV-Licht sichtbar (Currier und Strugger, 1956).

In Abb. 6 ist ein repräsentativer früher Infektionsverlauf nach Inokulation mit *P. infestans* exemplarisch in Kontrollpflanzen, die mit einem Leeren Vektor-Konstrukt transformiert wurden, dargestellt.

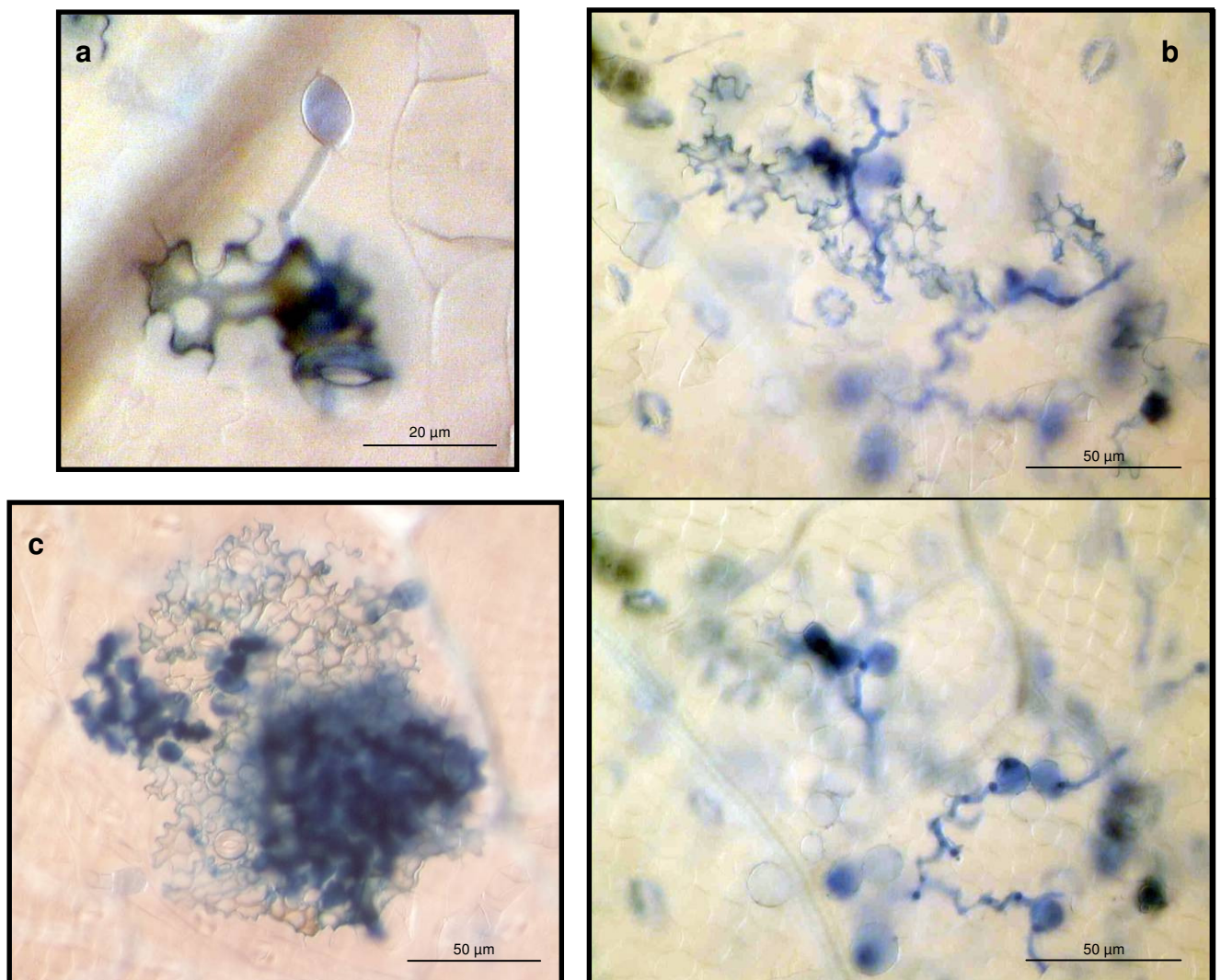


Abb. 6. Trypanblau-Färbung von Kontroll-Pflanzen nach *P. infestans*-Infektion zu frühen Zeitpunkten. Gezeigt ist in a) ein direkt gekeimtes Sporangium mit erfolgter Epidermiszellen-Infektion (2 dpi), in b) der Übergang der Infektion von der Epidermis (oben) ins Mesophyll (unten) in zwei fokussierten Ebenen eines Bildausschnittes (2 dpi) und in c) eine manifestierte Infektion im Mesophyll (3 dpi).

Abb. 7 zeigt einen Vergleich der *StLOX1*-RNAi-, *St9DES*-RNAi- und Kontrollpflanzen drei Tage nach Inokulation. Es fanden sich starke Unterschiede innerhalb einer Linie bezogen auf die Zelltod-Ausprägung. So traten einerseits Bereiche mit wenigen großen deutlich begrenzten Ansammlungen toter Zellen auf (s. Abb. 7: WT, F, J, K), andererseits auch Bereiche mit vielen kleinen Ansammlungen toter Zellen (s. Abb. 7: EV, V1, V2).

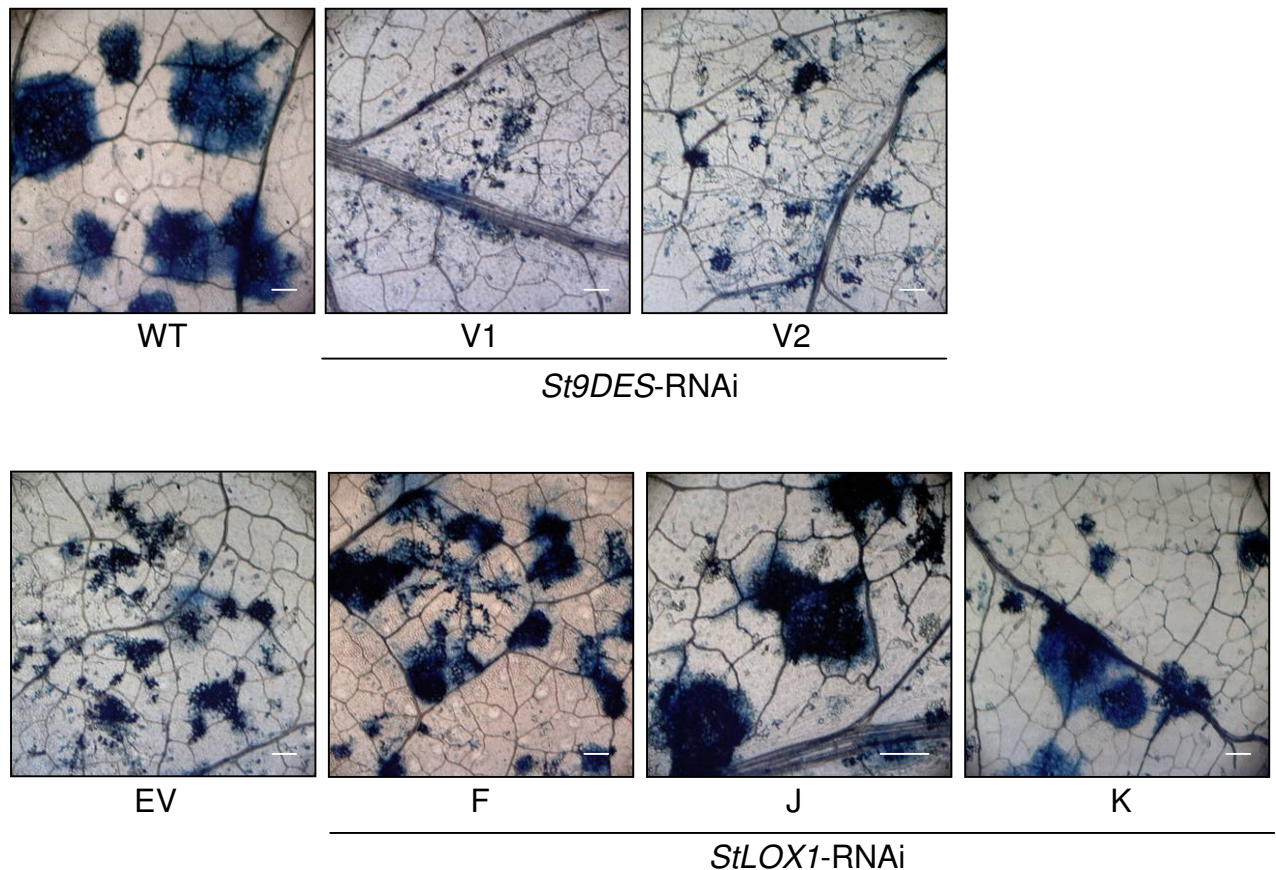


Abb. 7. Trypanblau-Färbung von *StLOX1*- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen nach *P. infestans*-Infektion
Zwei Tage nach *P. infestans*-Inokulation ($10 \mu\text{l}$ Tropfen à $1 \cdot 10^5$ Sporen / ml) von Pflanzen aus Sterilkultur wurden Blätter geerntet und einer Trypanblau-Färbung unterzogen. Tote Pflanzenzellen und Strukturen des Oomyceten sind blau gefärbt. Dargestellt sind Ausschnitte aus infiziertem Gewebe im Bereich der Inokulationsstelle. Es konnte kein Unterschied zwischen den Linien festgestellt werden, da die Ausprägung der Infektion an den einzelnen Inokulationsstellen sehr variabel war. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; V1, V2= *St9DES*-RNAi; F, J, K= *StLOX1*-RNAi. Balken entsprechen $100 \mu\text{m}$.

In Abb. 8 ist vergleichend eine Übersicht über die Callosebildung in den *StLOX1*-RNAi- und Kontrollpflanzen dargestellt. Diese erfolgte in den einzelnen Linien einheitlich, signifikante Unterschiede waren nicht festzustellen.

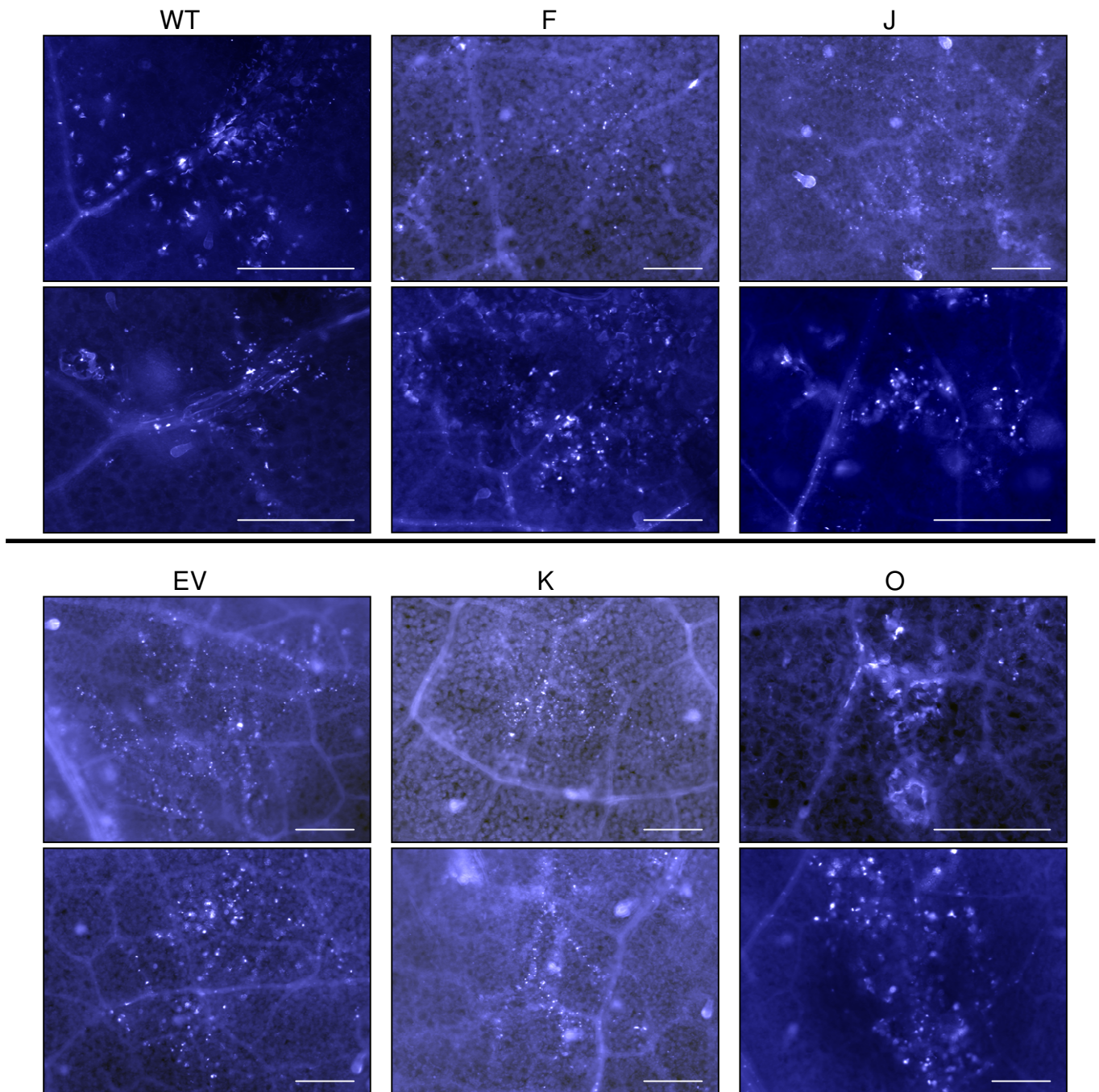


Abb. 8. Anilinblau-Färbung von *StLOX1*-RNAi-Pflanzen nach *P. infestans*-Infektion

Drei Tage nach *P. infestans*-Inokulation ($10 \mu\text{l}$ Tropfen à $2,5 \cdot 10^4$ Sporen / ml) von Pflanzen aus Sterilkultur wurden Blätter geerntet und einer Anilinblau-Färbung unterzogen. Von den Pflanzen gebildete Callose ist unter UV-Licht hell leuchtend sichtbar. Dargestellt sind Ausschnitte aus infiziertem Gewebe im Bereich der Inokulationsstelle, deutlich kann das Hyphenwachstum anhand der Calloseplugs verfolgt werden. Es konnte kein Unterschied in der Intensität, bzw. der Gesamtakkumulation von Callose zwischen den Linien festgestellt werden. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; F, J, K, O= *StLOX1*-RNAi. Balken entsprechen $100 \mu\text{m}$.

Mit beiden Färbemethoden war eine hohe Variabilität der Infektion festzustellen. Signifikante Unterschiede ließen sich also nicht feststellen, so dass gesagt werden kann, dass die beiden Pathogen-induzierten Enzyme *StLOX1* und *St9DES* in Kartoffel keinen direkten Einfluss auf das Wachstum von *P. infestans* (Eschen-Lippold *et al.*, 2007, 2004), bzw. die Resistenzantwort von Kartoffel haben.

3.1.3. Infektionsexperimente mit anderen bodenbürtigen Pilzen

Neben den Experimenten mit *P. infestans* sollte untersucht werden, ob die *StLOX1*-RNAi-Pflanzen bei der Interaktion mit anderen Pathogenen einen veränderten Infektionsphänotyp zeigen, das Herabsetzen des Pathogen-induzierten 9LOX-Weges also in anderen Pathosystemen eine spezifische Wirkung zeigt. Dazu wurden die folgenden Pathogene in Infektions-Experimenten verwendet: *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes (der Erreger der *Colletotrichum*-Welke) (Lees und Hilton, 2003), *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav (der Erreger der Brennfleckenkrankheit an Bohnen) (Perfect *et al.*, 1999) und *Verticillium dahliae* Kleb. (der Erreger der *Verticillium*-Welke und Haupterreger des *potato early dying*-Komplexes) (Bhat und Subbarao, 1999; Rowe *et al.*, 1987).

3.1.4. Inokulation mit *Colletotrichum coccodes*

Der Pilz *Colletotrichum coccodes* erzeugt an infizierten Kartoffelpflanzen neben Welke-Erscheinungen auch silbrige, matte Flecken auf den Knollen, in denen sich die Mikrosklerotien entwickeln, die als schwarze Punkte (*black dot disease*) (Andrivon *et al.*, 1998) sichtbar werden. Dieses Pathogen wurde in Inokulationsexperimenten mit *StLOX1*-RNAi-Pflanzen verwendet, um eine Rolle der Pathogen-induzierten 9LOX in dieser Interaktion zu überprüfen. Bei den inokulierten Pflanzen konnten visuell keine Krankheits-Symptome festgestellt werden. Allerdings waren inokulierte Pflanzen signifikant höher als nicht inokulierte Pflanzen. Dabei spielte der Pflanzen-Genotyp keine Rolle (Abb. 9). Auf das Wurzelwachstum hatte der Pilz jedoch keinen Effekt.

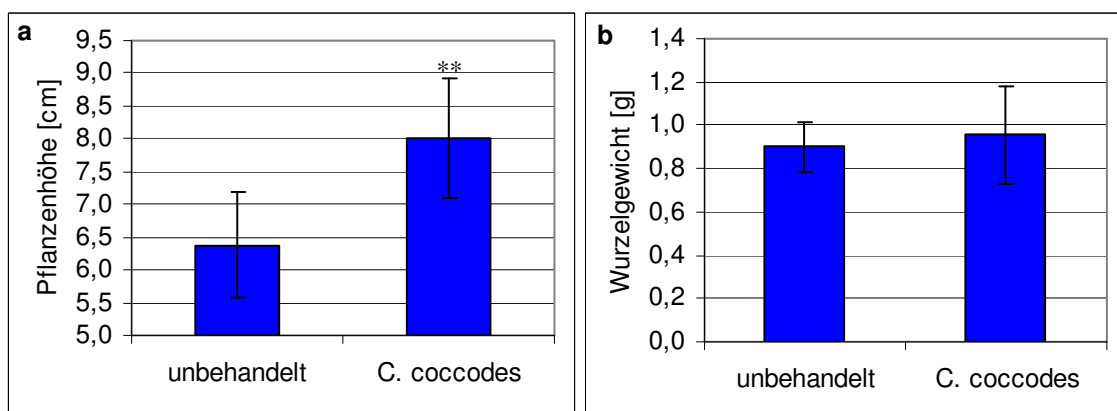
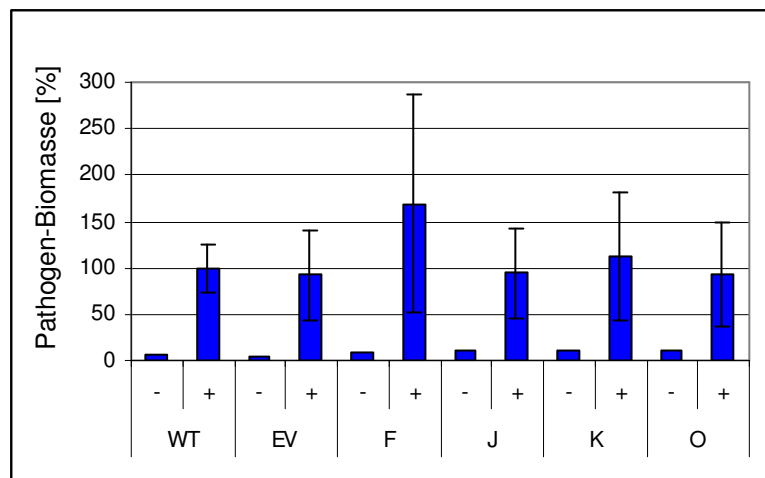


Abb. 9. Pflanzenhöhe und Wurzelgewicht von *C. coccodes*-inokulierten *StLOX1*-RNAi-Pflanzen (40 dpi). Pflanzen wurden in Perlit gepflanzt und einen Tag später mit einer *C. coccodes*-Sporenlösung ($6 \cdot 10^6$ Sp./ml, 2 ml) gegossen. *C. coccodes*-behandelte Pflanzen zeigten eine signifikante Förderung der Wuchshöhe (a), unabhängig vom Pflanzen-Genotyp. Das Wurzelgewicht der einzelnen Linien unterschied sich nicht von einander und korrelierte auch nicht mit der Inokulation von *C. coccodes* (b). Pflanzen siehe Abb. 10. (** $p < 0,01$).

Aus den Wurzeln wurde genomische DNA isoliert und diese einer Southern-Analyse zum Nachweis des Pathogens (bzw. der Quantifizierung des Wachstums) unterzogen, wobei der Blot mit einer *C. coccodes*-spezifischen Sonde aus der *internal transcribed spacer*-Region (*CcITS1/2*) hybridisiert wurde. Das verwendete Fragment wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert (s. A.7). Anhand der Bandenstärke konnte dann die Infektion, nach Abgleich gegen eine Kartoffel-*rDNA*-Hybridisierung, quantifiziert werden (Abb. 10). Dabei war kein signifikanter Unterschied zwischen den Linien bezogen auf die Pathogen-Biomasse detektierbar.

Abb. 10. *C. coccodes*-Biomasse-Bestimmung in *StLOXI*-RNAi-Pflanzen.

Behandlung s. Abb. 9. Wurzel-DNA wurde mit HindIII und XbaI verdaut und der Blot mit einem *CcITS1/2*-Fragment, sowie einer Kartoffel-*rDNA* Sonde hybridisiert. Das Pathogenwachstum wurde über den Abgleich der korrespondierenden Bandenintensitäten jeder Probe errechnet. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; F, J, K, O= *StLOXI*-RNAi.

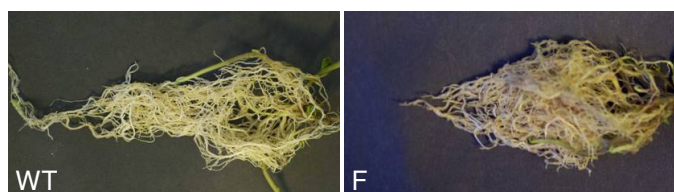


3.1.5. Inokulation mit *Colletotrichum lindemuthianum*

Colletotrichum lindemuthianum ist in der Literatur nur als Bohnen-Pathogen beschrieben (Redman *et al.*, 2001; Perfect *et al.*, 1999). Es ist also davon auszugehen, dass Kartoffel keine Wirtspflanze für diesen Pilz darstellt. Trotzdem sollte untersucht werden, ob eine veränderte Resistenz in den *StLOXI*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen vorliegt. Dazu wurden Pflanzen im Wurzelbereich inokuliert. Es konnten keine Krankheitssymptome an oberirdischen Organen (Daten nicht gezeigt) und den Wurzeln festgestellt werden konnten (Abb. 11). Zusätzlich wurden das Wurzelgewicht und die Wuchshöhe bestimmt. Dabei zeigte sich ein wuchsfördernder Einfluß des Pilzes auf die inokulierten Pflanzen, unabhängig vom Genotyp (Abb. 12).

Abb. 11. Wurzelballen nach *C. lindemuthianum*-Inokulation.

Pflanzen wurden in Perlit gepflanzt, einen Tag später im Wurzelbereich inokuliert ($3,4 \cdot 10^4$ Sp./ml, 450 μ l) und 32 dpi geerntet. Krankheitssymptome waren nicht zu erkennen. Exemplarisch sind Wurzelballen vom Wildtyp und der *StLOXI*-RNAi-Linie F gezeigt. Die unterschiedliche Färbung beruht auf abweichender Belichtung.



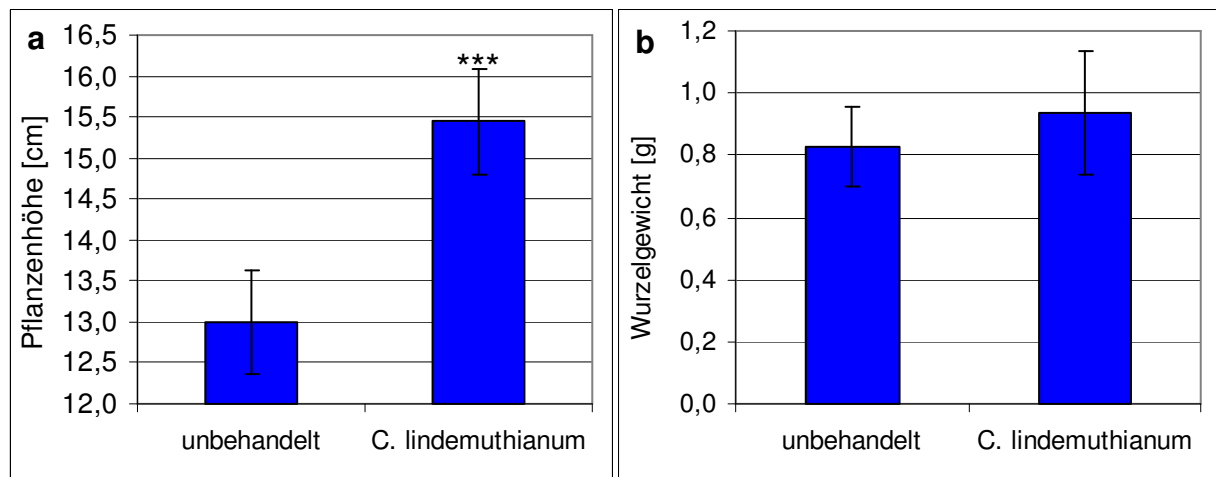


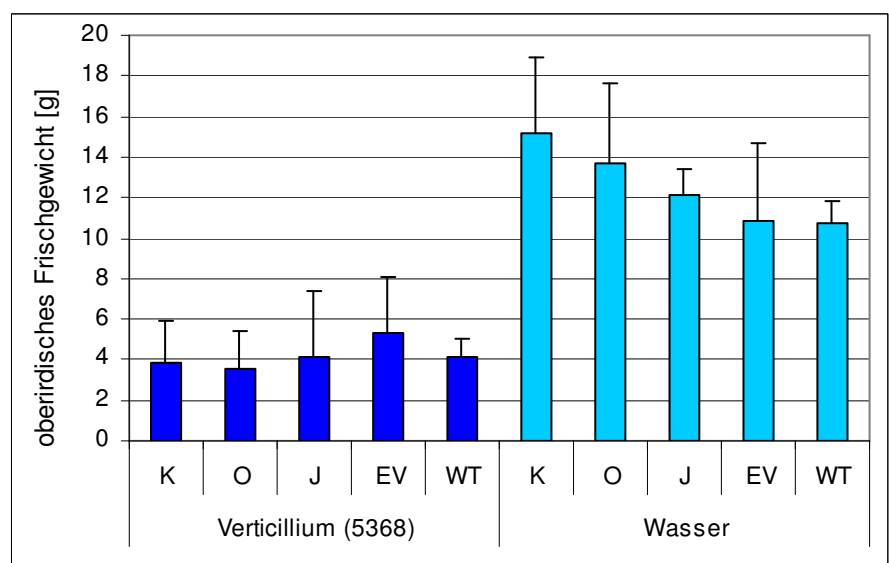
Abb. 12. Pflanzenhöhe und Wurzelgewicht von *C. lindemuthianum*-inokulierten *StLOXI*-RNAi-Pflanzen (32 dpi). Behandlung s. Abb. 11. *C. lindemuthianum*-behandelte Pflanzen zeigten eine signifikante Förderung des Wachstums unabhängig vom Pflanzen-Genotyp (a). Das Wurzelgewicht der einzelnen Linien war nicht verändert und korrelierte auch nicht mit der Pathogen-Inokulation (b). Pflanzen siehe Abb. 10. (***) $p = 0,0001$.

3.1.6. Inokulation mit *Verticillium dahliae*

Die Infektion der *StLOXI*-RNAi-Pflanzen mit *Verticillium dahliae* wurde freundlicherweise in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Bart Thomma (Wageningen University) in dessen Arbeitsgruppe durchgeführt. Als Maß der Infektion diente das Frischgewicht der oberirdischen Organe. Auch mit diesem Pathogen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen *StLOXI*-RNAi- und Kontrollpflanzen festgestellt werden (Abb. 13).

Abb. 13. Infektion der *StLOXI*-RNAi-Pflanzen mit *Verticillium dahliae* (5368).

23 Tage nach Inokulation wurde das Frischgewicht der oberirdischen Organe bestimmt. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; K, O, J= *StLOXI*-RNAi; Wasser= unbehandelte Kontrollen. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

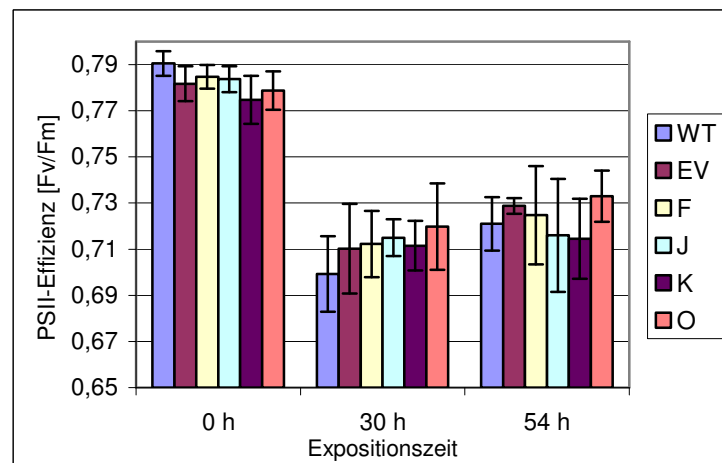


3.1.7. Abiotischer Stress

3.1.7.1. Starklichtbehandlung

Um die Reaktion der *StLOXI*-RNAi-Pflanzen auch auf oxidativen abiotischen Stress zu untersuchen, wurden Experimente mit Starklicht durchgeführt, das zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt und damit die Zerstörung des Photosystem II-Reaktionszentrums, sowie Lipidperoxidation induziert (Ledford und Niyogi, 2005; Aro *et al.*, 1993). Nach 3-wöchiger Anzucht der Pflanzen unter Normalbedingungen (ca. 150 μE), wurden die Experimente in einem Anzuchtschrank mit Dauerlicht von ca. 950 μE , ohne Tag- und Nachtrhythmus, über eine Zeit von 54 Stunden, durchgeführt. Als Effekt wurde die maximale Effizienz des Photosystems II (F_v/F_m) nach kurzzeitiger lokaler Dunkeladaptation gemessen, die als Indikator für die oxidative Schädigung des Photosynthese-Apparates dient (Powles, 1984). Liegt eine Schädigung vor, sinkt die PSII-Effizienz. Die Versuche wurden zusammen mit Olaf Barth (AG Humbeck, Uni Halle) durchgeführt. Wie aus Abb. 14 ersichtlich, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen *StLOXI*-RNAi- und Kontrollpflanzen festgestellt werden.

Abb. 14. Starklichtbehandlung der *StLOXI*-RNAi-Pflanzen. Nach Anzucht unter Normalbedingungen wurden die Pflanzen in einem Anzuchtschrank 54 h Dauer-Starklicht (ca. 950 μM) ausgesetzt. Gemessen wurde die Effizienz des Photosystems II [F_v/F_m]. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten. F_v = variable Fluoreszenz; F_m = max. Fluoreszenz nach Dunkeladaptation; WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; F, J, K, O= *StLOXI*-RNAi.

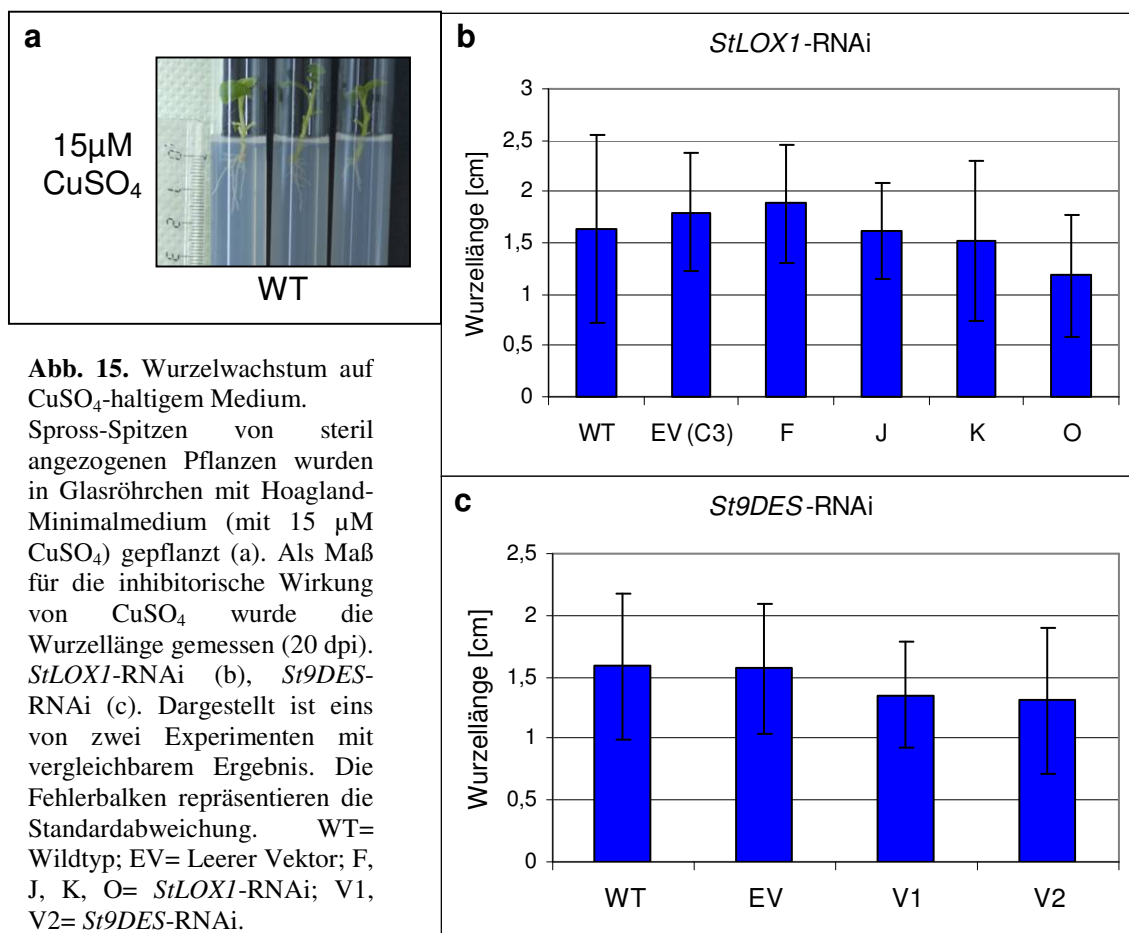


Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Blattmaterial für Northern-Analysen geerntet. Hybridisierungen mit Sonden von ROS-detoxifizierenden Enzymen, wie einer Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (Cu/Zn-SOD; TIGR: TC128134), einer Fe-SOD (TIGR: TC127528) und einer Catalase (Accession: Z37106), zeigten keinen Unterschied zwischen *StLOXI*-RNAi- und Kontrollpflanzen, sowie keine Induktion der Expression unter den gegebenen Bedingungen (Daten nicht gezeigt). Aus diesen physiologischen und molekularen Daten lässt

sich schlussfolgern, dass für die Reaktion von Kartoffelpflanzen auf Starklichtstress der *StLOX1*-Weg keine Bedeutung hat.

3.1.7.2. Schwermetallbehandlung (CuSO_4)

Eine weitere Möglichkeit, oxidativen Stress in Pflanzen hervorzurufen, ist die Behandlung mit Schwermetallen (Schützendübel und Polle, 2002). Dazu wurden Pflanzen in steriler Meristemkultur auf CuSO_4 -haltigem Medium kultiviert. Über eine Verdünnungsreihe wurde vorher die optimale Konzentration ermittelt ($15 \mu\text{M}$), die das Wurzelwachstum von Kontrollpflanzen inhibiert, aber nicht komplett unterdrückt (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich dazu wurden die *StLOX1*- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen in den folgenden Experimenten betrachtet (Abb. 15). Auch hier zeigte sich kein veränderter Phänotyp der *StLOX1*-RNAi- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen.



3.1.7.3. Wasserstress-Experimente

Um die Wirkung von extremer Dürre, sowie Überflutung, und den damit verbundenen oxidativen Stress (Blokchina *et al.*, 2003) auf die *StLOX1*-RNAi-Pflanzen zu überprüfen, wurden Experimente in einer Phytokammer durchgeführt. Beide Versuchsansätze lieferten aber keine reproduzierbaren Daten, so dass hier keine Aussage über eine Rolle der *StLOX1* getroffen werden kann.

3.2. TIGR-Microarrays (ftp://ftp.tigr.org/pub/data/s_tuberosum/SGED/073_Rosahl)

Im Rahmen des Angebots des *NSF potato genome project*-Konsortiums wurden Microarray-Analysen mit den 10K-Arrays des TIGR-Instituts (The Institute for Genomic Research) durchgeführt. Verwendet wurden Proben von Wildtyp- und *StLOX1*-RNAi-Pflanzen nach *Psm*-Infiltration. Dabei sollten einerseits Gene identifiziert werden, die in den RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp differentiell reguliert sind, andererseits solche, die nach Pathogen-Behandlung stark induziert werden. Die Experimente wurden von Frau Angelika Weinel (IPB Halle) durchgeführt. Die Rohdaten der *StLOX1*-RNAi- und Wildtyp-Pflanzen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Steffen Neumann (IPB Halle) annotiert und statistisch ausgewertet. Die Venn-Diagramme in Abb. 16 zeigen eine Übersicht über Gruppen statistisch signifikant differentiell regulierter Gene ($p < 0,05$) in Wildtyp- und *StLOX1*-RNAi-Pflanzen acht Stunden nach *Psm*-Infiltration.

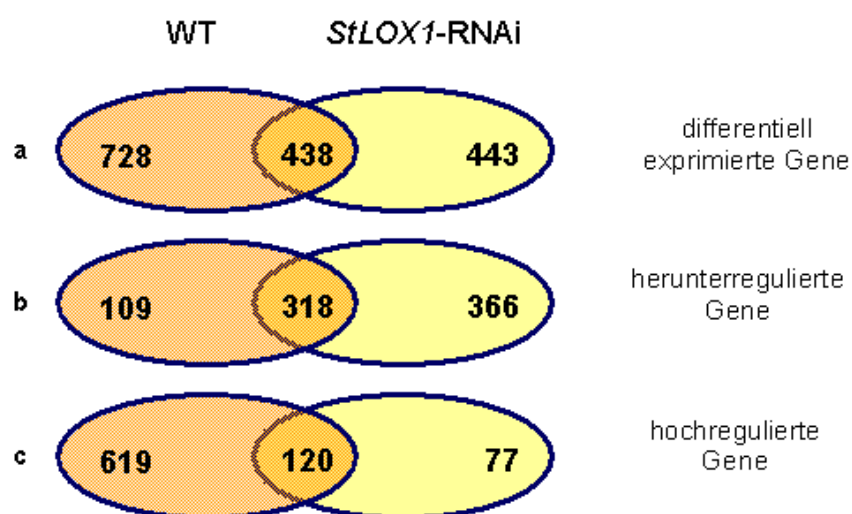


Abb. 16. Differentiell regulierte Gene in Wildtyp- und *StLOX1*-RNAi-Pflanzen. Dargestellt sind Gruppen von Genen die statistisch signifikant differentiell reguliert sind bezogen auf $MgCl_2$ -infiltrierte Kontrollen ($p < 0,05$). (a) zeigt die Anzahl allgemein differentiell regulierter Gene, (b) herunterregulierte Gene und (c) hochregulierte Gene. Den Daten liegen drei biologische Replikate zugrunde.

Aus den differentiell regulierten Genen wurden potentielle Kandidaten ausgewählt, deren Expression auf Northern-Ebene bestätigt werden sollte. In Tab. 1 sind die ausgewählten Kandidaten mit zugehörigen TIGR-Expressionsdaten aufgelistet.

		Expressionslevel (x-fach *)			
		8 hpi		24 hpi	
		RNAi	WT	RNAi	WT
<i>StDOX</i>	<i>PATHOGEN-INDUCED ALPHA-DIOXYGENASE</i>	5	2	22	13
<i>StLTP</i>	<i>LIPID TRANSFER PROTEIN</i>	0,5	1	2	1
<i>StSCL11</i>	<i>SCARECROW-LIKE TRANSCRIPTION FACTOR 11</i>	9	3	1	2
<i>StCAO</i>	<i>COPPER AMINE OXIDASE</i>	47	6	23	33
<i>StAEC</i>	<i>AUXIN EFFLUX CARRIER</i>	17	8	8,5	9,5
<i>StSYR1</i>	<i>SYNTAXIN-RELATED 1</i>	5	2,5	3	1
<i>StDBP</i>	<i>DNA-BINDING PROTEIN</i>	1	1	4	1,5
<i>StEAR</i>	<i>ENOYL-ACP REDUCTASE PRECURSOR</i>	1	1	1	8
<i>StFAD</i>	<i>OMEGA-6 FATTY ACID DESATURASE</i>	12	5	4	17
<i>StSNAP33</i>	<i>SYNAPTOSOME-ASSOCIATED PROTEIN 33</i>	1,5	1	0,5	1
<i>StTLP</i>	<i>TRANSPORTER-LIKE PROTEIN</i>	3,5	4	2	5,5
<i>StCYP</i>	<i>CYTOCHROME P450</i>	1	1	16	4

Tab. 1. Übersicht einiger differentiell regulierter Gene in Wildtyp- und *StLOX1*-RNAi-Pflanzen nach *Psm*-Infiltration. Zahlenwerte spiegeln die x-fache Induktion der Expression, bezogen auf die Werte der Kontroll-Infiltration ($MgCl_2$;*), wider ($p < 0,05$). RNAi= *StLOX1*-RNAi; WT= Wildtyp.

Für die Hybridisierungen auf Northern-Ebene wurden kurze Gen-Fragmente, basierend auf den von TIGR veröffentlichten ESTs, kloniert (s. A.6 und A.7). Es kam die RNA, die bereits für die Microarrays verwendet wurde, und neue RNA aus drei nachgezogenen Experimenten zum Einsatz. So stand Material von insgesamt 6 unabhängigen Experimenten zur Verfügung. In Abb. 17 sind beispielhaft Hybridisierungen mit RNA aus *Psm*-infiltrierten Blättern (8 hpi) dargestellt.

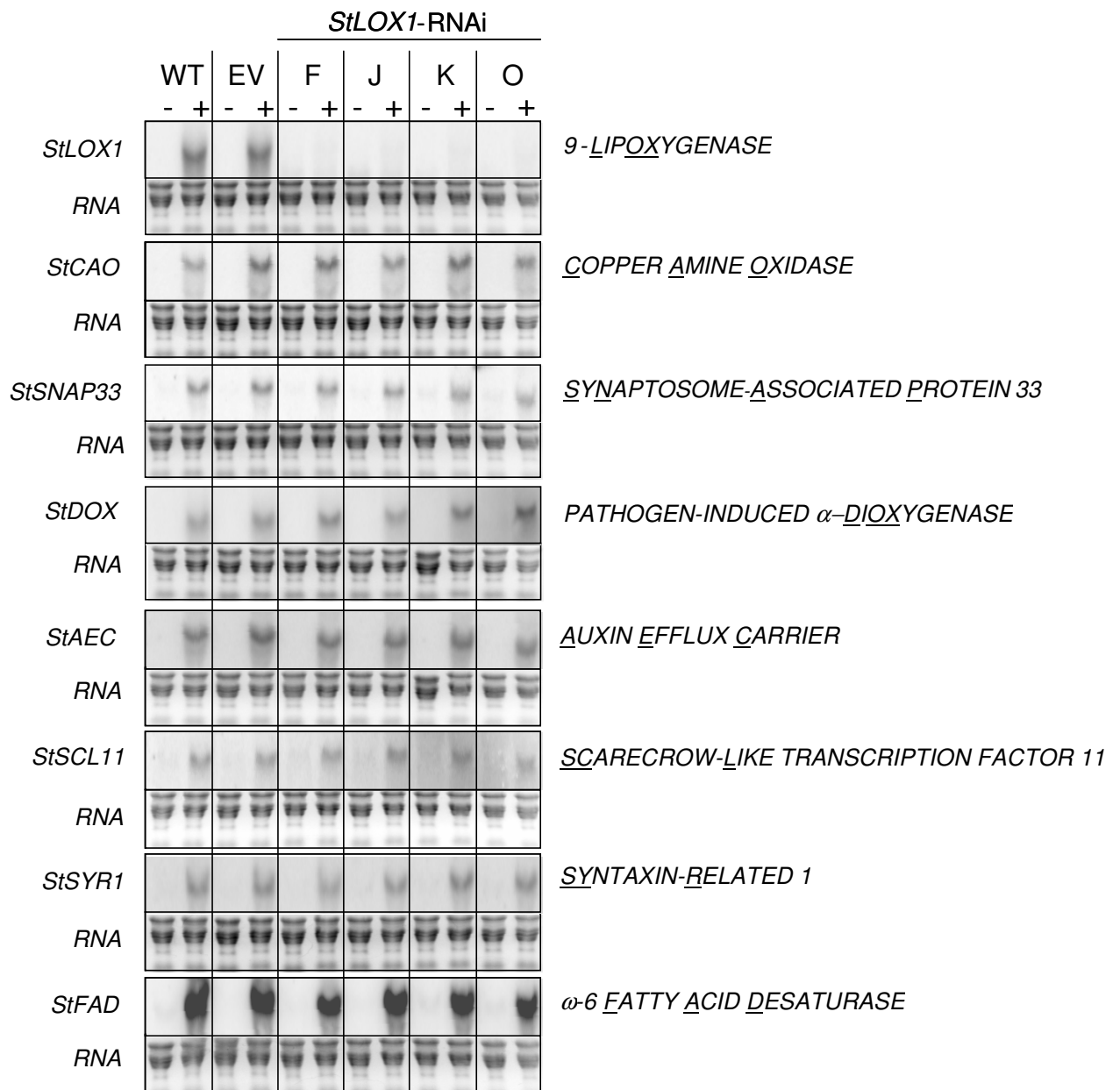


Abb. 17. Transkript-Akkumulation der Kandidatengene acht Stunden nach *Psm*-Infiltration.

Dargestellt ist eins von sechs unabhängigen Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis. Zwischen den einzelnen Linien ist kein Unterschied in der Transkript-Akkumulation zu sehen, lediglich die unterdrückte Expression der *StLOX1* in den *StLOX1*-RNAi-Pflanzen ist deutlich zu erkennen (ganz oben). WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; F, J, K, O= *StLOX1*-RNAi.

Abb. 18 zeigt Hybridisierungen mit RNA aus Pep-13-infiltrierten Blättern zu verschiedenen Zeitpunkten. In keinem Fall konnten die auf Microarray-Ebene ermittelten Unterschiede in der Expression zwischen Wildtyp- und *StLOX1*-RNAi-Pflanzen bestätigt werden. Dennoch zeigten die Kandidaten eine starke Induktion der Expression, die auch nach *P. infestans*-Inokulation nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). So wurden neue Gene in Kartoffel identifiziert, die nach Pathogen-Behandlung aktiviert werden und als Marker der Pathogen-Abwehr Verwendung finden können.

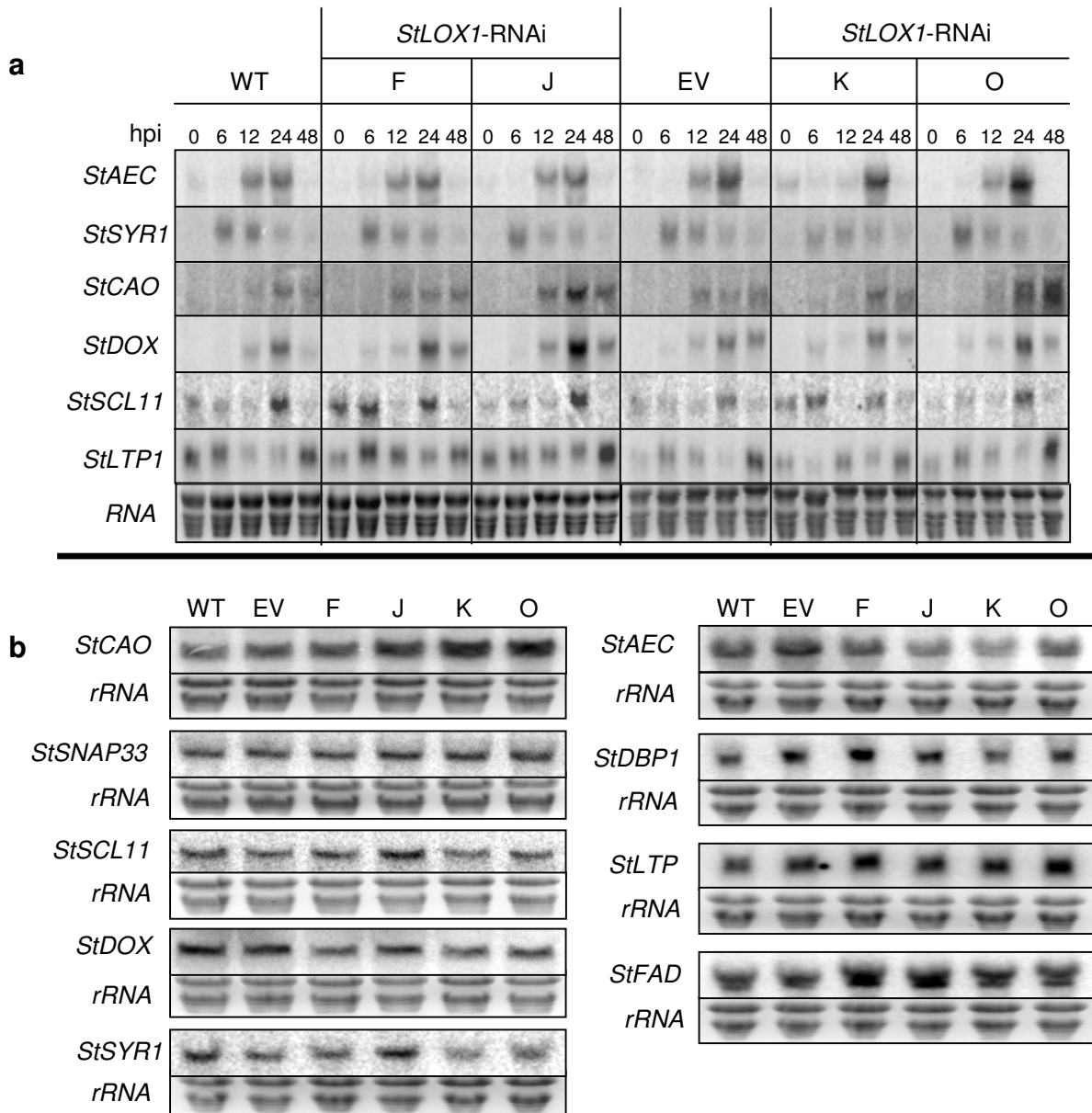


Abb. 18. Expressionsanalyse der Kandidatengene nach Pep-13-Infiltration.

Pflanzen wurden mit 100 μ M Pep-13 infiltriert und zu den angegebenen Zeitpunkten (a) bzw. 24 hpi (b) infiltriertes Blattmaterial geerntet. Fragmente der Kandidatengene wurden als Sonden zur Detektion der Transkript-Akkumulation verwendet. Einige sind beispielhaft hier gezeigt. Zwischen *StLOX1*-RNAi- und Kontrollpflanzen war kein Unterschied im zeitlichen Verlauf und Ausmaß der Transkript-Akkumulation detektierbar. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; F, J, K, O= *StLOX1*-RNAi. Die Experimente wurden zweimal mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt.

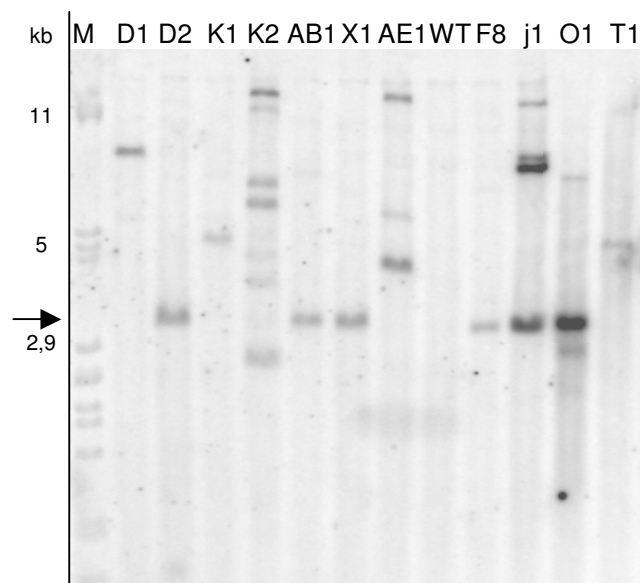
3.3. Charakterisierung von *StAOS3*-RNAi-Pflanzen

Das *StAOS3*-Gen kodiert für eine 9-Allenoxid-Synthase. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung der im 9LOX-vermittelten Schritt gebildeten 9-Hydroperoxide zu Ketolen (s. Abb. 3) (Stumpe *et al.*, 2006). Die Autoren zeigten, dass die *StAOS3* in unterirdischen Organen exprimiert wird (Knollen, treibende Knollenaugen, Wurzeln, Stolone). Im Rahmen dieser Arbeit sollten Kartoffelpflanzen mit reduzierter *StAOS3*-Expression (*StAOS3*-RNAi) hergestellt werden. Zukünftig soll eine biochemische Analyse zeigen, ob die reduzierte Expression der *StAOS3* zu einer erhöhten Substratverfügbarkeit und Umsetzung in den anderen Zweigen des 9LOX-Weges führt.

Das RNAi-Konstrukt (s. A.6) wurde in den *pHELLSGATE8*-Vektor kloniert (Helliwell *et al.*, 2002). Die regenerierten Pflanzen wurden mittels Southern-Analyse auf Integration des RNAi-Konstruktes ins Genom überprüft (Abb. 19).

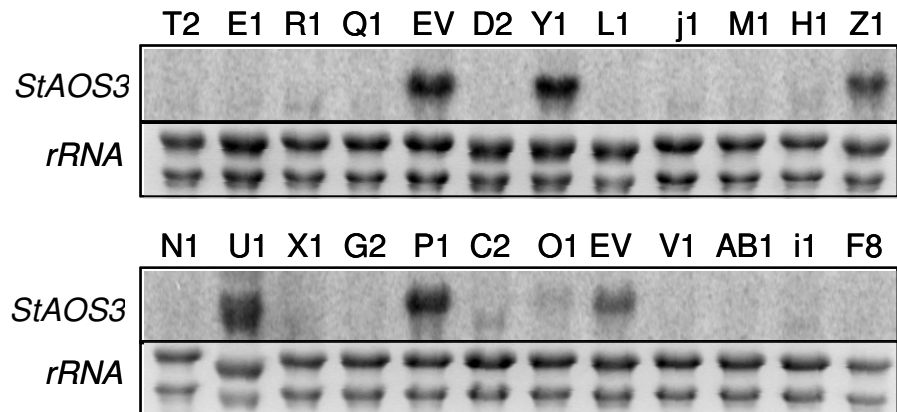
Abb.19. Nachweis der Integration des *StAOS3*-RNAi-Konstruktes ins Pflanzengenom.

Genomische DNA wurde mit *Bsp*TI und *Hind*III verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Bei der Hybridisierung mit einem *nptII*-Fragment wurde eine Bande bei 3185 bp erwartet. Dargestellt ist ein Beispiel-Blot, insgesamt wurden ca. 40 regenerierte Pflanzen überprüft. Positive Linien: D2, AB1, X1, F8, j1, O1; WT= Wildtyp; M= Marker.



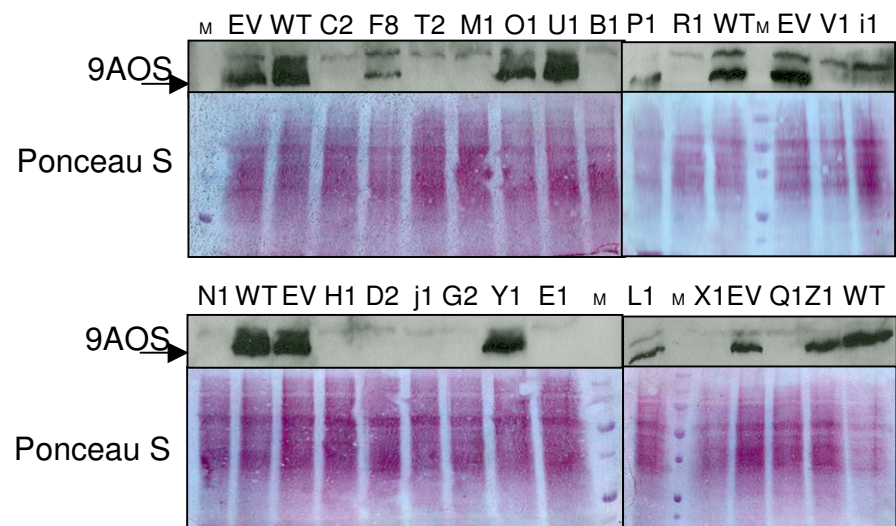
Identifizierte Transformanten wurden in Sterilkultur vermehrt und zusätzlich bis zur Knollenernte in Erde angezogen. Aus den Knollen wurde RNA isoliert und einer Northern-Hybridisierung unterzogen, um zu testen, ob eine RNAi-vermittelte Reduktion der Transkript-Akkumulation vorliegt. In Abb. 20 ist das Ergebnis der Hybridisierung mit dem *StAOS3*-Fragment, das auch für die Klonierung des RNAi-Konstruktes verwendet wurde, abgebildet. Deutlich zeigt sich, dass in den meisten unabhängigen Linien keine Transkripte akkumulieren, lediglich die Linien P1, U1, Y1 und Z1 verhalten sich wie die Kontrollen (EV).

Abb. 20. *StAOS3*-Transkript-Akkumulation in regenerierten Pflanzen. Auf Nylonmembranen übertragene RNA aus unbehandelten Knollen wurde mit einer *StAOS3*-Sonde hybridisiert. EV= Leerer Vektor; andere Linien= potentiell *StAOS3*-RNAi. Details siehe Text.



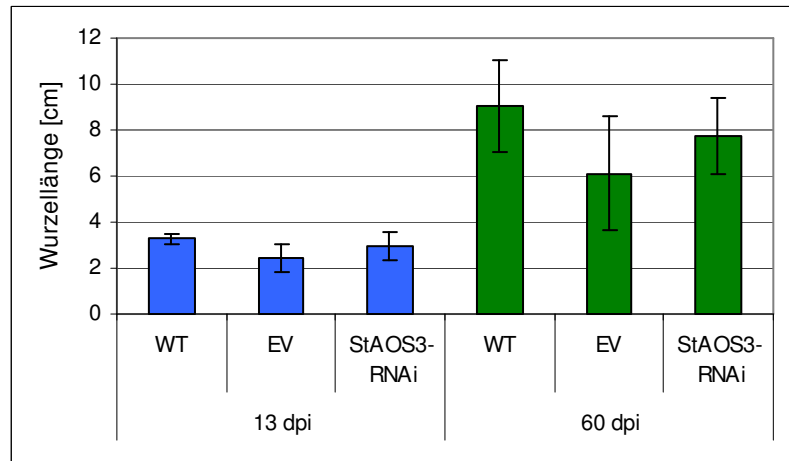
Aus Wurzelproben der *StAOS3*-RNAi-Pflanzen soll zukünftig ein Oxylinprofil erstellt werden. Die dafür nötige Methodik des Ketol-Nachweises wird zur Zeit von Frau Dr. Göbel (AG Feussner, Uni Göttingen) etabliert. Mit Proteinproben aus Wurzeln von Pflanzen, die auf Perlit angezogen wurden, wurde ein Western-Blot zum Nachweis des *StAOS3*-Proteins gemacht. Der *StAOS3*-Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Ivo Feussner (Uni Göttingen) zur Verfügung gestellt. Die auf Northern-Ebene erhaltenen Ergebnisse korrelierten bei den meisten Pflanzen mit den Proteinmengen (Abb. 21). In den Linien F8, L1 und O1 vorhandene Proteinbanden deuteten auf eine Rest-Expression hin, die auf Northern-Ebene nicht nachweisbar war (Abb. 20).

Abb. 21. Expressions-Analyse der *StAOS3*-RNAi-Pflanzen. Für die Westernblots wurde Wurzelmaterial von auf Perlit angezogenen Pflanzen verwendet. Wie auch auf Northern-Ebene ersichtlich, zeigen die Linien P1, U1, Y1, Z1 Protein-Akkumulation. Auch in den Linien F8, L1, O1 ist eine Bande vorhanden, jedoch keine mRNA (Abb. 20). Pfeil= spezifische *StAOS3*-Banden; M= Marker; WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; andere Linien= potentiell RNAi.



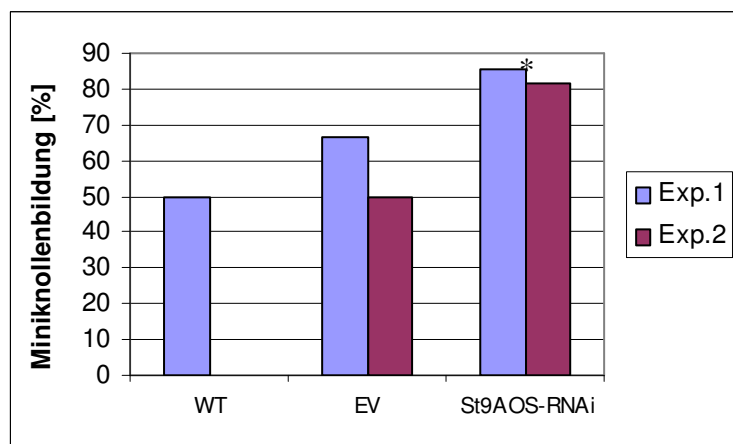
Um zu testen, ob die starke *StAOS3*-Expression in den unterirdischen Organen eine Funktion für das Wurzelwachstum hat, wurde ein Wurzellängen-Test durchgeführt. Dazu wurden die Pflanzen auf Hoagland-Minimalmedium angezogen und das Wurzelwachstum bonitiert (Abb. 22). Bei diesen Experimenten konnte kein Unterschied festgestellt werden. Für das normale Wurzelwachstum scheint die *StAOS3* also keine relevante Funktion zu haben.

Abb. 22. Wurzelwachstum der *StAOS3*-RNAi-Pflanzen auf Hoagland-Minimalmedium. Pflanzen wurden in verschraubbaren Reagenzgläsern mit je 20 ml Hoagland-Festmedium steril angezogen. Nach 13 und 60 Tagen wurden die Wurzellängen gemessen. Dargestellt ist eins von zwei Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; *StAOS3*-RNAi= alle positiven RNAi-Linien aus Abb. 21.



Im nächsten Schritt wurde die Knollenbildung *in vitro* untersucht. Dazu wurden sterile Spross-Explantate mit je einem Nodium auf Knollen-Induktionsmedium gesetzt und die Miniknollenbildung bonitiert (Abb. 23). In beiden Experimenten zeigten die *StAOS3*-RNAi-Pflanzen eine leicht höhere Knollenbildungsrate als die Kontrollen. Allerdings produzierte der Wildtyp im zweiten Experiment überhaupt keine Knollen (s. 4.7).

Abb. 23. Miniknollenbildung der *StAOS3*-RNAi-Pflanzen. Spross-Explantate mit je einem Nodium wurden auf Knollen-Induktionsmedium gesetzt und ca. drei Monate im Dunkeln (18 °C) inkubiert. Dargestellt sind beide durchgeführten Experimente. Die Werte spiegeln die Anzahl Knollen-bildender Explantate pro Linie in Prozent wider. (* $p < 0,05$; bezogen auf die Mittelwerte beider Exp.).



3.4. Die Rolle von *StLOX1* und *St9DES* für die *R*-Gen-vermittelte Resistenz gegen *P. infestans*

3.4.1. Transgene Ansätze

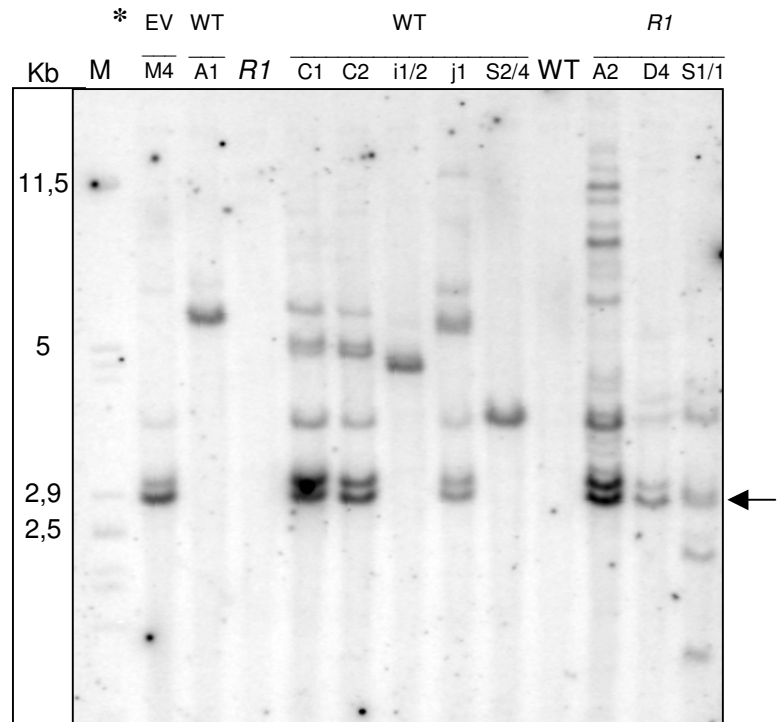
Es sollte untersucht werden, ob die Pathogen-induzierten Enzyme *StLOX1* und *St9DES* für die Resistenzgen (*R*-Gen)-vermittelte Abwehr gegen *P. infestans* in Kartoffel notwendig sind. Diese Sorten-spezifische Form der Resistenz führt zu einer sehr starken Abwehrantwort (vgl. 1.). Erfüllen *StLOX1* und *St9DES* eine Funktion in der Ausprägung dieser Abwehrantwort, sollte ihr *Silencing* zu einer veränderten Resistenz führen. Das verwendete *P. infestans*-Isolat 208m2 wurde während meiner Diplom-Arbeit auf seine Virulenzen getestet. Dabei zeigte sich, dass die *RI*-Gen-vermittelte Resistenz nicht überwunden werden kann (Eschen-Lippold, 2004). Für die Analyse der Funktion von *StLOX1* und *St9DES* in der Sorten-spezifischen Resistenz sollten also *RI*-Gen-tragende Pflanzen verwendet werden. Diese wurden freundlicherweise von Frau Dr. Gebhardt zur Verfügung gestellt. Bei den Pflanzen handelte es sich um susceptible Désirée-Kartoffelpflanzen, die mit dem *RI*-Gen transformierten wurden (Ballvora *et al.*, 2002).

Diese wurden mit *StLOX1*-RNAi- bzw. *St9DES*-RNAi-Konstrukten im *pHELLSGATE8*-Vektor (Helliwell *et al.*, 2002) re-transformiert. Dabei konnte nicht auf Kanamycin selektiert werden, da dieses Antibiotikum bereits für die *RI*-Transformation verwendet wurde. Im ersten Ansatz wurden deshalb zwei modifizierte *pHELLSGATE8*-Vektoren kloniert, die die Selektionsmarker *DSDA* bzw. *DAO1* tragen (s. 2.2.21 und A.4) und eine Selektion positiver Transformanten mit für Pflanzen toxischen Aminosäuren der D-Konfiguration ermöglichen (Erikson *et al.*, 2004, 2005). Für die Pflanzenselektion wurde die Aminosäure D-Serin verwendet. Über eine Verdünnungsreihe wurde mit Wildtyp-Pflanzen die optimale Konzentration, die signifikant das Wurzelwachstum *in vitro* hemmt, bestimmt (Daten nicht gezeigt). Diese lag bei 0,5 mM D-Serin. Während der Transformation wurden etwa 200 Pflanzen selektiert, die deutliches Wurzelwachstum auf D-Serin-haltigem Medium zeigten. Mittels Southern-Blot-Methodik und Hybridisierung mit *pHELLSGATE8*-spezifischen Sonden sollte auf die Integration des RNAi-Konstruktes geprüft werden. Dabei zeigte sich, dass keine Transformante unter den Kandidaten war (Daten nicht gezeigt). Für die gegebenen Transformationsbedingungen scheint die Expression von *DSDA* und *DAO1* zu schwach gewesen zu sein.

Daraufhin wurde die Kanamycin-Resistenzkassette des *pHELLSGATE8*-Vektors gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ausgetauscht (s. 2.2.20 und A.3). Zunächst wurde in den resultierenden Vektor nur das *StLOX1*-RNAi-Fragment kloniert. Dieser zweite Ansatz verlief erfolgreich, aus der Transformation der *RI*-Pflanzen und aller erforderlichen Kontrollen gingen *StLOX1*-RNAi-Pflanzen hervor. In Abb. 24 ist beispielhaft ein Southern-Blot abgebildet, der die Integration des Konstruktes ins Genom nachweist.

Abb. 24. Nachweis der Integration des *StLOX1*-RNAi-Konstruktes ins Pflanzen-genom (Beispiel-Blot).

DNA aus den angegebenen Pflanzen wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut, nach der Agarosegel-Elektrophorese auf eine Nylonmembran übertragen und mit einem radioaktiv markierten *pHELLSGATE8*-spezifischen Fragment hybridisiert. Transformanten zeigen eine Bande bei 2,9 kb (Pfeil). Im Wildtyp und der *RI*-Kontrolle ist keine Bande detektierbar. In vielen Transformanten sind multiple Insertionen vorhanden. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Pflanzen aus gleichen Kalli. Liegt wie bei C1 und C2 (WT-Hintergrund) das gleiche Bandenmuster vor, handelt es sich um Klone. * Genetischer Hintergrund, in den transformiert wurde. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; *RI*= *RI*-Gen-tragende Pflanze.



Die selektierten Pflanzen wurden zur Kontrolle der Reduktion der Transkript-Akkumulation in Erde angezogen und mit *Psm* infiltriert. Die Probennahme erfolgte 8 hpi. In Abb. 25 ist deutlich die *StLOX1*-Transkript-Akkumulation in den Kontrollen und nicht in den RNAi-Linien zu sehen. Lediglich in der RNAi-Linie „AB2 in WT“ bleibt der *Silencing*-Effekt aus, hier kommt es ebenfalls zu einer starken mRNA-Akkumulation.

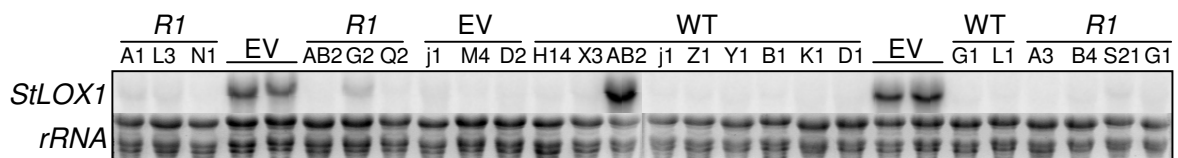


Abb. 25. Nachweis des RNAi-Effektes in *StLOX1*-RNAi-*RI*-Pflanzen.

Blätter wurden 8 Stunden nach *Psm*-Infiltration geerntet. Mittels Northern-Blot-Hybridisierung mit *StLOX1*-spezifischer Sonde erfolgte der Nachweis von korrespondierenden Transkripten. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; *RI*= *RI*-Gen-tragende Pflanze.

Pro genetischem Hintergrund wurden drei unabhängige Linien ausgewählt (Tab. 2), für die ein Oxylipin-Profil erstellt wurde (Dr. C. Göbel, AG Feussner, Uni Göttingen; Abb. A.5). Dabei zeigte sich, dass in allen RNAi-Linien bis auf L5 H1/4 die Akkumulation von 9LOX-Produkten stark herabgesetzt ist. Wie auch in den *StLOX1*-RNAi-Pflanzen im suszeptiblen Hintergrund (Göbel *et al.*, 2003) kommt es gleichzeitig zu einer erhöhten Akkumulation einiger 13-LOX-Produkte und autoxidativen Produkte (s. A.5).

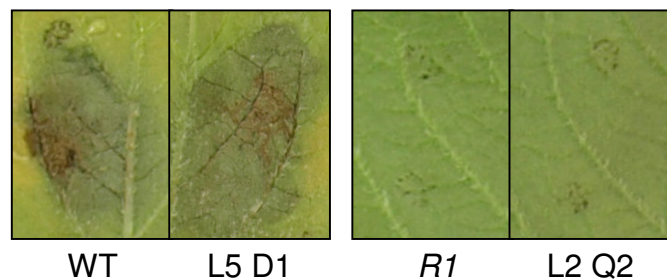
Tab. 2. Übersicht über die in den Infektions-Experimenten mit *P. infestans* verwendeten *StLOX1*-RNAi-Linien. L2, L4, L5= Kennzeichnung der Linien, in die transformiert wurde.

Transformierte Linie	Resultierende Linien
<i>RI</i> = „L2“	AB2, N1, Q2
EV = „L4“	D2, j1, M4
WT = „L5“	D1, H1/4, K1

Bei ersten Infektionsexperimenten zeigte sich rein visuell, dass es zu keinem Bruch der Resistenz in den *StLOX1*-RNAi-*RI*-Pflanzen kommt, wie exemplarisch für eine Linie mit den zugehörigen Kontrollen in Abb. 26 vergrößert dargestellt ist. Selbst acht Tage nach Inokulation sind hier nur punktuell Nekrosen an den Stellen versuchter Penetration durch *P. infestans* innerhalb der Inokulationsstellen sichtbar. Hier haben die attackierten Pflanzenzellen mit hypersensitivem Zelltod reagiert und so eine Infektion unterbunden. Im Gegensatz dazu ist eine starke Infektion in den suszeptiblen Pflanzen sichtbar.

Abb. 26. Infektions-Phänotyp der *StLOX1*-RNAi-*RI*-Pflanzen.

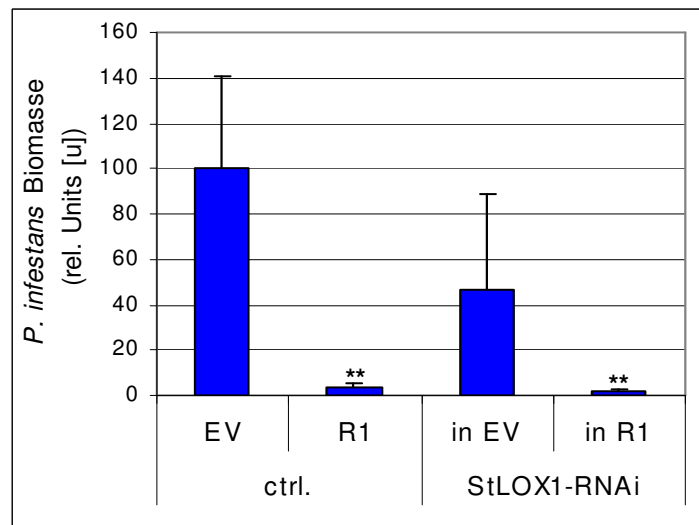
Blätter wurden mit einer *P. infestans*-Sporensuspension inokuliert ($1 \cdot 10^5$ Sp./ml; 10 μ l) und nach acht Tagen fotografiert. Dargestellt sind je zwei Inokulationsstellen pro Bildausschnitt. Weitere Details s. Text. WT= Wildtyp; *RI*= *RI*-Gen-tragende Pflanze; L2 Q2, L5 D1= *StLOX1*-RNAi-Pflanzen (s. Tab. 2).



In den anschließenden Experimenten wurde dann mittels Realtime-PCR das tatsächliche Wachstum von *P. infestans* in den einzelnen Linien bestimmt. Dabei wurde der visuelle Phänotyp der Infektion aus Abb. 26 bestätigt, d. h. in den *StLOX1*-RNAi-*RI*-Pflanzen ist die Resistenz nicht gebrochen (Abb. 27). Im dargestellten Diagramm ist die Pathogen-Biomasse in den suszeptiblen Kontroll-Pflanzen (ctrl.) und den suszeptiblen *StLOX1*-RNAi-Pflanzen (*StLOX1*-RNAi in ctrl.) recht unterschiedlich. Eindeutig ist jedoch, dass in beiden Fällen eine Infektion vorliegt, in den *RI*-Gen-tragenden Pflanzen (*RI* und *StLOX1*-RNAi in *RI*) jedoch nicht. Generell betrachtet kommt es immer wieder vor, dass in

Infektionsexperimenten mit *P. infestans* die Infektionsstärke sehr unterschiedlich ausfällt, wie die folgenden Publikationen belegen. (Constabel *et al.*, 1993) beschrieben in Versuchen mit abgeschnittenen Blättern eine hohe Variabilität der Infektionsausprägung innerhalb eines Experimentes. (Caten, 1970; Caten und Jinks, 1968) zeigten, dass in vegetativ vermehrten *in vitro*-Kulturen eine spontane Variabilität und nicht-Uniformität im Myzelwachstum, der Myzel- und Sporen-Morphologie, der Sporen-Überlebensfähigkeit und der Aggressivität auftritt.

Abb. 27. *P. infestans* Wachstum auf *StLOX1*-RNAi-*R1*-Pflanzen. Pflanzen wurden mit einer *P. infestans* Sporensuspension inokuliert ($1 \cdot 10^5$ Sp./ml; 10 μ l) und nach drei Tagen geerntet. Isolierte DNA wurde mittels Realtime-PCR auf *P. infestans*-DNA überprüft. Das Experiment wurde acht Mal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt, dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis mit Standardabweichungen. EV= Leerer Vektor; *R1*= *R1*-Gen-tragende Linie; *StLOX1*-RNAi in *R1*= AB2, N1, Q2. (** $p < 0,01$).



Aufgrund der fehlgeschlagenen Transformation mit den *DSDA*- bzw. *DAOI*-Konstrukten, standen keine mit dem auf dem Gateway-System (Invitrogen, Karlsruhe) basierenden *St9DES*-RNAi-Konstrukt transformierten *R1*-Pflanzen zur Verfügung. Allerdings wurden bereits in meiner Diplomarbeit *St9DES*-RNAi Pflanzen im *R1*-Hintergrund zu ersten Versuchen herangezogen, die mit dem RNAi-Konstrukt im *pBBTX*-Vektor transformiert und auf BASTA (Phosphinotricin) selektioniert wurden (Eschen-Lippold, 2004). Da damals die ersten Ergebnisse auf Southern-Ebene nicht richtig mit denen auf Northern-Ebene korrelierten und noch keine reproduzierten Infektionsexperimente mit *P. infestans* vorlagen, wurden die Pflanzen erneut auf Integration des RNAi-Konstruktes ins Genom überprüft. Dabei zeigte sich (Abb. 28), dass in den Linien C1, C2, C3 das Konstrukt erwartungsgemäß integriert wurde (Bande bei 2,5 kb), in den Linien G1, G2 jedoch aberrante Integration vorliegt (Bande bei > 5 kb).

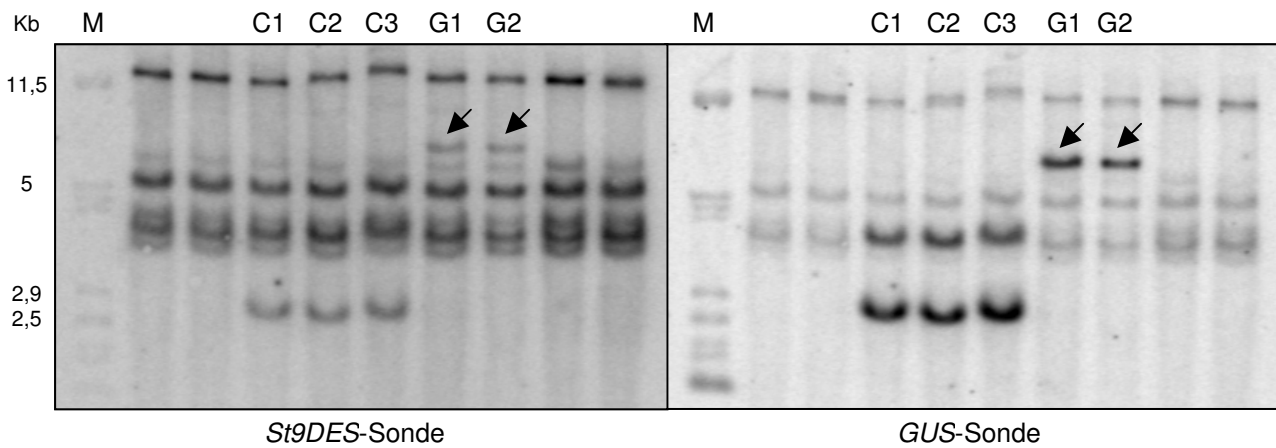


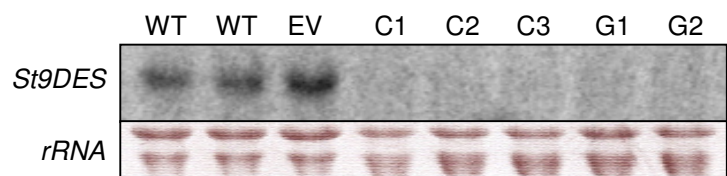
Abb. 28. Nachweis der Integration des *St9DES*-RNAi-Konstruktes ins Pflanzengenom. DNA wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten (erwartetes Fragment 2,5 kb), dann elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Der Blot wurde zuerst mit einem *St9DES*-Fragment hybridisiert, danach mit einem *GUS*-Fragment. Pfeile kennzeichnen aberrante Integration in den Linien G1 und G2.

Die mit dem *St9DES*-Fragment detektierte Bande bei >5 kb in den Linien G1 und G2 wurde mittels Hybridisierung mit dem *GUS*-Fragment als spezifische RNAi-Konstrukt-Bande identifiziert: ein Fragment des *GUS*-Gens (kodiert für β -Glucuronidase) fungiert im *pBBTX*-Vektor als Platzhalter zwischen den beiden RNAi-Fragmenten (Eschen-Lippold, 2004). Northern-Analysen sollten dann zeigen, ob die fünf transgenen Linien tatsächlich eine herabgesetzte Transkriptakkumulation der *St9DES* zeigen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es sich bei den Linien C1, C2, C3 und auch bei G1 und G2 um Klone handelt, da sie vom gleichen Kallus stammen. Unter dieser Annahme handelt es sich lediglich um zwei unabhängige transgene Linien C und G.

Zum Nachweis des RNAi-Effektes, wurden die Pflanzen angezogen und mit *P. infestans* inokuliert. Nach drei Tagen erfolgte die Probennahme von infiziertem Material zur Northern-Analyse. In Abb. 29 ist deutlich zu sehen, dass die Kontrollpflanzen (WT, EV) *St9DES*-Transkripte akkumulieren, die RNAi-Linien nicht. Demnach führt auch das abberant integrierte RNAi-Konstrukt in den Linien G1 und G2 zu einer Reduktion der Transkript-Akkumulation.

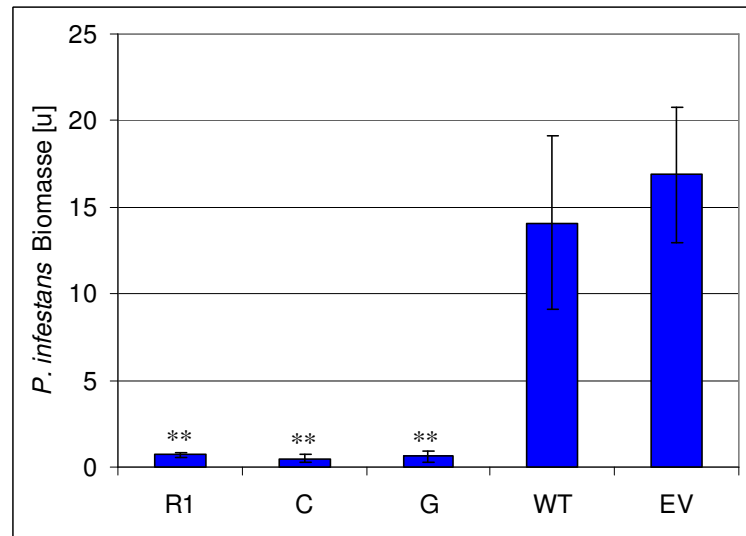
Abb. 29. *St9DES*-Transkriptakkumulation nach *P. infestans*-Infektion.

Drei Tage nach Inokulation mit einer *P. infestans*-Sporensuspension ($1 \cdot 10^5$ Sp./ml; 10 μ l) wurde infiziertes Material zur RNA-Extraktion geerntet. Der Northern-Blot wurde mit einem *St9DES*-Fragment außerhalb der RNAi-Region hybridisiert (s. A.7).



Im nächsten Schritt folgten Infektionsexperimente mit *P. infestans* und anschließender Pathogen-Biomasse Bestimmung, um zu testen, ob das *Silencing* der Pathogen-induzierten 9-Divinylether-Synthase einen veränderten Resistenzphänotyp zur Folge hat.

Abb. 30. *P. infestans*-Inokulation der *St9DES*-RNAi-*R1*-Pflanzen. Pflanzen wurden mit einer *P. infestans* Sporensuspension inokuliert ($1 \cdot 10^5$ Sp./ml; 10 μ l) und nach drei Tagen geerntet. Die *P. infestans*-Biomasse wurde mittels Realtime-PCR auf DNA-Ebene überprüft. Das Experiment wurde drei Mal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. Dargestellt ist ein Experiment mit Standardabweichungen. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; C= C1, C2, C3; G= G1, G2; *R1*= *R1*-Gen-tragende Linie. (** $p < 0,01$).



Wie aus Abb. 30 ersichtlich, hat auch das Herabsetzen der *St9DES*-Transkriptakkumulation keinen Bruch der Resistenz, bzw. eine erhöhte Suszeptibilität zur Folge. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass beiden Enzymen, 9-Lipoxygenase und 9-Divinylether-Synthase, keine Funktion in der *R*-Gen-vermittelten Resistenz gegen *P. infestans* zukommt.

3.4.2. Chemisch induzierte Resistenz

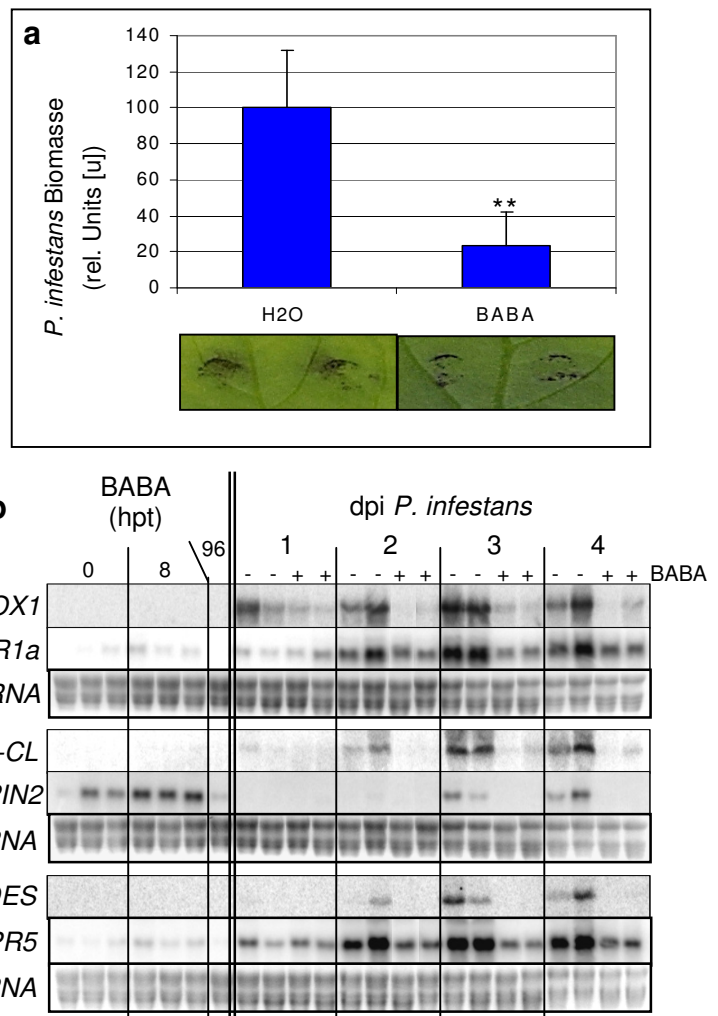
In vielen suszeptiblen Pflanzenspezies kann durch chemische Induktion ein Resistenzzustand gegen bestimmte Pathogene hervorgerufen werden (Conrath *et al.*, 2006; Cohen, 2002; Jakab *et al.*, 2001). Mit diesem Ansatz induzierter Resistenz sollte neben der *R*-Gen-vermittelten Resistenz in den entsprechenden *R1*-Pflanzen nun in den suszeptiblen *StLOX1*-RNAi- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen die Rolle des 9LOX-Weges für die Pathogenabwehr gegen *P. infestans* weiter untersucht werden.

Für die Infektionsexperimente mit *P. infestans* wurden die Pflanzen zwei Tage vor der Inokulation mit einem definierten Volumen einer Lösung mit bekannter β -Aminobuttersäure (BABA)-Konzentration gegossen. In Vorexperimenten nur mit Désirée-Wildtyppflanzen, die zusammen mit Simone Altmann (IPB Halle) durchgeführt wurden, zeigte sich, dass 100 ml einer 1 mM BABA-Lösung einen starken Resistenzzustand induzieren. Von den

Versuchspflanzen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Blattproben genommen, um auf RNA-Ebene die Expression Abwehr-relevanter Gene zu überprüfen. Die Northern-Hybridisierungen zeigten keine schnellere oder stärkere Expression dieser Gene in den BABA-vorbehandelten Pflanzen (Abb. 31). Im Gegenteil, die nicht-vorbehandelten Proben zeigten eine deutlich stärkere Abwehrgen-Expression, die wahrscheinlich auf der erhöhten Zahl infizierter und toter Zellen beruht.

Abb. 31. BABA-induzierte Resistenz gegen *P. infestans*.

Wildtyp-Pflanzen wurden zwei Tage vor Inokulation mit einer *P. infestans*-Sporensuspension ($1 \cdot 10^5$ Sp./ml, 10 μ l) mit 100 ml 1 mM BABA oder Wasser gegossen. Infiziertes Blattmaterial wurde zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. a) *P. infestans* Biomasse-Bestimmung mittels Realtime-PCR (3 dpi), im unteren Teil sind je zwei typische Inokulationsstellen abgebildet (** $P < 0,01$); b) Expression von Abwehrgenen im Verlauf der Infektion mit und ohne BABA-Vorbehandlung. Pflanzen wurden mit BABA gegossen (s.o.) und zwei Tage später mit *P. infestans* inokuliert (s.o.). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden infizierte / nicht-infizierte Blattproben genommen und RNA isoliert. Hergestellte Blots wurden mit verschiedenen radioaktiven Sonden hybridisiert. *St4-CL*= 4-COUMARATE:COA LIGASE; *StPIN2*= PROTEINASE-INHIBITOR 2; *StPR1a/5*= PATHOGENESIS-RELATED 1a / 5. Das Experiment wurde drei Mal mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt. Die starke *StPIN2*-Expression in unbehandelten Proben ist unerwartet und spricht dafür, dass die Pflanzen zu Versuchsbeginn gestresst waren.



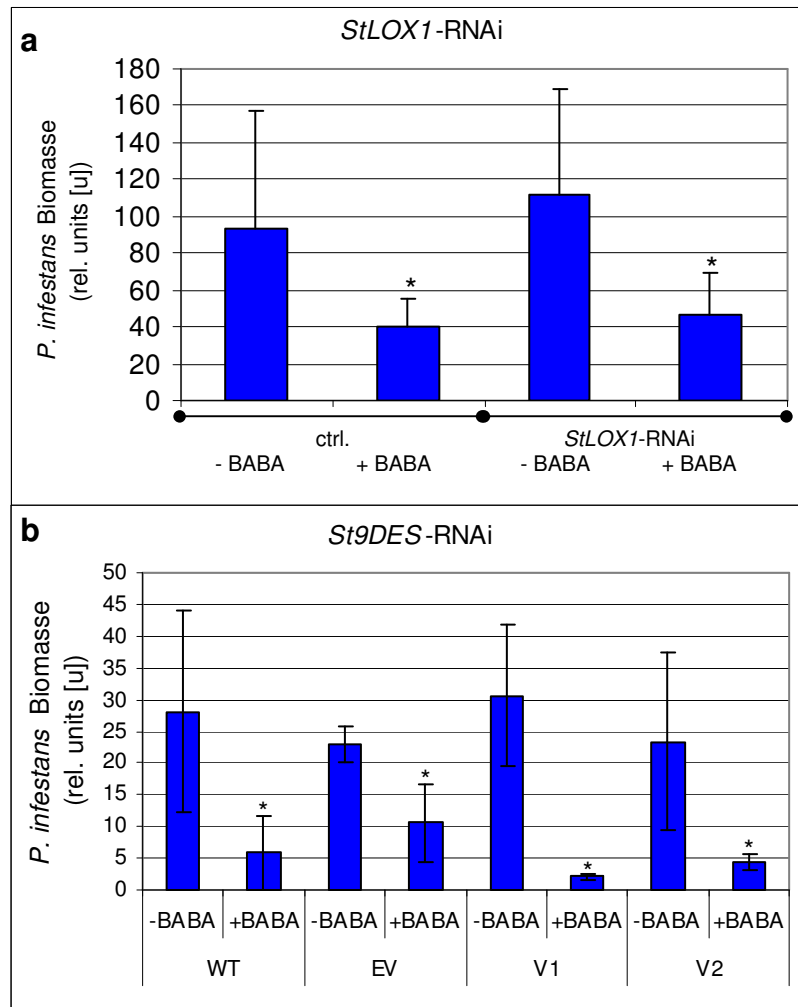
Diese Vorbehandlung wurde auch in Experimenten mit den *StLOX1*- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen durchgeführt. Zwei Tage nach BABA-Applikation wurde mit *P. infestans* inokuliert und wieder 3 Tage später Probenmaterial geerntet. In Abb. 32 sind die Ergebnisse dargestellt. In jedem Experiment konnte ein signifikant erhöhter Resistenzzustand erzielt werden, unabhängig vom Genotyp. In Kartoffel ist für die Ausbildung der BABA-induzierten

Resistenz und der *R*-Gen-vermittelten Resistenz (vgl. 3.4.1) der 9LOX-Weg demnach nicht von Bedeutung.

Abb. 32.

BABA-behandelte susceptible *StLOX1*-RNAi- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen drei Tage nach *P. infestans*-Infektion.

Zwei Tage vor *P. infestans*-Inokulation ($1 \cdot 10^5$ Sp./ml; 10 μ l), wurden Pflanzen mit 100 ml 1 mM BABA gegossen. a) *StLOX1*-RNAi (Linien F, J, K, O; ctrl.= WT, EV), b) *St9DES*-RNAi (Linien V1, V2; WT, EV). Die Experimente wurden drei Mal mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt. Dargestellt ist jeweils ein Experiment mit Standardabweichungen. (* $P < 0,05$). WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor.



3.5. Die Rolle des Kandidatengens *StSYR1* für die basale Resistenz

Die Auswertung der TIGR-Microarray-Experimente zeigte, dass das Gen *StSYR1* in Kartoffel nach *Psm*-Infiltration exprimiert wird (s. Tab. 1). Die Induktion konnte auf Northern-Ebene bestätigt werden (Abb. 17). *StSYR1* zeigt hohe Homologie zu den Syntaxinen NtSYR1 aus Tabak und AtPEN1 (bzw. AtSYP121), sowie AtSYP122 aus Arabidopsis (Tab. 3). Diese Homologe haben tatsächlich eine Funktion in der Pathogenabwehr (Zhang *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2005). Ihnen wird eine Rolle in der Vesikelfusion mit der Zellmembran und der Sekretion von Proteinen zugeschrieben (Pratelli *et al.*, 2004). Ein Ausschalten dieser Gene führt in Tabak, wie auch in Arabidopsis, zu einem veränderten Wuchstyp (Zhang *et al.*, 2007; Assaad *et al.*, 2004; Geelen *et al.*, 2002).

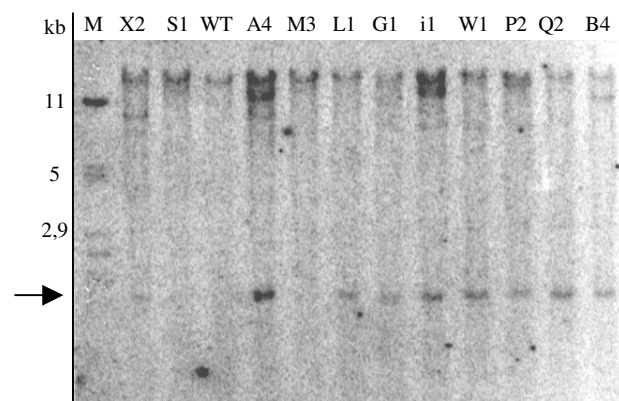
Tab. 3. Identitätsvergleich von *StSYR1*-Homologen. Dargestellt sind die Homologie-Vergleiche zwischen *StSYR1* und den Homologen auf Proteinebene in %-Identität. *StSYR1* = *StPEN1* (AY616763), NtSYR1 (AAD11808), AtSYP121 (NP_974288), AtSYP122 (NP_190808). Verwendet wurde das Programm NCBI Blast 2 Sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

Vergleich	% Identität
<i>StSYR1</i> -NtSYR1	92
<i>StSYR1</i> -AtSYP121	74
<i>StSYR1</i> -AtSYP122	65

In einem RNA-Interferenz-Ansatz sollte die Rolle von *StSYR1* für die basale Resistenz der Kartoffel gegen *P. infestans* untersucht werden. Dazu wurden Wildtyp-Désirée Pflanzen mit einem *pHELLSGATE8-StSYR1*-RNAi-Konstrukt transformiert. Aus Proben der regenerierten Pflanzen wurde DNA isoliert und mittels Southern-Analytik die Integration des RNAi-Konstruktes ins Genom nachgewiesen (Abb. 33).

Abb. 33. Nachweis der Integration des *StSYR1*-RNAi-Konstruktes ins Pflanzengenom (Beispiel-Blot).

Genomische DNA wurde mit dem Enzym BamHI verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und dann mit einem radioaktiv markierten BamHI-*pHELLSGATE8*-Fragment hybridisiert. Zu erwarten ist eine Bande bei ca. 1700 bp (Pfeil). Die Linien X2, A4, L1, G1, i1, W1, P2, Q2 und B4 sind demnach Transformanten. M= Marker, X2-B4= *StSYR1*-RNAi.



Danach sollte untersucht werden, ob in den Transformanten der RNAi-vermittelte *Silencing*-Effekt vorliegt. Dazu wurden die Pflanzen auf Erde angezogen, mit *Psm* infiziert und nach 8 Stunden Proben zur RNA-Extraktion genommen. Auf Northern-Ebene zeigte sich,

mit zwei Ausnahmen, in den unabhängigen Linien die Repression der Transkription des *StSYR1*-Gens (Abb. 34). Die beiden Linien D1 und U2 sind zwar auf Southern-Ebene positiv, der RNAi-Konstrukt-vermittelte *Silencing*-Effekt funktioniert aber nicht, so dass es zur Transkript-Akkumulation kommt.

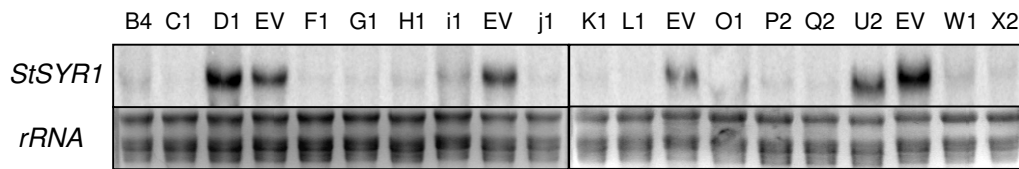
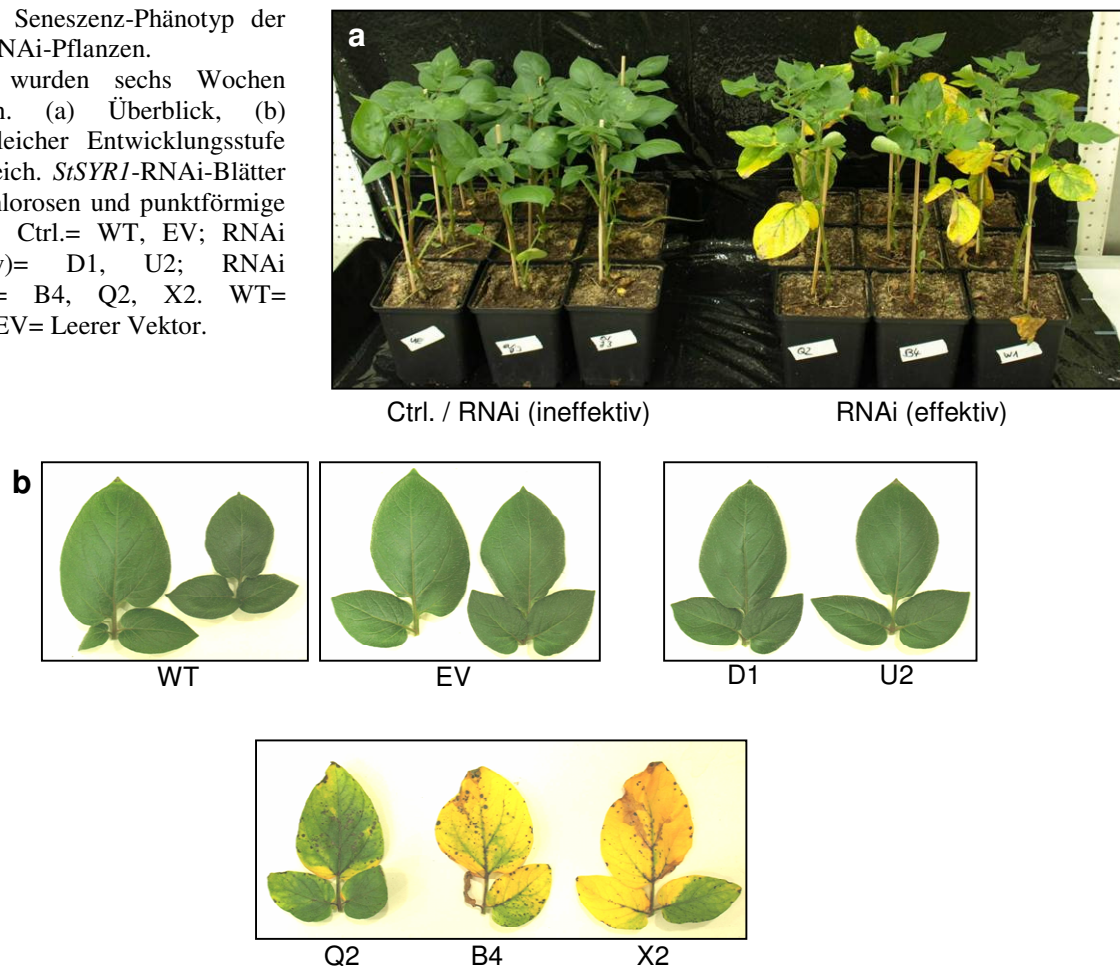


Abb. 34. *StSYR1*-Transkript-Akkumulation in den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen nach *Psm*-Infiltration. Pflanzen wurden mit *Psm* infiltriert und nach acht Stunden Proben genommen. Auf Nylon-Membranen übertragene RNA wurde mit einem *StSYR1*-spezifischen Fragment hybridisiert. Alle Linien bis auf D1 und U2 zeigen eine Reduktion der *StSYR1*-mRNA-Akkumulation. EV= Leerer Vektor; andere Linien= potentiell *StSYR1*-RNAi.

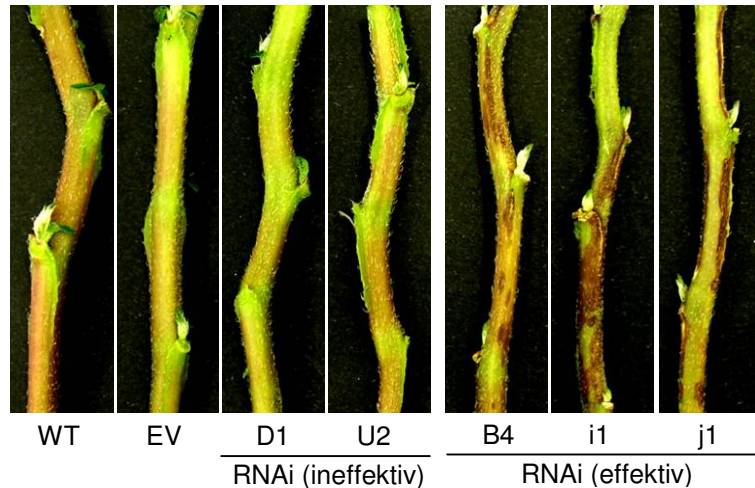
Bei der Pflanzenanzucht fiel auf, dass die RNAi-positiven Pflanzen nach etwa drei Wochen Wachstum in Erde Seneszenz-Erscheinungen und punktförmige Nekrosen auf den älteren Blättern zeigten, die Kontrollen (EV, D1, U2) jedoch normal wuchsen. Dieser Effekt wurde in weiteren Experimenten untersucht und konnte bestätigt werden. In Abb. 35 ist der Seneszenz-Phänotyp älterer Pflanzen, verbunden mit der Ausbildung von Chlorosen und Nekrosen, dargestellt.

Abb. 35. Seneszenz-Phänotyp der *StSYR1*-RNAi-Pflanzen. Pflanzen wurden sechs Wochen angezogen. (a) Überblick, (b) Blätter gleicher Entwicklungsstufe im Vergleich. *StSYR1*-RNAi-Blätter zeigen Chlorosen und punktförmige Nekrosen. Ctrl.= WT, EV; RNAi (ineffektiv)= D1, U2; RNAi (effektiv)= B4, Q2, X2. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor.



Neben den Blattsymptomen entwickelten alte *StSYR1*-RNAi-Pflanzen auch nekrotische Bereiche an den Sprossen, die dem verfrühten Absterben der Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen vorausgingen (Abb. 36). Diese Spross-Symptome sind erst nach ca. 5 Wochen Anzucht unter den gegebenen Anzuchtbedingungen zu finden, also deutlich später als die Blattsymptome.

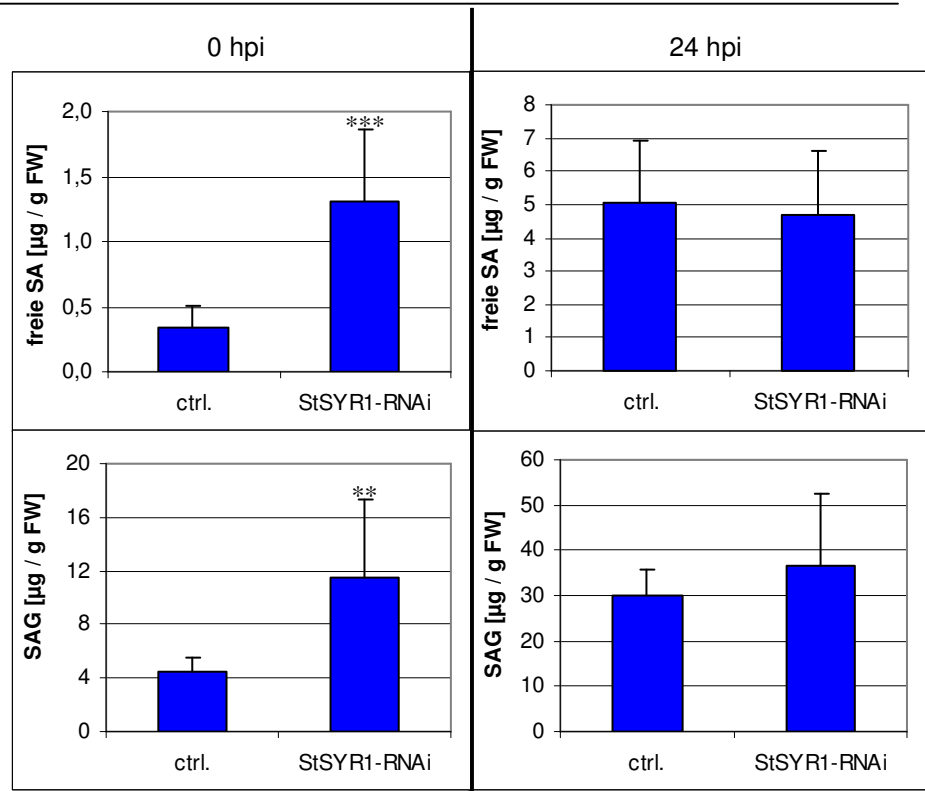
Abb. 36. Nekrosenbildung an den Sprossen der *StSYR1*-RNAi-Pflanzen. Phänotyp sechs Wochen alter Sprosse (überbelichtet dargestellt). WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor.



Zur weiteren Charakterisierung der Pflanzen wurde der Gehalt an endogener freier Salicylsäure (SA) und glykosylierter SA (SAG), sowie der Gehalt der Jasmonate 12-Oxophytodiensäure (OPDA), Jasmonsäure (JA) und JA-Isoleucin (JA-Ile) gemessen. Hinweise, dass die SA-Akkumulation verändert sein könnte, kamen von (Zhang *et al.*, 2007). Die Autoren zeigten, dass in der *Arabidopsis* *syp121-syp122*-Doppelmutante erhöhte SA-Mengen akkumulieren. Bei den eigenen Experimenten mit den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen zeigte sich tatsächlich, dass der Gehalt an SA und SAG in unbehandelten *StSYR1*-RNAi-Blättern signifikant höher ist als in den Kontrollpflanzen. Dieser Unterschied relativierte sich 24 Stunden nach Infiltration von Pep-13, da alle Pflanzen viel SA akkumulierten. In RNAi- und Kontroll-Linien lag dann kein Unterschied mehr vor (Abb. 37).

Abb. 37. SA- und SAG-Bestimmung in *StSYR1*-RNAi-Pflanzen nach Pep-13-Infiltration.

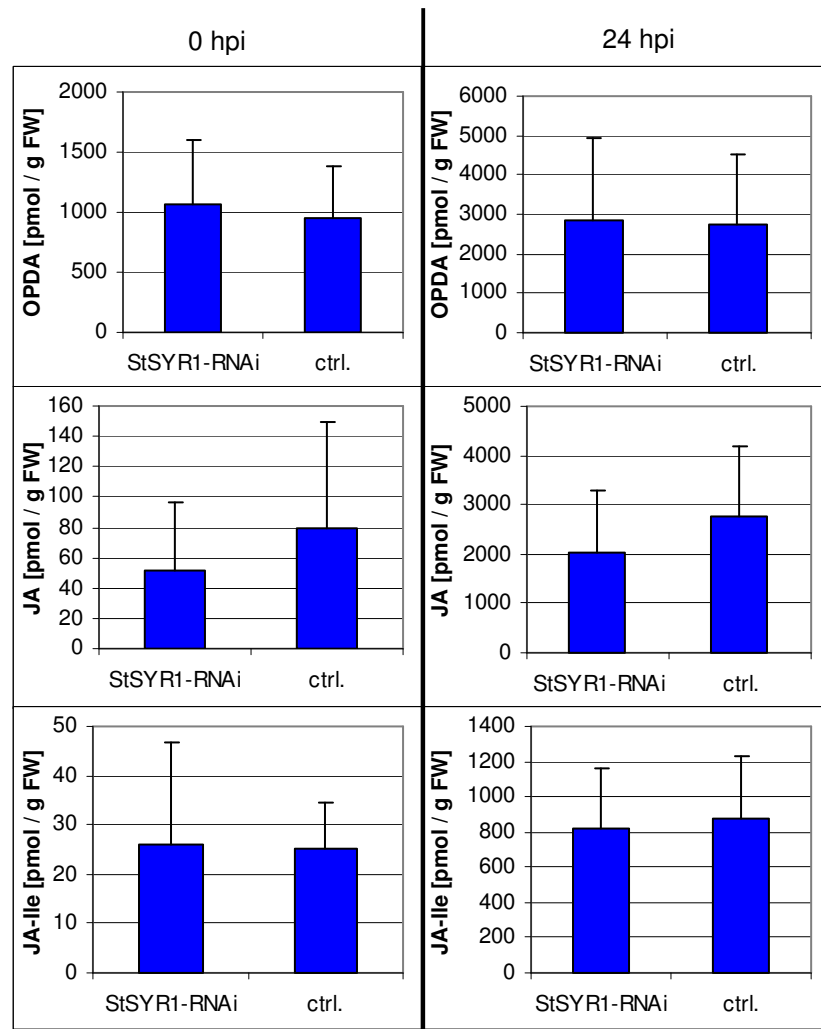
Aus Probenmaterial von unbehandelten und Pep-13-infiltrierten (24 hpi) Blättern wurden die freie (SA) und die glycosylierte Salicylsäure (SAG) extrahiert und die Mengen pro Gramm Frischmasse bestimmt. Ctrl. = WT, EV + RNAi (ineffektiv) D1, U2; *StSYR1*-RNAi = Linien s. Abb. 34. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei Experimenten. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor. (** $p < 0,01$; *** $p = 0,0001$).



Bei den Gehalten an OPDA, JA und JA-Ile liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen *StSYR1*-RNAi- und Kontrollpflanzen vor, weder in unbehandeltem noch in Pep-13-infiltriertem Probenmaterial (Abb. 38). Dies bestätigt das Ergebnis in (Halim, 2006), dass in Kartoffel kein antagonistischer Effekt zwischen SA und JA vorliegt.

Abb. 38. OPDA-, JA- und JA-Ile-Bestimmung in *StSYR1*-RNAi-Pflanzen nach Pep-13-Infiltration.

Aus Probenmaterial von unbehandelten und Pep-13-infiltrierten (24 hpi) Pflanzen wurden OPDA, JA und JA-Ile extrahiert und die Mengen pro Gramm Frischmasse bestimmt. Ctrl. = WT, EV + RNAi (ineffektiv) D1, U2. *StSYR1*-RNAi = Linien s. Abb. 34. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei Experimenten. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor.



Erhöhte endogene SA-Konzentrationen, bzw. die exogene Applikation von SA oder Analoga (INA, BTH) führt in Pflanzen zur Expression von SA-abhängigen Genen (Lucht *et al.*, 2002; Sticher *et al.*, 1997; Friedrich *et al.*, 1996; Ryals *et al.*, 1996; Vernooij *et al.*, 1995). Deshalb sollte die Expression von SA-Markergenen in den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen überprüft werden. In Abb. 39 ist die Expression der *PR*-Gene *StPR1a* und *StPR5* nach Pep-13-Infiltration (24 hpi) dargestellt.

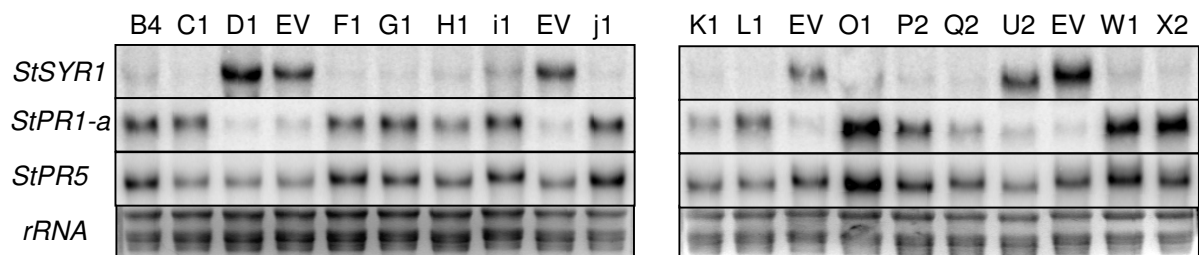


Abb. 39. Expressions-Analyse der Gene *StSYR1*, *StPR1a* und *StPR5* in den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen (24 hpi Pep-13) auf transkriptioneller Ebene.

Aus infiltriertem Blattmaterial wurde RNA isoliert. Damit hergestellte Blots wurden mit radioaktiven Sonden der angegebenen Gene hybridisiert. EV= Leerer Vektor; D1, U2= RNAi (ineffektiv); andere Linien= RNAi (effektiv).

In den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen sind erhöhte *StPR1a*-Transkriptmengen nachweisbar, dies korreliert mit dem Fehlen der *StSYR1*-Transkripte. Für *StPR5* ist dieser Effekt fraglich, da die Expression allgemein variabel ist. Bei den *PR*-Genen handelt es sich um sogenannte „späte Abwehrgene“ (z.B. Baillieul *et al.*, 1995), deren Expression zu diesem Zeitpunkt der Probennahme in Wildtyp-Pflanzen erst beginnt. Deshalb ist es interessant, dass zumindest *StPR1a* in den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen deutlich stärker exprimiert wird, wobei sich die Frage stellt, ob dies auf einer schnelleren Induktion oder einer konstitutiven Expression beruht. Zur Klärung dieser Frage wurden weitere Experimente durchgeführt. Wie aus Abb. 40 ersichtlich, liegt in den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen eine konstitutive Expression vor, die nach Pep-13-Infiltration aber, wie in den Kontrollen, noch deutlich induziert wird.

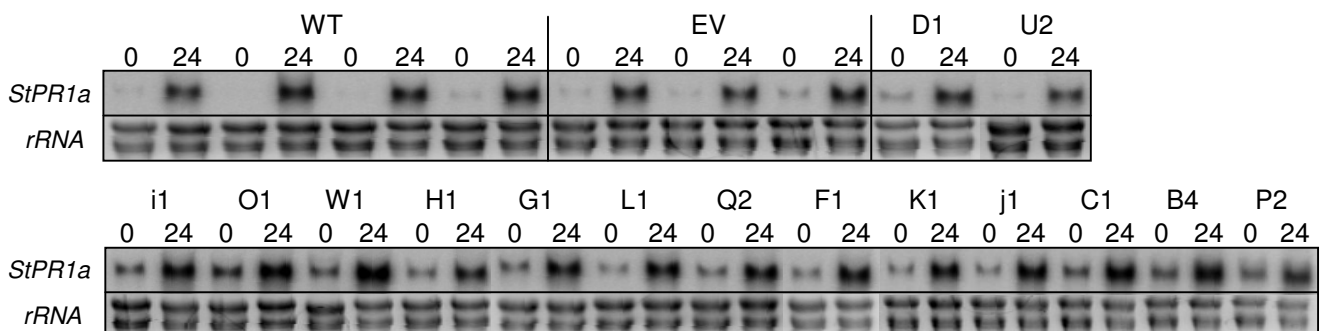


Abb. 40. *StPR1a*-Expression in unbehandelten und Pep-13-infiltrierten *StSYR1*-RNAi-Pflanzen.

Blätter wurden mit Pep-13 infiltriert und zu den Zeitpunkten null und 24 hpi Proben zur RNA-Extraktion genommen. Hergestellte Northern-Blots wurden mit einer *StPR1a*-Sonde hybridisiert. WT = Wildtyp; EV = Leerer Vektor; D1, U2 = ineffektive *StSYR1*-RNAi-Pflanzen; alle anderen Linien = *StSYR1*-RNAi-Pflanzen.

In Experimenten mit *P. infestans* sollte zunächst phänotypisch untersucht werden, ob die *StSYR1*-RNAi-Pflanzen eine veränderte Resistenz im Vergleich zu Kontrollpflanzen zeigen. Generell ist eine verstärkte Symptombildung in Form von nekrotischen Bereichen innerhalb der Inokulationsstelle in den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen ausgeprägt. Dies wird vor allem deutlich, wenn mit Sporen einer wenig aggressiven *P. infestans*-Kultur inokuliert wird, die susceptible Kontrollpflanzen nur gering infiziert (Abb. 41; s. 2.2.9).

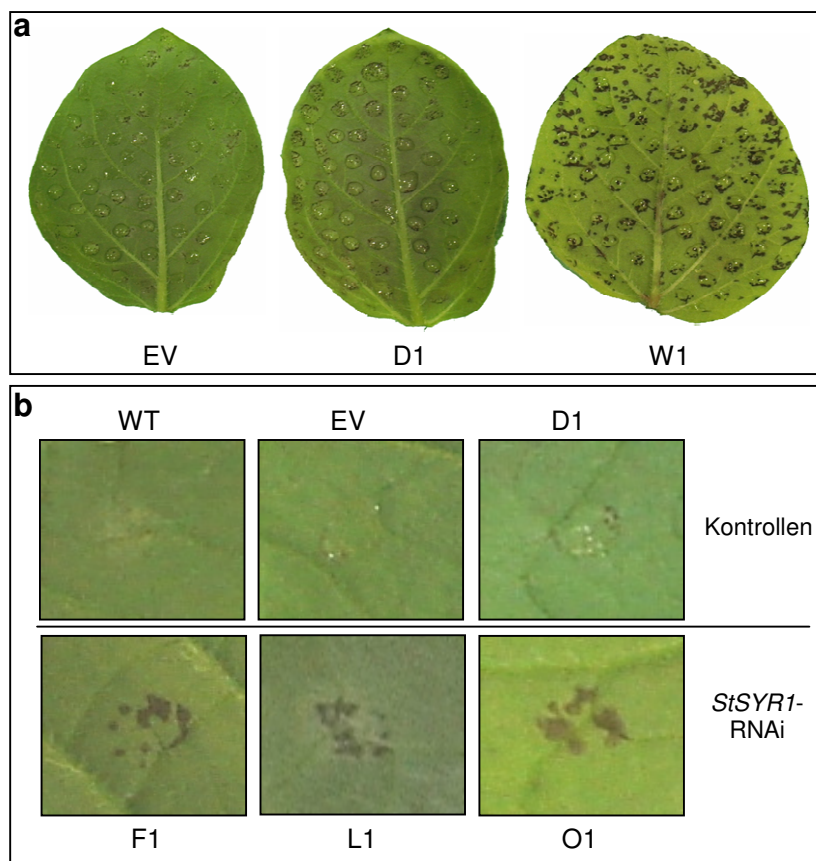


Abb. 41. Repräsentativer Infektionsphänotyp in *StSYR1*-RNAi-Pflanzen nach Inokulation mit einer wenig aggressiven *P. infestans*-Kultur.

Blätter wurden mit einer *P. infestans*-Sporensuspension ($1 \cdot 10^5$ Sp./ml; 10 μ l) inokuliert. a) inokulierte Blätter (drei dpi), b) vergrößerte Inokulationsstellen mit deutlich sichtbaren nekrotischen Bereichen (drei dpi). WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; D1= ineffektive *StSYR1*-RNAi-Linie; F1, L1, O1, W1= *StSYR1*-RNAi.

Auch zwischen den Inokulationsstellen zeigen sich bei den *StSYRI*-RNAi-Pflanzen kleine nekrotische Bereiche (Abb. 42a). Es sollte untersucht werden, ob diese durch *P. infestans*-Infektion, z.B. durch Verspritzen der Sporenlösung während der Inokulation, hervorgerufen werden. Diese Bereiche wurden mit einem Korkbohrer ausgestanzt und mittels Realtime-PCR auf vorhandene *P. infestans*-DNA untersucht. Diese konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 42b). Also handelt es sich nicht um direkt Pathogen-verursachte Nekrosen, ihre Bildung muss anderweitig induziert werden.

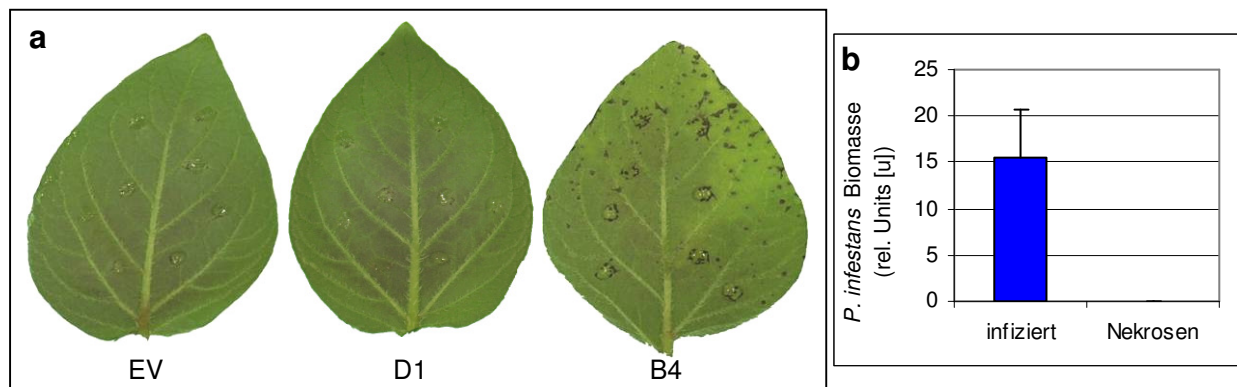


Abb. 42. Nekrosen-Bildung in *StSYRI*-RNAi-Pflanzen nach *P. infestans*-Infektion abseits der Inokulationsstellen. Blätter wurden mit wenigen Tropfen einer wenig aggressiven *P. infestans*-Kultur inokuliert ($1 \cdot 10^5$ Sp./ml; $10 \mu\text{l}$). a) Blattansichten, Fotos entstanden drei dpi; b) *P. infestans*-Nachweis in Nekrosen zwischen Inokulationsstellen (vier dpi; infiziert= Original-Inokulationsstellen). EV= Leerer Vektor; D1= ineffektive RNAi-Pflanze; B4= *StSYRI*-RNAi.

Für die Quantifizierung des *Phytophthora*-Wachstums mittels Realtime-PCR wurden in einzelnen unabhängigen Experimenten zwei, drei und vier Tage nach Inokulation mit einer (normal aggressiven) *P. infestans*-Sporensuspension Proben zur Analyse genommen. Generell war in allen Experimenten bei den früheren Zeitpunkten (zwei und drei dpi) eine erhöhte Resistenz in den *StSYRI*-RNAi-Pflanzen festzustellen. Dieser Infektionsunterschied konnte statistisch signifikant abgesichert werden (Abb. 43). Vier Tage nach Inokulation lag eine große Variabilität in der Infektionsstärke vor. Dies machte sich auch phänotypisch bemerkbar. So wurde deutlich, dass *P. infestans* immer wieder aus einzelnen primären Infektionsstellen (= Inokulationsstelle) in das umgebende Blattgewebe hineinwuchs und Läsionen bildete. Dagegen schien in vielen anderen Inokulationsstellen die starke Nekrosenbildung ein weiteres Ausbreiten der Infektion zu verhindern (Abb. 44).

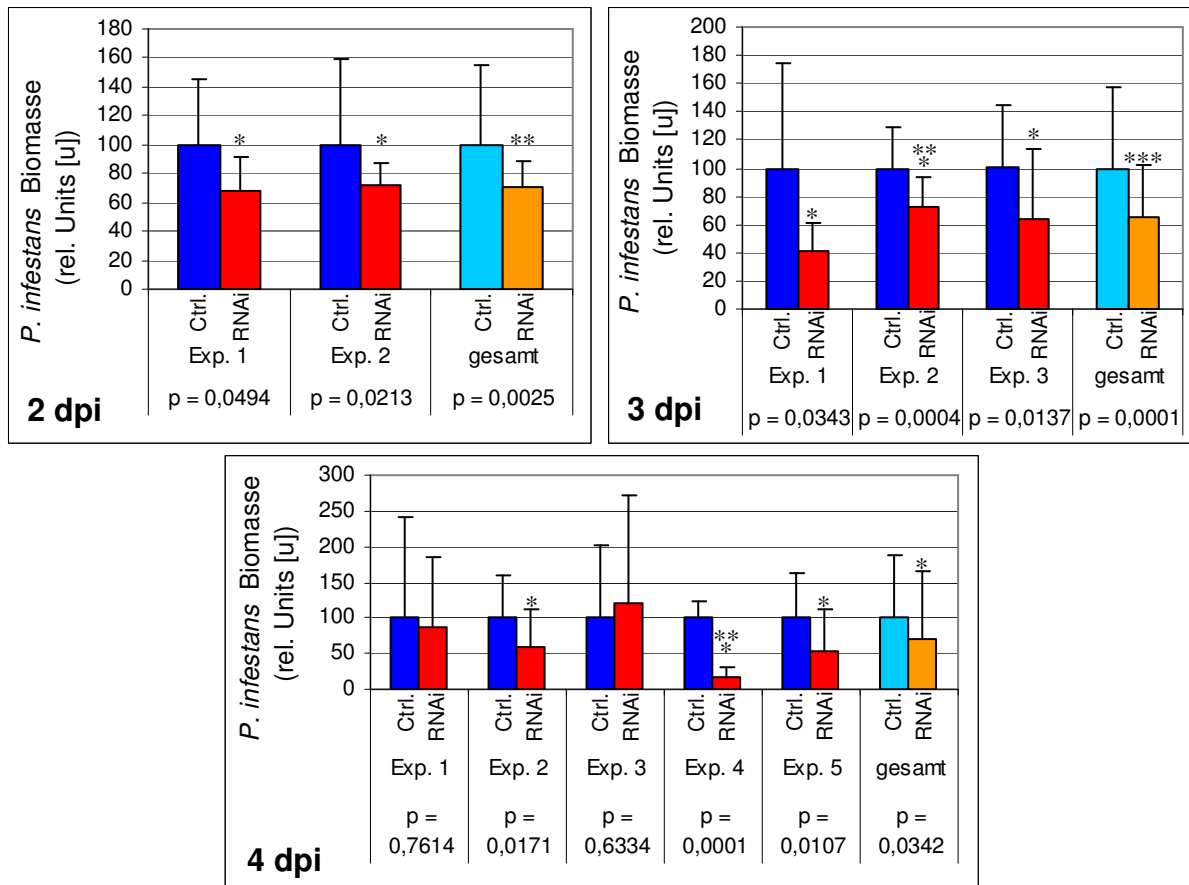


Abb. 43. *P. infestans*-Infektion der *StSYR1*-RNAi-Pflanzen.

Zweieinhalb Wochen alte Pflanzen wurden mit einer *P. infestans*-Sporensuspension ($1 \cdot 10^5$ Sp./ml, 10 μ l) inokuliert. In unabhängigen Experimenten wurden nach zwei, drei bzw. vier Tagen Proben genommen und mittels Realtime-PCR das *P. infestans*-Wachstum bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse mehrerer Experimente jeweils auf die Kontrollen bezogen: zwei dpi mit zwei, drei dpi mit drei und vier dpi mit fünf unabhängigen Experimenten. Ctrl.= Wildtyp, Leerer Vektor + RNAi (ineffektiv) D1, U2; *StSYR1*-RNAi= s. Abb. 34. Die statistische Auswertung erfolgte jeweils unabhängig in den einzelnen Experimenten, sowie für die gesamten Daten eines Zeitpunktes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

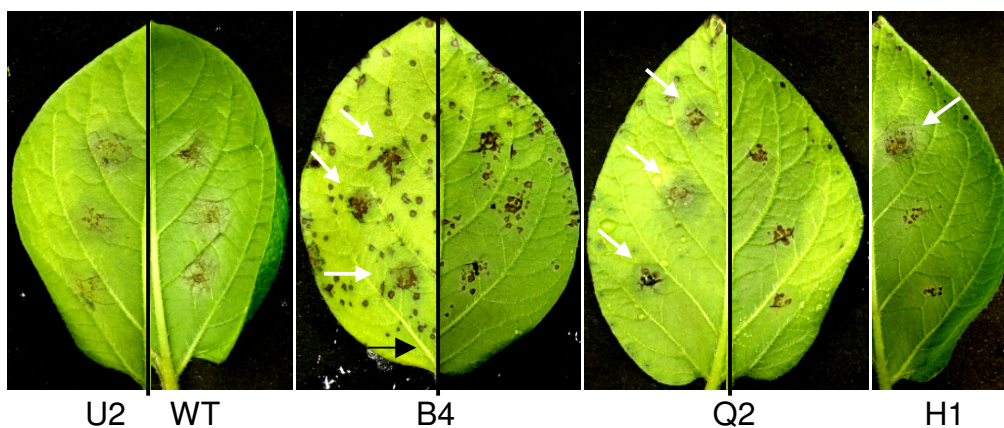


Abb. 44. *StSYR1*-RNAi-Pflanzen mit fortgeschrittener *P. infestans*-Infektion (4 dpi).

Vier Tage nach *P. infestans*-Inokulation werden in den Kontrollen (U2, WT) wachsende Läsionen sichtbar. In den RNAi-Pflanzen ist dies an manchen Inokulationsstellen ebenfalls zu beobachten (Pfeile). Andere Stellen zeigen nur die bereits beschriebene starke Nekrosenbildung (s.o., Abb. 41). WT= Wildtyp; U2= ineffektive RNAi-Linie; B4, Q2, H1= *StSYR1*-RNAi; (überbelichtet dargestellt).

Der *P. infestans*-Infektionsphänotyp in den *StSYRI*-RNAi-Pflanzen wurde in einem ersten Experiment elektronenmikroskopisch untersucht. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hause (Uni Halle) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass von *P. infestans* penetrierte *StSYRI*-RNAi-Zellen keinen lokal fokussierten Vesikeltransport zur Penetrationsstelle aufweisen, der in Zellen der Kontrollen deutlich sichtbar war. Damit korrelierte, dass in den RNAi-Zellen kaum Zellwand-Auflagerungen (Papillen) an den Stellen der Penetration nachzuweisen waren (Abb. 45). Dieser Phänotyp war für alle gefundenen direkten Penetrationsstellen repräsentativ.

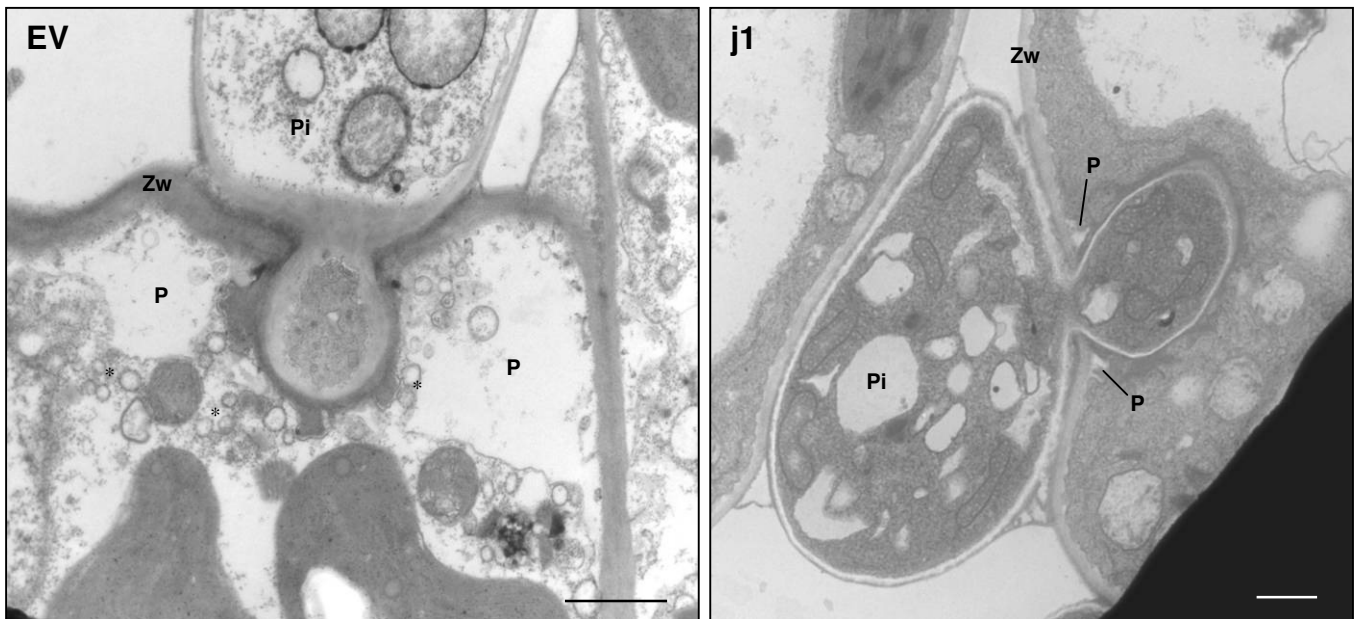


Abb. 45. Elektronenmikroskopische Ansicht der *P. infestans*-Infektion (*StSYRI*-RNAi).

Pflanzen wurden mit einer *P. infestans* Sporensuspension inokuliert ($1 \cdot 10^5$ Sp. / ml; 10 μ l). Vier Tage später wurden Proben für die Elektronenmikroskopie genommen. Dargestellt sind Ausschnitte aus Pflanzenzellen, die von *P. infestans* penetriert werden. EV= Leerer Vektor; j1= *StSYRI*-RNAi; P= Papille; * = Vesikel-Akkumulation; Pi= *P. infestans*; Zw= Zellwand; Balken= 1 μ m.

3.6. Die Rolle des Kandidatengens *StSNAP33* für die basale Resistenz

Das Gen *StSNAP33* wurde aus den Daten der TIGR-Microarrays (s. 3.2) für eine funktionelle Analyse ausgewählt. Nach *Psm*- und *Pep-13*-Infiltration wird es in Blättern exprimiert (s. Abb. 17 und 18). Die Namensgebung des uncharakterisierten Gens erfolgte aufgrund seiner Homologie zu *AtSNAP33* (*SYNAPTOSOME-ASSOCIATED PROTEIN 33*) aus *Arabidopsis*. *AtSNAP33* ist während der Pathogenabwehr an der lokal fokussierten Sekretion beteiligt (Kwon *et al.*, 2008). Dieser gesamte Sekretionsmechanismus wurde zuerst im menschlichen Organismus in präsynaptischen Nervenzellen-Terminalen beschrieben (Scheller, 1995; Chapman *et al.*, 1994). Das menschliche Homolog ist *HsSNAP25*, das in zwei Isoformen vorliegt (*HsSNAP25a*, *HsSNAP25b*). Um Homologie-Vergleiche zwischen den einzelnen SNAP-Proteinen anstellen zu können, wurde die Kartoffel-Sequenz (TIGR-EST *StMDC73*) translatiert (Abb. 46). In Tab. 4 sind die Vergleichsergebnisse dargestellt.

Abb. 46. TIGR EST-Sequenz (*StMDC73*) und translatierte Proteinsequenz des *StSNAP33*-Gens. Die Translation erfolgte online (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>).

StMDC73 (Start- und Stop-Codon sind markiert, 921 bp)

```
GCTTAACATCCCCTGCTCCACGCTTCTTCTTTACCATTTACAAATATCCCCTATAGGCAATATCTATACCCACTT
CACATTATAGTTTCTTAGATTTTTTCTACAATTCATCTTCTTCGGATTTTCAGATAATTTCTTAATCTAGGAGGT
CCATCCCTGTGGGATTACTTTCTATCTATAAAAAAAATGTCATGGTCTTAAGAAGTCTCCTTTACATTGGAGTGCT
AGAAAAAATCTGTGGATCCTGTGGCCATAGTAATTTCTGGATCAAATCCCTTTGATTCTGACGATGAGTCAGAC
AAGAAGCAAACCTGTAACCATCCAGGAGAATATCATCGGAGCCTTCTGCAGCTACCCCAAATTTGAGTACAAAC
CCTTTTGATGATGATGAAATTAAGAGACTCCTTCACATGCTTACTCAACTTCGACGGCAAGAAATAAATAACAAG
AACGATTTCCGGGAGTCTGGAGGATTTGAGAACCAACTGTAGACGAGTTGGAAAACATATGCCGTCTACAGGTCA
GAAGAGACTACAAAATCTGTTAATAGCTGCCTGAAGATTGCACAAGACATGCGAGAGGATGCAACAAAAACTTTG
ATAACTTTACATCAACAGGGAGAACAATAACAAGAACCCATATGACTGCAGCAGATATCGACCATGATCTTAGC
CGGGGTGAAAAACTCTTGGGGAGTCTTGGAGGCATATTTCTAAGACTTGGAAAGCCAAAGACAAGTCGCCCAATT
ACAGGGCCCCTTATCACAAAGATGTCAGATGATCCAGTTCAAAGAAGGGGCAACCACTTGGAGCAGAGGGAGAAA
TTAGGATTGAGCTCTGCACCCAAGGCAAGGTCAAGTTCAAGGACACCACCCCAAGGCCTACAAATGCTCTGCAG
AAAGTTGAGGCCGAGAAAGCAAAGCAAGATGATGGACTGTCAGAACTCAGCGATCTGTTGGGGGAGCTCAAGAAT
ATGGCTGTTGACATGGGATCTGAAATTGAGAGGCATAAAGAGGCATTGGATCATACTGAACAGGATGTTGATGAG
CTTGGTACCAGAGTTCAAGGGGCCAACCGGAGGATTCGGCGCTTGCTTGAAAGTAAACCAGTAGAGACATCTGT
TGTGGCAACCTATTAATGAGCTTTCAGACGTTAACTTCAGTTCTTTATCATTTCAACTATTCTTGAGTTTTCCAC
AAATGCTTCTTTCTGTAATTTTATGTTACTTTGTATTATAATTTTACAATATTCTATGACAGTAA
```

Translatierte Sequenz (307 Aminosäuren)

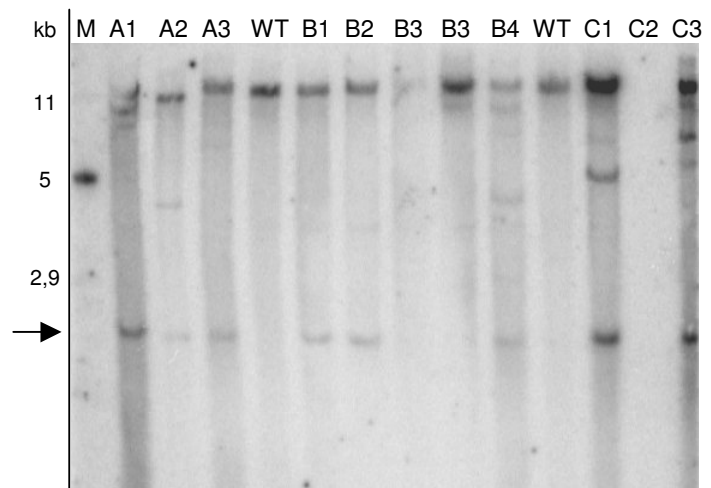
```
MHGLKKSPLHWSARKKSVDPAHNSNSGPNPFDSDDESDDKQTVKPSRRIS
SEPSAATPNLSTNPFDDDEIKETPSHAYSTSTARNKYKNDFRESGGFENQT
VDELENYAVYRSEETTKSVNSCLKIAQDMREDATKTLITLHQQGEQITRT
HMTAADIDHDLRGEKLLGSLGGIFSKTWKPKTSRPITGPVITRMSDDPV
QRRGNHLEQREKLLGLSSAPKARSSSRTPPEPTNALQKVEAEKAKQDDGL
SELSDLLGELKNMAVDMGSEIERHKEALDHTEQDVDELGTRVQGANRRI
RRLLGK Stop
```

Tab. 4. Identitätsvergleich von StSNAP33-Homologen. Dargestellt sind die Homologie-Vergleiche zwischen StSNAP33 und den Homologen auf Proteinebene in %-Identität. StSNAP33 (TIGR StMDC73), AtSNAP33 (NP_200929), HsSNAP25a (NP_003072), HsSNAP25b (NP_570824) Verwendet wurde das Programm NCBI Blast 2 Sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

Vergleich	% Identität
StSNAP33-AtSNAP33	67
StSNAP33-HsSNAP25a	21
StSNAP33-HsSNAP25b	21

Zur Analyse der Funktion von StSNAP33 in Kartoffel wurden Wildtyp-Désirée-Pflanzen mit einem *pHELLSGATE8-StSNAP33-RNAi*-Konstrukt transformiert. Mittels Southern-Methodik wurden die regenerierten Pflanzen auf Integration des RNAi-Konstruktes ins Genom analysiert. Dargestellt ist ein Beispiel-Blot (Abb. 47).

Abb. 47. Nachweis der Integration des *StSNAP33-RNAi*-Konstruktes ins Pflanzen-genom. Genomische DNA wurde mit dem Enzym BamHI verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und dann mit einem radioaktiv markierten BamHI-*pHELLSGATE8*-Fragment hybridisiert. Zu erwarten ist eine Bande bei ca. 1700 bp (Pfeil). Die Linien A1, A2, A3, B1, B2, B4, C1 und C3 sind demnach Transformanten. Der Wildtyp (WT) zeigt diese Bande nicht. M= Marker, A1-C3= *StSNAP33-RNAi*.



Die regenerierten Pflanzen mit Integration des RNAi-Konstruktes wurden dann auf Erde angezogen. Nach *Psm*-Infiltration von Blättern wurden Proben zum Nachweis der reduzierten Pathogen-induzierten *StSNAP33*-mRNA-Akkumulation genommen (Abb. 48). Die Linien A1, B1, C1, C3, D1, D3, F4, H1 und L3 zeigen eine deutlich verminderte mRNA-Akkumulation. In den Linien F3, G4 und K3 ist kein RNAi-Effekt nachweisbar.

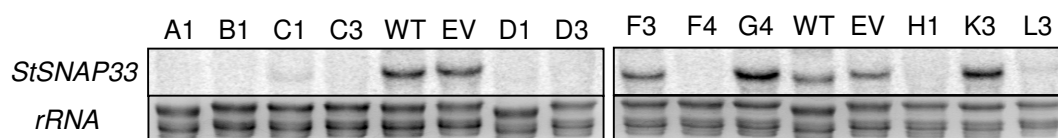


Abb. 48. *StSNAP33*-Transkript-Akkumulation in den *StSNAP33-RNAi*-Pflanzen nach *Psm*-Infiltration. Acht Stunden nach Infiltration einer *Psm*-Suspension wurden Proben zur RNA-Extraktion genommen. Auf Nylon-Membranen übertragene RNA wurde mit einer *StSNAP33*-spezifischen Sonde hybridisiert. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; andere Linien= potentielle RNAi-Linien.

Wie auch die *StSYRI*-RNAi-Pflanzen (s. Abb. 35) zeigen die *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen einen Seneszenz-Phänotyp (Abb. 49). Die Symptome bei beiden Linien sind ähnlich. Unter den gegebenen Anzuchtbedingungen erfolgt die Ausprägung bei den *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen jedoch ca. eine Woche später (vier Wochen nach Pflanzung). An den Blattspitzen beginnt eine chlorotische Aufhellung mit kleinen nekrotischen Bereichen. Diese Symptome breiten sich innerhalb weniger Tage über das gesamte Blatt aus, das dann an der Spitze beginnend eintrocknet und schließlich von der Pflanze abgeworfen wird. Die einzelnen Linien zeigen dabei eine unterschiedlich starke Ausprägung. Nach ca. fünf bis sechs Wochen entwickeln sich dann auch auf den Sprossen nekrotische Bereiche, die im Vergleich zu den *StSYRI*-RNAi-Pflanzen teilweise etwas schwächer ausgeprägt sind (Abb. 50).

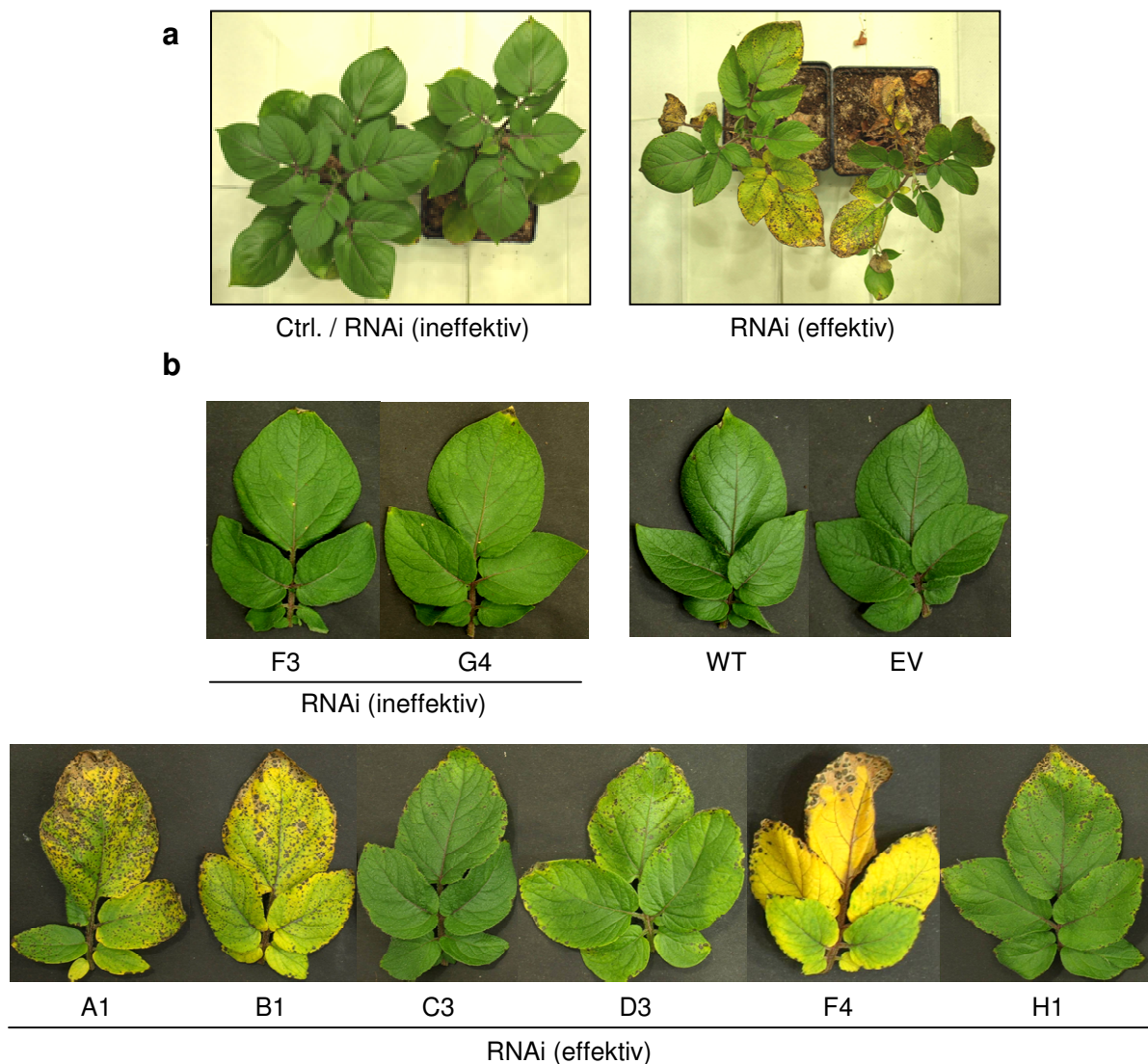
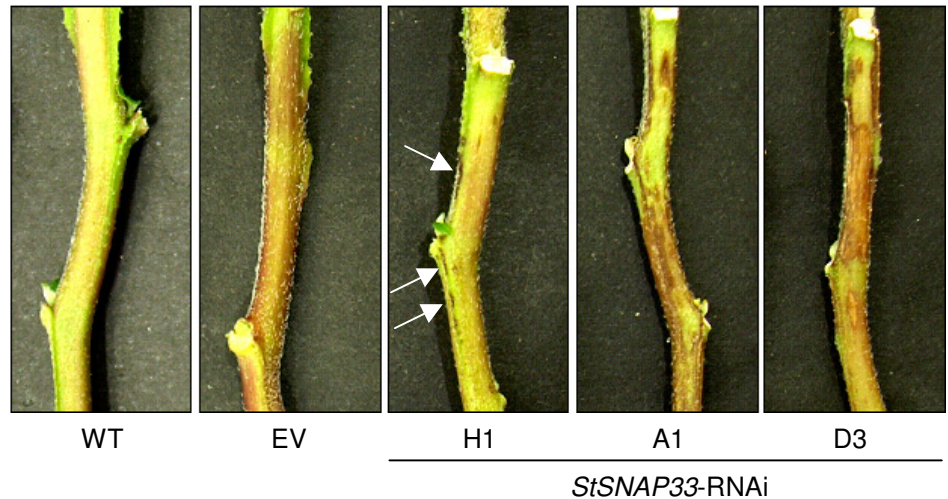


Abb. 49. Seneszenz-Phänotyp unbehandelter *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen.

Pflanzen wurden sechs Wochen auf Erde angezogen. Zu diesem Zeitpunkt beginnen bereits in den Kontrollen (ineffektive RNAi-Pflanzen, WT, EV) die äußersten Blattspitzen zu altern. Dargestellt ist in a) eine Pflanzenansicht von oben, in b) jeweils das vierte Blatt einzelner Linien (gezählt ab der Sprossspitze). A1 bis H1= RNAi-Pflanzen; F3, G4= ineffektive RNAi-Pflanzen (vgl. Abb. 48); WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor.

Abb. 50. Nekrosenbildung an den Sprossen der *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen.

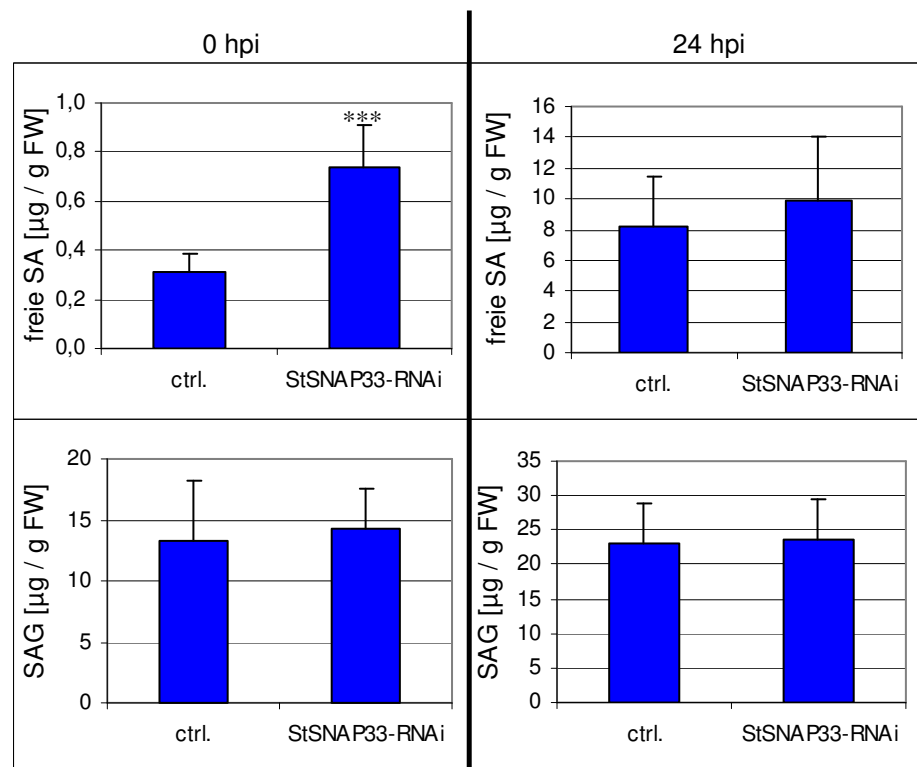
Phänotyp sechs Wochen alter Sprosse (überbelichtet dargestellt). WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor; *StSNAP33*-RNAi= repräsentative Ausprägungen der Spross-Nekrosen. Pfeile im ersten RNAi-Beispiel kennzeichnen kleine Nekrosen.



Da die Symptom-Ausprägung in den *StSYR1*-RNAi- und *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen fast identisch war, sollten auch in den *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen die Gehalte an freier SA und SAG bestimmt werden. Dazu wurden Pflanzen mit Pep-13 infiltriert und 24 Stunden später Proben genommen. In Abb. 51 sind die Ergebnisse der Analyse dargestellt. Die *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen weisen signifikant erhöhte Mengen an freier SA in unbehandelten Proben auf. Nach der Pep13-Infiltration (24 hpi) akkumulieren die Kontroll- und RNAi-Pflanzen gleich viel freie SA, ein statistisch signifikanter Unterschied lässt sich nicht mehr feststellen. Die SAG-Mengen in *StSYR1*-RNAi- und Kontrollpflanzen unterscheiden sich zu beiden analysierten Zeitpunkten nicht.

Abb. 51. SA- und SAG-Bestimmung in *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen nach Pep-13-Infiltration.

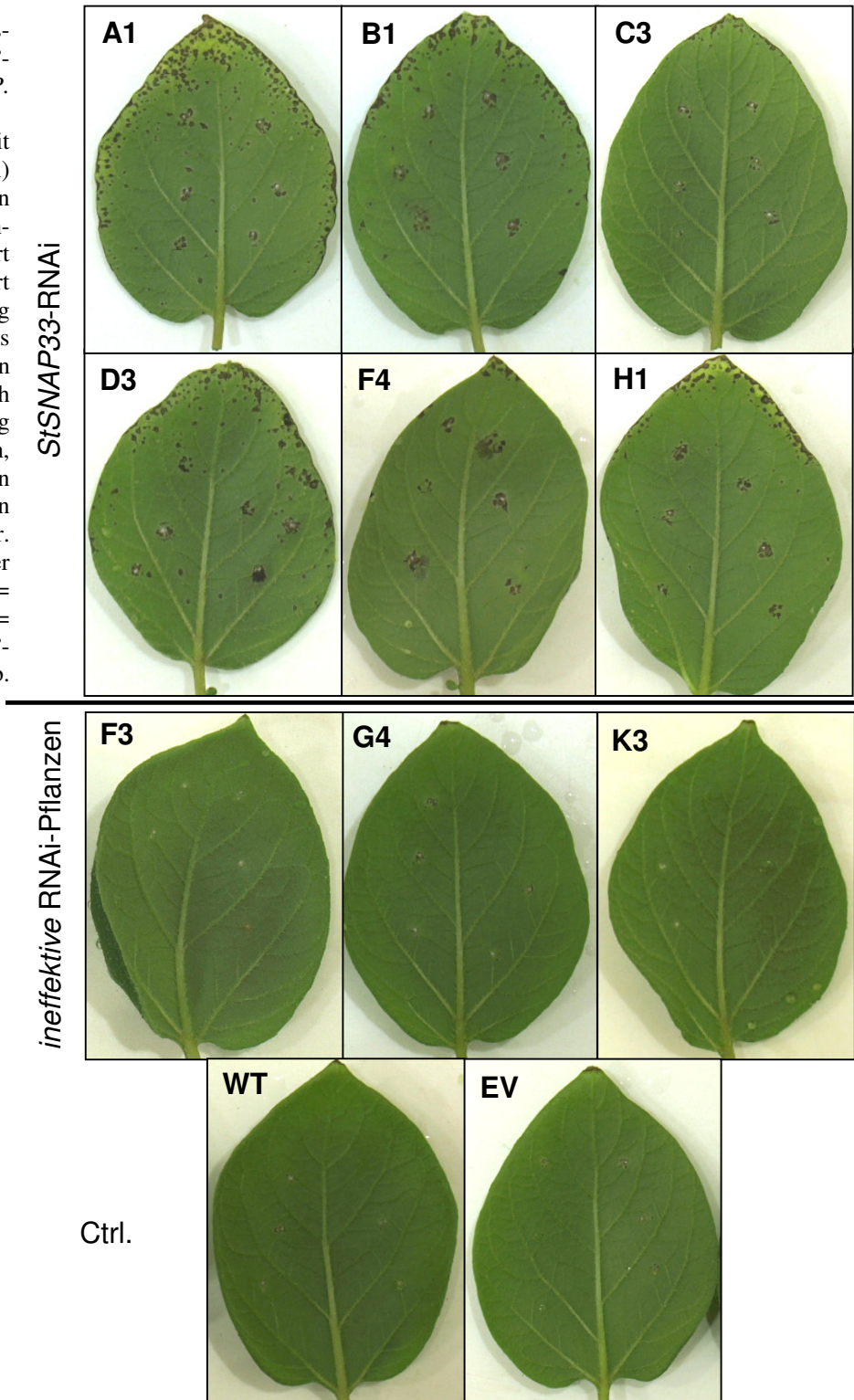
Aus Probenmaterial von unbehandelten und Pep-13-infiltrierten (24 hpi) Pflanzen wurden die freie (SA) und die glycosylierte Salicylsäure (SAG) extrahiert und die Mengen pro Gramm Frischmasse bestimmt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. ctrl. = WT, EV, *StSNAP33*-RNAi= A1, B1, C3, D3, F4, H1. WT= Wildtyp; EV= Leerer Vektor. (***) $p = 0,0005$.



In Infektionsexperimenten mit einer wenig aggressiven *P. infestans*-Kultur zeigten sich in den *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen vergleichbare Symptome wie in den *StSYRI*-RNAi-Pflanzen. Eine deutlich ausgeprägtere Nekrosenbildung an und zwischen den Inokulationsstellen wurde deutlich (Abb. 52).

Abb. 52. Infektionsphänotyp der *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen nach *P. infestans*-Inokulation.

Pflanzen wurden mit wenigen Tropfen (10 µl) einer schwach aggressiven *P. infestans*-Sporensuspension inokuliert ($1 \cdot 10^5$ Sp./ml). Diese führt kaum zu Symptombildung in den Kontrollen. Fotos entstanden vier dpi. In den RNAi-Pflanzen ist deutlich die starke Nekrosenbildung an den Inokulationsstellen, sowie außerhalb derselben (beginnend an den Blattspitzen), sichtbar. WT= Wildtyp, EV= Leerer Vektor; A1-H1= *StSNAP33*-RNAi; F3-K3= ineffektive *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen (vgl. Abb. 48).



Mit normal aggressiven Kulturen wurde in weiteren Experimenten das *P. infestans*-Wachstum molekular mittels Realtime-PCR bestimmt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen *StSNAP33*-RNAi- und Kontrollpflanzen festgestellt werden (Abb. 53). Wie auch bei den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen zeigte sich vier Tage nach Inokulation in den einzelnen Experimenten eine hohe Variabilität der Infektionsstärke, die gesamt betrachtet aber keinen Unterschied erkennen lässt.

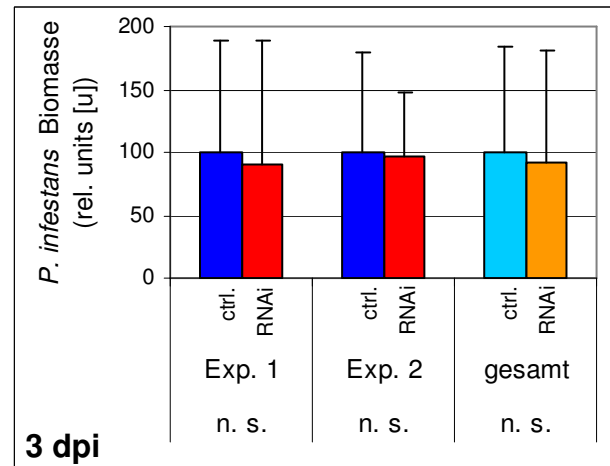
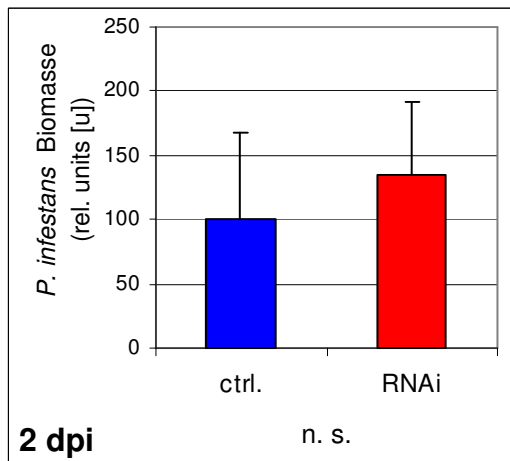
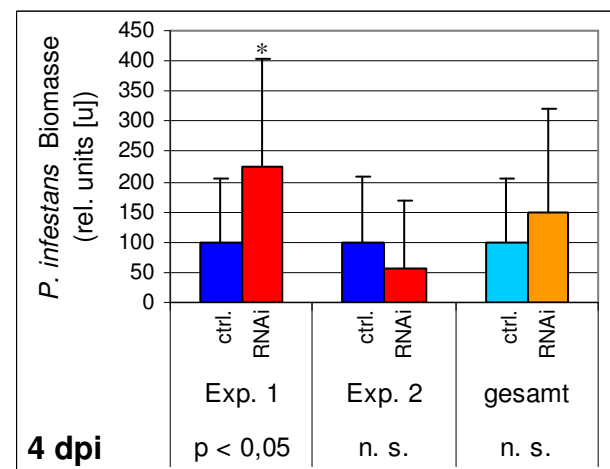


Abb. 53. *P. infestans*-Infektion der *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen.

Zweieinhalb Wochen alte Pflanzen wurden mit *P. infestans* inokuliert ($1 \cdot 10^5$ Sp./ml, 10 µl). Nach zwei, drei und vier Tagen wurden in unabhängigen Experimenten Proben für die Realtime-PCR-basierte *P. infestans*-Biomassebestimmung genommen. Die dargestellten Ergebnisse sind jeweils auf die Kontrollen bezogen: zwei dpi ein, drei und vier dpi zwei unabhängige Experimente. Ctrl.= Wildtyp, Leerer Vektor + RNAi (ineffektiv) F3, G4, K3; *StSNAP33*-RNAi= s. Abb. 48. Die statistische Auswertung erfolgte jeweils unabhängig in den einzelnen Experimenten, sowie für die gesamten Daten eines Zeitpunktes (* $p < 0,05$; n. s.= nicht signifikant).



4. Diskussion

4.1. Die Rolle des 9LOX-Weges in der basalen Resistenz gegen *P. infestans*

StLOX1 und *St9DES* werden während der Pathogenabwehr in Kartoffel exprimiert (Göbel *et al.*, 2001; Stumpe *et al.*, 2001; Kolomiets *et al.*, 2000) und ihre Produkt-Metabolite akkumulieren in signifikanten Mengen (Göbel *et al.*, 2003, 2002, 2001; Eschen-Lippold *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde in den *StLOX1*-RNAi- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen gezeigt, dass die Herabsetzung des StLOX1-Weges und damit die Reduktion der StLOX1-vermittelten Lipid-Peroxidation bzw. die reduzierte Bildung der Divinylether nicht zu einem abweichenden Infektionsphänotyp nach *P. infestans*-Inokulation führt. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass makroskopisch in den *StLOX1*-RNAi-Pflanzen nach Infiltration von *P. syringae* pv. *maculicola* keine veränderte Zelltod-Ausprägung festzustellen ist (Göbel *et al.*, 2003). Daran anknüpfend wurde die Infektion mikroskopisch analysiert. Dazu wurden *StLOX1*-RNAi-, *St9DES*-RNAi- und Kontroll-Pflanzen in Sterilkultur mit *P. infestans* inokuliert und infizierte Blätter zu verschiedenen Zeitpunkten mit Trypanblau und Anilinblau angefärbt. In den Trypanblau-angefärbten Blattproben konnte das Hyphenwachstum von *P. infestans* direkt nachvollzogen werden, da sowohl die Hyphen, als auch tote Pflanzenzellen angefärbt werden (Keogh *et al.*, 1980). Der Infektionsverlauf unterlag einer großen Variabilität, die auch innerhalb eines Experimentes zum Ausdruck kam (Abb. 7). Diese Variabilität fand sich in allen getesteten Linien und ließ keine signifikanten Unterschiede erkennen. In den Anilinblau-angefärbten Proben konnte indirekt der Infektionsverlauf nachvollzogen werden, da unter UV-Licht Anilinblau-angefärbte Callose fluoresziert (Currier und Strugger, 1956). Callose-Ablagerungen, die bereits vor über hundert Jahren beobachtet wurden, über deren Funktion aber lange Zeit diskutiert wurde (Aist, 1976), dienen der Zellwandverstärkung gegen Pathogene (Hardham *et al.*, 2007). Sie werden von der betroffenen Zelle lokal an der Stelle des versuchten Eindringens eines Pathogens auf der Zellwand aufgelagert. In allen getesteten Linien fanden sich vergleichbare Mengen und Verteilungen von Callose, Unterschiede waren nicht zu erkennen. Es lässt sich daraus schlussfolgern, dass der 9LOX-Weg nicht für die Akkumulation von Callose nötig ist. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten in (Eschen-Lippold, 2004). Mit einer Realtime-PCR gestützten Methode wurde hier auf molekularer Ebene die Biomasse von *P. infestans* in den *StLOX1*- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den RNAi-Pflanzen und den entsprechenden Kontrollen detektierbar ist. Zusammengefasst zeigen die mikroskopischen Untersuchungen und die Biomasse-

Bestimmungen, dass die Reduktion des StLOX1-Weges bzw. die veränderten Oxylin-Muster in den *StLOX1*-RNAi- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen keinen Einfluss auf die Infektion mit *P. infestans* haben. Die basale Resistenz in diesem Pathosystem ist nicht verändert.

In anderen Pathosystemen korreliert ein Verlust der 9LOX-Aktivität mit veränderter basaler Resistenz. So zeigen Mandelsamen während der Reifung einen Entwicklungsspezifischen Verlust der 9LOX-Induzierbarkeit, der mit einer erhöhten Suszeptibilität gegen *Aspergillus carbonarius* einhergeht (Mita *et al.*, 2007). In Mais führt das *Silencing* einer 9LOX zu erhöhter Nematoden-Reproduktion (*Meloidogyne incognita*) (Gao *et al.*, 2008).

Neben der Funktion in der Pathogenabwehr ist für 9/13LOX-Produkte auch eine Rolle in der Reproduktion und Toxin-Produktion von Pilzen beschrieben. So können 9/13-Hydroperoxide z.B. in *Aspergillus* spp. die Sporulation induzieren, ohne sich negativ auf das vegetative Wachstum auszuwirken (Calvo *et al.*, 1999). Auch das *Silencing* einer Mais-9LOX (*ZmLOX3*) übt sich negativ auf die Konidien-Entwicklung von *Fusarium verticillioides* und *Colletotrichum graminicola*, sowie die Toxin-Produktion von *Fusarium verticillioides* aus (Gao *et al.*, 2007). Deshalb wird von einer Rolle als Suszeptibilitätsfaktoren der 9/13LOX-Produkte ausgegangen (Brodhagen und Keller, 2006). Für *P. infestans* ist dagegen bekannt, dass verschiedene Oxyline, darunter 9/13-Hydroperoxide, eine inhibierende Wirkung auf die Sporenkeimung und das Myzelwachstum haben (Prost *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 1999). Eine Rolle als Suszeptibilitätsfaktoren während der Infektion von Kartoffelpflanzen ist für diesen Vertreter der *Oomyceten* also unwahrscheinlich. Das *Silencing* der *ZmLOX3* in Mais führt neben den oben genannten Effekten auch zu einer erhöhten Resistenz gegen *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola* und *Exserohilum pedicellatum*. Dies könnte wiederum mit dem Fehlen wichtiger im 9LOX-Weg produzierter Suszeptibilitätsfaktoren erklärt werden. Möglicherweise stellt diese erhöhte Resistenz aber auch einen sekundären Effekt dar, der durch die mit der Reduktion des 9LOX-Weges einhergehende leichte Induktion der SA-, JA- und Et-Akkumulation und dadurch aktivierte Abwehrantworten bedingt sein könnte (Gao *et al.*, 2008; Isakeit *et al.*, 2007). In den eigenen Experimenten finden sich ebenfalls erhöhte Mengen an 13LOX- und auch autoxidativen Produkten in den *StLOX1*-RNAi-(*RI*)-Pflanzen (Göbel *et al.*, 2003; diese Arbeit). Auch hier lässt sich also nicht ausschließen, dass diese Deregulation einen spezifischen Effekt des 9LOX-*Silencing* überlagert und möglicherweise als Sekundäreffekt die Abwehrantwort gegen die getesteten Pathogene (s. 4.3.) beeinflusst.

4.2. Die Rolle des 9LOX-Weges in der R-Gen-vermittelten Resistenz gegen *P. infestans*

In dieser Arbeit wurden *StLOX1*-RNAi-Pflanzen im resistenten Hintergrund Désirée-*RI* hergestellt. Diese Resistenz kann vom verwendeten *P. infestans*-Isolat 208m2 nicht überkommen werden (Eschen-Lippold, 2004). Die regenerierten Pflanzen wurden biochemisch zur Erstellung eines Oxylinprofils untersucht. Aus den Daten ist ersichtlich, dass die Akkumulation der 9LOX-abhängigen Produkte stark herabgesetzt ist. Damit geht, wie auch in den *StLOX1*-RNAi-Pflanzen im Désirée-Wildtyp-Hintergrund (Göbel *et al.*, 2003), eine erhöhte Akkumulation der 13LOX-Weg-Produkte und der autoxidativen Produkte einher (s. A.5.). In den acht durchgeführten Infektionsexperimenten mit *P. infestans* zeigte sich, dass es eindeutig nicht zu einem Bruch der Resistenz, also Pathogen-Wachstum in den *StLOX1*-RNAi-*RI*-Pflanzen, kommt.

Die bereits zur Verfügung stehenden *St9DES*-RNAi-*RI*-Pflanzen zeigten ebenfalls keinen Bruch der Resistenz in *P. infestans*-Infektionsexperimenten. Im Pathosystem Kartoffel – *P. infestans* ist der 9LOX-Weg bzw. die antimikrobielle Wirkung der im 9LOX-Weg synthetisierten Metabolite also nicht entscheidend für die Ausbildung der R-Gen-vermittelten Rassen-spezifischen Resistenz. Der einzige Fall in der Literatur, der zeigt, dass der Verlust einer 9LOX-Aktivität tatsächlich zu einem Bruch der Resistenz gegen ein Pathogen führt, liegt in Tabak vor (Rancé *et al.*, 1998). Die Autoren veröffentlichten, dass ein 9LOX (*NtLOX1*)-*antisense*-Ansatz zu einem Verlust der Resistenz gegen ein avirulentes Isolat von *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (*Ppn*) führt. In einer nachfolgenden Publikation führte eine Überexpression der *NtLOX1* in suszeptiblen Pflanzen zu erhöhter Resistenz gegen *Ppn*. Als Maß für die Resistenz zogen die Autoren in beiden Publikationen die ausgebildeten Krankheitssymptome an adulten Pflanzen heran, in der zweiten noch zusätzlich die Überlebensrate inokulierter Sämlinge (Mène-Saffrané *et al.*, 2003). Das visuelle Bonitieren von Symptomen stellt dabei eine nicht unbedingt verlässliche Methode dar. Eigene Arbeiten im Pathosystem Kartoffel – *P. infestans* führten zu dem Ergebnis, dass die Läsionsgröße nicht mit dem Pathogenwachstum übereinstimmen muss (Halim *et al.*, 2007). In einer weiteren Publikation über das Pathosystem Tabak – *Ppn* wurde gezeigt, dass während der inkompatiblen Interaktion durch Aktivität einer 9-Divinylether-Synthase (*NtDES1*) die korrespondierenden Produkte Colnel- und Colnelensäure gebildet werden (Fammartino *et al.*, 2007). Diese 9DES-Aktivität wird in den *NtLOX1*-*antisense*-Pflanzen nach Infektion nicht induziert. Die Autoren mutmaßen demnach, dass für die Ausbildung der Resistenz gegen *Ppn* die Divinylether essentiell sind. In einer früheren Arbeit hatten die Autoren gezeigt, dass

während der inkompatiblen Interaktion 9LOX-Transkripte schneller akkumulieren und die Enzym-Aktivität schneller und stärker nachweisbar ist als in der kompatiblen Interaktion (Véronési *et al.*, 1996). Vergleichbare 9LOX Expressions- und Aktivitätsdaten finden sich im Pathosystem Baumwolle - *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Jalloul *et al.*, 2002). In Raps zeigten Metabolit-Bestimmungen, dass nach *Peronospora parasitica*-Inokulation in einer inkompatiblen Interaktion schneller höhere Konzentrationen der 9LOX-Weg-Produkte TriHOE1 (9,12,13-Trihydroxy-10(E)-Octadecensäure) und TriHOE2 (9,12,13-trihydroxy-10(E),15(Z)-octadecensäure) akkumulieren als in der kompatiblen Interaktion (Walters *et al.*, 2005). In Arabidopsis wurde lediglich die 9LOX-mRNA-Akkumulation nach Infiltration mit virulenten und avirulenten *Pseudomonas syringae*-Stämmen gezeigt, die im Falle der avirulenten Bakterien schneller erfolgt (Melan *et al.*, 1993). In Tabak führt eine Infektion mit *Ralstonia solanacearum* dagegen nur in der inkompatiblen Interaktion zu einer 9LOX-mRNA-Akkumulation und Enzym-Aktivität (Cacas *et al.*, 2005). Wird ein virulentes *R. solanacearum*-Isolat inokuliert, kommt es zu keiner Stimulierung des 9LOX-Weges. Ein etwas anderes Bild zeigt sich im Pathosystem Kartoffel - *P. infestans*. Hier kommt es in der inkompatiblen und der kompatiblen Interaktion zu einer 9LOX-Transkript-Akkumulation und Enzym-Aktivität. Dies erfolgt in der inkompatiblen Interaktion zwar schneller, in der kompatiblen Interaktion aber genauso stark ausgeprägt (Kolomiets *et al.*, 2000). In verschiedenen Pflanzenarten ist also eine Expression von 9-Lipoxygenasen bzw. deren Aktivität nach Pathogenbefall nachgewiesen. Dies spricht für einen konservierten Abwehrrelevanten Mechanismus. Die aufgezeigten Unterschiede in der Regulation und Aktivität des 9LOX-Weges in den einzelnen Pathosystemen kann einerseits auf Pflanzenspezies-typischen Unterschieden der hormonellen Regulation beruhen. Andererseits ist davon auszugehen, dass verschiedene Pathogene unterschiedliche Effektor-vermittelte Strategien entwickelt haben, diese Pflanzenantwort zu modulieren.

Die Zusammenhänge im komplexen Oxylin-Weg erschweren eine Analyse einzelner Syntheseweige, da die Reduktion eines Zweiges zu vermehrter Produktakkumulation der anderen Syntheseweige führt. Wie bereits angeführt, wurde z. B. für den 9LOX-Weg in Kartoffel und Mais gezeigt, dass dessen Reduktion zu vermehrter 13LOX-Weg-Induktion führt (Göbel *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2008; s. auch 4.1.). Das Gegenbeispiel erbringen Tomatenpflanzen, die das JA-Synthese-Enzym AOC überexprimieren. Hier korreliert die verstärkte JA-Akkumulation mit stark verminderten 9-HOD-Mengen des 9LOX-Weges (Miersch *et al.*, 2004).

4.3. Die Rolle des 9LOX-Weges in der Interaktion mit bodenbürtigen Pilzen

Die *StLOXI*-RNAi-Pflanzen wurden auch in Infektionsexperimenten mit bodenbürtigen Pathogenen verwendet, da die Rolle der StLOX1 für die Pathogenabwehr in unterirdischen Organen getestet werden sollte. Bei den verwendeten Pathogenen handelte es sich um Vertreter der Echten Pilze. Darunter waren zwei Kartoffel-Pathogene, *Verticillium dahliae* und *Colletotrichum coccodes*, sowie das Bohnen-Pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*.

In allen drei Fällen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen *StLOXI*-RNAi- und Kontroll-Pflanzen feststellen. Daraus folgt, dass der 9LOX-Weg in Kartoffel auch in der basalen Resistenz gegen diese drei bodenbürtigen Pathogene nicht von essentieller Bedeutung ist. Interessanterweise zeigten die inokulierten Pflanzen in den Experimenten mit den beiden *Colletotrichum*-Spezies eine Wachstumsförderung. Dieser Unterschied in der Wuchshöhe der Pflanzen war unabhängig vom Pflanzengenotyp zu beobachten, d.h. er trat in den RNAi- und den Kontroll-Pflanzen auf. Die Reduktion des 9LOX-Weges lässt sich also nicht mit der Wuchshöhe korrelieren. Außerdem waren in den Experimenten mit beiden *Colletotrichum*-Vertretern in keinem Fall Krankheitssymptome sichtbar. Eine Interaktion zwischen Pflanze und Pilz scheint aufgrund der veränderten Wuchshöhe aber stattgefunden zu haben. Eine Mykorrhizierung kann dabei ausgeschlossen werden, da keine *Colletotrichum*-Spezies als dazu in der Lage beschrieben wurde. In der Literatur finden sich verschiedene Studien zur Pflanzenwuchs-Förderung durch nicht-mykorrhizierende Pilze. Eine breit angelegte Infektionsstudie mit acht verschiedenen Vertretern der Gattung *Colletotrichum* und neun verschiedenen Pflanzen aus fünf Familien zeigte, dass in vielen Interaktionen nicht nur eine Infektion (Krankheit), sondern auch Kommensalismus und sogar Mutualismus das Ergebnis sein kann (Redman *et al.*, 2001). Viele Pflanzen wurden symptomlos kolonisiert. Die Autoren zeigten allerdings, dass sich *C. coccodes* und *C. lindemuthianum* in keinem Fall kommensalistisch oder mutualistisch verhielten. *C. lindemuthianum* war nur in der Lage, Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) zu kolonisieren (Ergebnis: Krankheit), alle anderen Pflanze stellten Nichtwirte dar. *C. coccodes* hat dagegen ein breiteres Wirtsspektrum und befiel Kürbis, Gurke, Wassermelone (*Cucurbitaceae*), Aubergine, Tomate, Paprika (*Solanaceae*) und Erdbeere (*Rosaceae*). In allen genannten Fällen kam es zur Krankheitsausbildung, die restlichen Pflanzen, Vertreter der *Poaceae* und *Fabaceae*, stellten keine Wirte dar. Ein mutualistischer wuchsfördernder Effekt in den eigenen Experimenten mit Kartoffelpflanzen scheint dennoch vorzuliegen, zumal die angeführte Studie keine Kartoffelpflanzen einbezog.

Aus Pfefferminze konnte ebenfalls ein endophytisch lebender Pilz isoliert werden, der die Pflanzen symptomlos von den Wurzeln bis in die Blätter kolonisiert (Mucciarelli *et al.*, 2002). Dieser Vertreter der Ascomycota ist noch nicht näher systematisch klassifiziert. In einer folgenden Arbeit zeigten die Autoren, dass kolonisierte Pflanzen drastisch im Wuchs und der Entwicklung gefördert werden (Mucciarelli *et al.*, 2003). Ein weiteres bekanntes Beispiel für einen wuchsfördernden nicht-mykorrhizierenden Pilz stellt *Piriformospora indica* dar, der in verschiedenen Pflanzen, darunter Arabidopsis, eine Wachsförderung induziert (Peškan-Berghöfer *et al.*, 2004; Varma *et al.*, 1999).

Ein möglicher Grund für die Wachsförderung könnte eine bessere Versorgung der Pflanzen mit bestimmten Nährstoffen sein, die vom Pilz aus dem Boden freigesetzt werden. Für *Aspergillus* spp. und *Penicillium* spp. wurde z. B. veröffentlicht, dass sie Phosphate in großen Mengen aus verschiedenen Bodensubstraten freisetzen, die dann von den assoziiert lebenden Pflanzen direkt aufgenommen werden können (Reyes *et al.*, 2006; Arcand und Schneider, 2006; Whitelaw *et al.*, 1999). Eine Studie aus Australien zeigte, dass auf alkalischen Böden, die generell eine schlechte Nährstoff-Verfügbarkeit aufweisen, *Penicillium* spp. KC6-W2 signifikant das Wachstum von Weizen erhöht. Dieser Wachstumseffekt wurde auf allen drei getesteten Böden nachgewiesen und korrelierte auf zwei Böden mit signifikant erhöhter Phosphat-Aufnahme der Pflanzen (Wakelin *et al.*, 2007). Experimente mit verschiedenen Isolaten von *Aspergillus awamori* und *Penicillium citrinum*, beides Phosphat-freisetzende Pilze, führten bei Kichererbsen zu signifikant höherem Pflanzenwuchs, bis zu dreifach erhöhter Samenzahl und verdoppeltem Samengewicht (Mittal *et al.*, 2008).

Diese Beispiele und die eigenen Ergebnisse zeigen, dass die pilzliche Pflanzenwachsförderung keine Ausnahme darstellt. Unter manchen vorherrschenden Bedingungen scheint eine symptomlose Kolonisierung durch sonst pathogene Pilze die bevorzugte oder einzig mögliche Art der Interaktion darzustellen (Redman *et al.*, 2001).

4.4. Die Rolle des 9LOX-Weges in der chemisch-induzierten Resistenz gegen *P. infestans*

Ein weiterer Ansatz zur Analyse der Rolle des 9LOX-Weges in der Resistenz gegen *P. infestans* war die chemische Induktion eines Resistenzzustandes in den suszeptiblen *StLOX1*-RNAi-Pflanzen. Die Applikation von BABA im Wurzelbereich führt in vielen Pathosystemen zu erhöhter Resistenz (Conrath *et al.*, 2006; Cohen, 2002; Jakab *et al.*, 2001). Dies korreliert in vielen Fällen mit einer stärkeren bzw. schnelleren Transkriptakkumulation Abwehr-

relevanter Gene nach Pathogen-Inokulation im Vergleich zu nicht vorbehandelten Kontrollpflanzen.

In Vorexperimenten mit Wildtyp-Pflanzen wurde die Auswirkung einer BABA-Applikation auf die Infektion mit *P. infestans* untersucht. Dabei wurde auch auf RNA-Ebene untersucht, ob während der Infektion in den vorbehandelten Pflanzen eine schnellere oder stärkere Abwehrgen-Expression erfolgt. Dies konnte in keinem Fall bestätigt werden. In den nicht-vorbehandelten Pflanzen war die Expression der selektierten Gene stets stärker. Dies lässt sich mit erhöhtem sichtbarem Zelltod aufgrund stärkerer Infektion in diesen Pflanzen korrelieren. In folgenden Experimenten mit den suszeptiblen *StLOX1*- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen zeigte sich, dass in allen RNAi-Linien die Induktion der Resistenz durch BABA möglich und in ihrer Ausprägung mit der in den Kontrollpflanzen zu vergleichen war. Der 9LOX-Weg hat demnach also auch für die Ausbildung der chemisch induzierten Resistenz in Kartoffel keine maßgebliche Funktion.

In Arabidopsis wurde gezeigt, dass die BABA-vermittelte Resistenz gegen *Plectosphaerella cucumerina* nicht von SA, JA, und Ethylen abhängig ist. Dies zeigten Mutantenstudien mit *coi1* (*coronatine-insensitive 1*), *ein2* (*ethylene-insensitive 2*), *npr1* (*non-expressor of PR genes 1*) und *NahG*-exprimierenden Pflanzen. Dagegen ist die Induktion des Resistenzzustandes von einem intakten ABA-Syntheseweg und Callose-Akkumulation abhängig, wie Versuche mit *aba1* (*ABA-deficient 1*; Zeaxanthin-Epoxidase), *abi4* (*ABA-insensitive 4*; ERF/AP2-Transkriptionsfaktor) und *pmr4* (*powdery mildew-resistant 4*; Callose-Synthase) zeigten (Ton und Mauch-Mani, 2004). Callose-Inhibitorstudien in der gleichen Publikation zeigten, dass auch die BABA-vermittelte Resistenz gegen *Alternaria brassicicola* von Callose abhängt. Die Autoren testeten allerdings nicht, ob *pmr4*-Mutanten ein erhöhtes Pathogenwachstum erlauben. Für *Peronospora parasitica* wurde ebenfalls getestet, welche Signalwege in der BABA-induzierten Resistenz eine Rolle spielen. Mutantenstudien mit *jar1* (*JA-resistant 1*), *etr1* (*ethylene-resistant 1*), *npr1* und *NahG*-Pflanzen zeigten, dass der JA-, Et- und SA-Weg wahrscheinlich keine Funktion haben (Zimmerli *et al.*, 2000). Die Ausbildung der Resistenz gegen die Pathogene *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000) und *Botrytis cinerea* ist dagegen von SA und NPR1 abhängig, wie Infektions-Experimente mit *NahG*- und *npr1*-Pflanzen verdeutlichten (Zimmerli *et al.*, 2001, 2000). Im Pathosystem Wein – *Plasmopara viticola* zeigten Inhibitor-Studien, dass die BABA-induzierte Resistenz von der Callose-Bildung und der JA-Synthese abhängig ist, nicht jedoch von SA (Hamiduzzaman *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass verschiedene Signalwege zur Ausbildung der chemisch-induzierten Resistenz in Pflanzen

gegen unterschiedliche Pathogene nötig sind. Eine weiterführende Studie der in Kartoffel gegen *P. infestans* nötigen Signalkomponenten für die BABA-induzierte Resistenz wurde noch nicht veröffentlicht.

4.5. Die Rolle des 9LOX-Weges in abiotisch-induziertem oxidativen Stress

Mit den *StLOX1*-RNAi-Pflanzen wurden Versuche mit Starklicht, mit Schwermetallhaltigem Anzuchtmedium (CuSO₄) und mit Wasser- bzw. Trockenstress durchgeführt. Alle vier Behandlungen führten zu signifikanten Stress-Symptomen in den Versuchspflanzen. Leider konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse im Falle der Wasserstress- bzw. Trockenstress-Experimente erzielt werden. Die Starklicht- und Schwermetall-Versuche zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen *StLOX1*-RNAi- und Kontrollpflanzen. Mit diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob 9LOX-Aktivität unter oxidativen Stressbedingungen eine Schutzfunktion vor unkontrollierter Schädigung hat. Diese Überlegung beruht auf der Mutmaßung von (Keppler und Novacky, 1987), dass die 9-Lipoxygenase-Aktivität eine pflanzliche Antwort auf die Radikal-vermittelte Freisetzung von Membran-Fettsäuren darstellt. (Mueller, 2004) stellte schließlich die Hypothese auf, dass während oxidativen Stresses die 9LOX-vermittelte Lipidperoxidation eine Kanalisierung schädlicher oxidativer Energie in einen gesteuerten Prozess darstellt. Damit würde den Pflanzen ermöglicht, die Lipid-Peroxidation kontrolliert und ohne unnötige Membranschädigungen ablaufen zu lassen. Das würde bedeuten, dass ein Fehlen von 9LOX-Aktivität in einer oxidativen Stress-Situation unkontrollierte Membranschädigungen zur Folge hätte, die den normalen pflanzlichen Metabolismus stark beeinträchtigen und sogar zum Zelltod führen könnten. Im Falle der *StLOX1*-abhängigen Lipidperoxidation konnte diese Hypothese nicht belegt werden, da die *StLOX1*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen physiologisch nicht stärker beeinträchtigt waren.

In diesem Zusammenhang zeigte eine Untersuchung mit Tabakpflanzen unter biotisch oxidativer Stresseinwirkung (Elicitor- und *Pseudomonas*-Infiltration), dass die Lipid-Peroxidation im Licht hauptsächlich von reaktiven Sauerstoff-Spezies abhängt und eine 9LOX-Beteiligung weitgehend zu vernachlässigen ist. Im Dunkeln dagegen ist die Lipid-Peroxidation größtenteils auf 9LOX-Aktivität zurückzuführen (Montillet *et al.*, 2005). Alle selbst durchgeführten Experimente wurden unter normalem Tag-Nacht-Regime durchgeführt, da die Behandlungen über mehrere Tage andauerten. Eine Wiederholung im Dauer-Dunkeln könnte hier möglicherweise zu anderen Ergebnissen führen, wobei die physiologische

Relevanz solcher künstlichen Bedingungen fraglich ist bzw. im Falle der Starklichtversuche natürlich nicht möglich ist.

Generell betrachtet weisen korrelative Daten darauf hin, dass 9-Lipoxygenasen während der biotisch und abiotisch induzierten Lipid-Peroxidation, die mit massiven Schäden an zellulären Membranen einhergeht, nachweisbar eine Rolle spielen (Cacas *et al.*, 2005; Göbel *et al.*, 2003; Rustérucci *et al.*, 1999). Für das Modell von Mueller (s. o.) spricht auch, dass die während des hypersensitiven Zelltods nach Pathogeninfektion primär akkumulierenden 9-Oxylipine präferentiell enzymatischen Ursprungs sind. In Elicitor-behandelten Kartoffel-Zellkulturen liegt der Anteil an enzymatisch gebildeter 9-HOD (9-Hydroxyoctadecadiensäure) bei über 90 % (Göbel *et al.*, 2001). Elicitor-behandelte Tabakpflanzen akkumulieren zu 90 % enzymatisch gebildete 9-HOT (9-Hydroxyoctadecatriensäure) (Rustérucci *et al.*, 1999). In *Xanthomonas*-infiltrierten Baumwollpflanzen sind ca. 80 % der gebildeten 9-HOT und 9-HOD enzymatischen Ursprungs (Jalloul *et al.*, 2002).

4.6. Charakterisierung der *StAOS3*-RNAi-Pflanzen

Zur weiteren Charakterisierung des 9LOX-Weges in Kartoffel wurden transgene Pflanzen hergestellt, deren 9-Allenoxid-Synthase (9AOS)-Transkriptakkumulation mittels RNA-Interferenz reduziert ist. Dieses Enzym wird in allen unterirdischen Organen exprimiert (Knollen, treibende Knollenaugen, Wurzeln, Stolone) und katalysiert die Umsetzung von 9-Hydroperoxiden zu Ketolen (Stumpe *et al.*, 2006). Die Transformanten zeigten eine effiziente Reduktion der 9AOS-Expression. Die Auswirkung auf das Oxylipinmuster soll nach der Etablierung der Ketol-Analytik durch Frau Dr. Göbel (Uni Göttingen) untersucht werden. Entsprechend den Daten der *StLOX1*-RNAi-(*RI*)-Pflanzen wird es interessant zu sehen, ob durch die verminderte Expression der *StAOS3* mehr Substrat für die restlichen 9LOX-Zweige oder den 13LOX-Weg zur Verfügung steht.

In zwei Experimenten zur Knollenbildung zeigten die RNAi-Pflanzen eine leicht erhöhte Knollenausbeute als die Kontrollen. Für die gänzlich ausbleibende Knollenbildung der Wildtyppflanzen im zweiten Experiment gibt es keine Erklärung. Hier sind weitere Experimente zur Klärung nötig.

Widersprüchliche Daten existieren möglicherweise bezüglich dem Expressionsverhalten der *StAOS3*. (Kongrit *et al.*, 2006) klonierten eine zur *StAOS3* zu 99,2 % identische 9AOS (Aminosäure-Sequenz) aus Knollenaugen-cDNA. Diese zeigte ein

anderes Expressionsverhalten. Sie konnte in treibenden Knollenaugen, Blüten und Spross, nicht aber in Knollen und Wurzeln nachgewiesen werden., die *StAOS3* dagegen nur in unterirdischen Organen (s. o.). Ob es sich bei beiden tatsächlich um das gleiche Enzym handelt, ist nicht bekannt.

Andere Enzyme des 9LOX-Weges in Kartoffel sind in Blättern und Zellkultur durch Pathogen-Behandlung induzierbar (Göbel *et al.*, 2001; Stumpe *et al.*, 2001; Kolomiets *et al.*, 2000). Die *StAOS3*-Expression ist dagegen nicht Pathogen- und wundinduzierbar in Blättern (Stumpe *et al.*, 2006), eine direkte Funktion in der Abwehr oberirdischer Pflanzenteile gegen Pathogene scheint somit nicht gegeben. Die Autoren spekulieren, dass die *StAOS3* in unterirdischen Organen an der Abwehr von bodenbürtigen Pathogenen beteiligt sein könnte. Ein Hinweis dafür stammt aus Tomate. Das nächst-homologe Gen der *StAOS3* aus Tomate ist *LeAOS3*, das ebenfalls für eine 9AOS kodiert. (Itoh *et al.*, 2002) zeigten, dass ihre Expression in Tomatenwurzeln von *JAI1* (JA-INSENSITIVE 1), dem Tomaten-Homolog zu *COI1*, abhängig ist und erwähnen einen Verlust der Expression in der Tomaten-JA-Biosynthesemutante *def1* (*defenceless 1*; Fußnote „3“, S. 46057). Die Autoren spekulieren, dass diese JA-vermittelte *LeAOS3*-Expression mit der Pathogenabwehr in Wurzeln zusammenhängen könnte. In diesem Modell käme der 9AOS dann durch gezielte JA-vermittelte Expression eine Rolle während der JA-abhängigen Ausprägung der Resistenzantwort gegen bodenbürtige Pathogene zu (Itoh *et al.*, 2002). Infektionsexperimente mit den eigenen *StAOS3*-RNAi-Pflanzen und Wurzelpathogenen bzw. Knollen-Infektionen, z. B. mit *P. infestans*, könnten diese Frage klären.

Eine andere spekulative Funktion der *StAOS3* betrifft eine Rolle im Zucker-Metabolismus (Stumpe *et al.*, 2006). Die Autoren zeigten, dass die *StAOS3* in Amyloplasten und Leucoplasten vor allem der unterirdischen Organe lokalisiert ist. Auch eine Entwicklungs-spezifische Funktion der *StAOS3* wäre möglich. Hierfür spricht die starke Expression in den wachsenden unterirdischen Organen (Stumpe *et al.*, 2006; Kongrit *et al.*, 2006; Itoh *et al.*, 2002).

4.7. Charakterisierung der *StSYR1*-RNAi- und *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen

Die aus den TIGR-Microarrays ausgewählten Kandidatengene *StSYR1* und *StSNAP33* wurden in Kartoffel mittels RNA-Interferenz in ihrer Transkript-Akkumulation nach Pathogen-Behandlung herabgesetzt. Die Transformanten zeigten einen mit Nekrosen-Ausbildung verbundenen Seneszenz-ähnlichen Phänotyp. Damit korrelierte, dass die

endogenen Gehalte an SA in unbehandelten RNAi-Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen erhöht waren. Diese phänotypischen und biochemischen Daten aus Kartoffel sind mit denen der *syp121-syp122*-Doppelmutante aus *Arabidopsis* vergleichbar (s. 1.4.). *AtSYP121* und *AtSYP122* kodieren für Syntaxine, die an Vesikelfusions-Prozessen beteiligt sind (Sutter *et al.*, 2006; Sanderfoot *et al.*, 2000). Mutationen in einem von beiden Genen führen dabei zu keinem sichtbaren Wuchsphänotyp. Allerdings zeigt die *syp121-syp122*-Doppelmutante nach 2-3-wöchiger Anzucht starke Blattnekrosen, verlangsamtes Wachstum und sehr stark erhöhte endogene SA-Mengen (Zhang *et al.*, 2007; Assaad *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse sprechen für eine funktionale Redundanz zwischen beiden Proteinen. Der durch das verlangsamte Wachstum in der Doppelmutante hervorgerufene Zwergwuchs kann durch das Einführen von Mutationen in SA-Synthese- und Signalgenen (z. B. *sid2*, *eds1*) und Expression des *NahG*-Gens partiell revertiert werden (Zhang *et al.*, 2007).

Das zu *StSNAP33* homologe *Arabidopsis*-Protein *AtSNAP33* wurde in Interaktionsstudien mit dem Cytokinese-spezifischen Syntaxin *KNOLLE* (*AtSYP111*) identifiziert (Heese *et al.*, 2001). Die Autoren zeigten, dass *AtSNAP33* in der gesamten Pflanze exprimiert wird, vor allem in stark proliferierenden Geweben. Innerhalb der Zellen liegt es Membran-assoziiert vor. Der in dieser Arbeit gefundene Wuchsphänotyp der *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen kommt in ähnlicher Weise auch in der *Arabidopsis snap33*-T-DNA-Insertionsmutante zur Ausprägung. Diese Pflanzen zeigen Zwergwuchs, spontane Nekrosenbildung und teilweise verfrühtes Absterben (Heese *et al.*, 2001).

Die *Arabidopsis*-Mutanten *acd1 / 2* (*accelerated cell death*) und *lsd1* bis *7* (*lesions simulating disease*) zeigen einen zu den genannten Symptomen vergleichbaren Phänotyp. Sie entwickeln spontane Nekrosen, haben erhöhte endogene SA-Mengen, exprimieren konstitutiv PR1 und zeigen gegen bestimmte Pathogene eine erhöhte Resistenz (Weymann *et al.*, 1995; Greenberg *et al.*, 1994; Dietrich *et al.*, 1994). Die Expression von *NahG* revertiert in den *lsd*-Mutanten diese Symptome (Hunt *et al.*, 1997; Weymann *et al.*, 1995) und zeigt damit möglicherweise einen Zusammenhang zwischen Wuchsphänotyp und SA-Deregulation auf, der auch der Grund für den Seneszenz-Phänotyp in den *StSYRI*-RNAi- und *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen sein könnte. In *lsd2 / 4* beeinflusst *NahG* die spontane Nekrosenbildung allerdings nicht. Dies spricht für eine SA-unabhängige Nekrosen-Ausbildung in diesen Mutanten (Hunt *et al.*, 1997).

Der veränderte *P. infestans*-Infektions-Phänotyp in den *StSYRI*-RNAi- und *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen spricht für eine Beteiligung beider Gene an der Pathogenabwehr in Kartoffel. Die *StSYRI*-RNAi-Pflanzen wiesen eine signifikant erhöhte Resistenz gegen *P.*

infestans auf, die in den *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen nicht nachweisbar war. Das unveränderte Pathogenwachstum würde gegen eine Rolle von *StSNAP33* in der Pathogenabwehr sprechen. In Anbetracht des makroskopisch sichtbaren Infektionsphänotyps kann gemutmaßt werden, dass Redundanz vorliegt und ein weiteres Protein *StSNAP33* partiell funktionell ersetzen kann. In *Arabidopsis* konnte für beide Homologe eine Funktion in der Ausprägung der Abwehrantwort gezeigt werden. So wurde die *syp121*-Mutante ursprünglich in einem Screen mit dem Nichtwirts-Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) aufgrund erhöhter Penetrationshäufigkeit als *pen1* (*penetration 1*) isoliert (Collins *et al.*, 2003). Die gleiche Arbeitsgruppe hatte vorher bereits *ROR2* (*REQUIRED FOR MLO-RESISTANCE 2*) in Gerste identifiziert (Freialdenhoven *et al.*, 1996). Dieses Gen hat eine Funktion in der basalen Resistenzantwort gegen ein virulentes *Bgh*-Isolat, wie eine erhöhte Penetrationshäufigkeit in der *ror2*-Mutante zeigte. *AtSYP121* und *HvROR2* kodieren für funktionell identische Syntaxine. Dies wurde in Komplementationsstudien mit *AtSYP121* in *ror2*-Gerstepflanzen gezeigt (Collins *et al.*, 2003). Eine elektronenmikroskopische Analyse der Infektion von *Arabidopsis* mit *Bgh* zeigte in der *syp121*-Mutante, dass die Papillenbildung verzögert stattfindet (Assaad *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang ergab ein eigenes Experiment mit *P. infestans*-infizierten Pflanzen, dass keine fokussierte Vesikel-Akkumulation und nur eine rudimentäre Papillenbildung in den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen stattfindet. Es wäre interessant zu sehen, ob die *Arabidopsis syp121-syp122*-Doppelmutante diesen Effekt ebenfalls zeigt, der in der Einzelmutante durch die Redundanz beider Gene möglicherweise nicht zur Ausprägung kommt. Expressionsdaten des *Arabidopsis AtSNAP33*-Gens auf RNA-Ebene deuteten ebenfalls auf eine Beteiligung an der Pathogenabwehr hin. (Wick *et al.*, 2003) zeigten, dass nach avirulenter und virulenter Pathogenbehandlung *AtSNAP33* exprimiert wird. Damit korrelierte die Akkumulation des SA-Markerproteins PR1. Die Autoren untersuchten deshalb eine mögliche SA-Abhängigkeit der *AtSNAP33*-Expression. Mutantenstudien mit *eds5* und *sid2*, die beide keine SA akkumulieren, zeigten tatsächlich eine partielle Abhängigkeit von SA. Diese machte sich durch eine deutlich schwächere, dennoch induzierbare Expression nach Pathogen-Behandlung bemerkbar. Interessanterweise war die Expression jedoch unabhängig von NPR1 (Wick *et al.*, 2003).

Kürzlich konnte dann gezeigt werden, dass sowohl *AtSYP121* als auch *AtSNAP33* funktional im gleichen Mechanismus während der Pathogenabwehr eine Rolle spielen. (Kwon *et al.*, 2008) zeigten, dass sowohl *AtSYP121* als auch *AtSNAP33* zusammen mit *AtVAMP721 / 722* *in vitro* einen ternären SNARE-Komplex bilden. Außerdem co-lokalisieren *AtSYP121*, *SNAP33* und *VAMP722* *in vivo* während der Infektion mit *Bgh* lokal

an der Stelle der versuchten Penetration. Diese Daten sprechen für eine biologische Relevanz des *in vitro* gefundenen SNARE-Komplexes für die Ausprägung der Abwehrantwort durch spezifische Vesikelfusions-Prozesse. In Gerste konnten die Autoren vergleichbare Ergebnisse zeigen. In einem Kandidatengen-Ansatz wurde HvSNAP34 als nötig für die Ausprägung der Penetrationsresistenz gegen *Bgh* und als Homologes zu AtSNAP33 identifiziert (Collins *et al.*, 2003). In Datenbank-Analysen konnte dann noch ein Gerste-Homolog zu AtVAMP721 / 722 identifiziert werden (*HvVAMP721*) (Kwon *et al.*, 2008). *In vivo* zeigten FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)-basierte Studien in der gleichen Arbeit eine Interaktion zwischen ROR2, HvSNAP34 und HvVAMP721. Außerdem wurde in Lokalisationsexperimenten die Akkumulation der drei Proteine lokal an den *Bgh*-Penetrationsstellen nachgewiesen. Diese Daten aus Arabidopsis und Gerste, sowie die eigenen Daten aus Kartoffel, zeigen, dass die Vesikelfusions-basierte Abwehrantwort in Monokotyledonen und Dikotyledonen konserviert ist.

Wie oben angesprochen, wurde AtSNAP33 ursprünglich als Interaktionspartner von KNOLLE identifiziert. Zusammen mit KEULE (AtSec11), einem *SNARE-associated element*, ist KNOLLE während der Cytokinese an Vesikelfusions-Prozessen an der entstehenden Zellplatte in Höhe der Teilungsebene involviert (Waizenegger *et al.*, 2000). *knolle*- bzw. *keule*-Mutationen führen zu lethalen Entwicklungsdefekten im Embryo- bzw. Sämlingsstadium (Assaad *et al.*, 1996; Lukowitz *et al.*, 1996). Die Interaktion von SNAP33 und KNOLLE in Arabidopsis, sowie die Wachstumsdefekte in der *snap33*-Mutante (und den eigenen *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen) deuten neben der Funktion für die Pathogenabwehr auf eine Entwicklungs-spezifische Rolle von SNAP33 hin.

Diese Daten sprechen für redundante Funktionen der an der Sekretion beteiligten Proteine. Ein weiteres Indiz hierfür sind die beiden Proteine AtVAMP721 und 722. Liegt eines von beiden mutiert vor, wird das andere verstärkt exprimiert. Außerdem führte ein RNAi-Ansatz, der die Transkript-Akkumulation beider Homologe effizient reduzierte, zu spontaner Nekrosenbildung und Zwergwuchs (Kwon *et al.*, 2008). Dieser Phänotyp entspricht dem der *syp121-syp122*-Doppelmutante (Zhang *et al.*, 2007) und könnte auf überlappende Funktionen hindeuten.

Aus Tabak wurde ebenfalls ein zu AtSYP121-homologes Syntaxin isoliert (NtSYR1). Dieses hat eine Funktion in der Stomata-Schließung. Seine Inaktivierung führt zu einem Verlust der ABA-vermittelten Ionenströme über K⁺- und Cl⁻-Kanäle, die der Stomata-Schließung vorausgehen (Leyman *et al.*, 1999). NtSYR1 hat zusätzlich eine Entwicklungsspezifische Funktion. So zeigen NtSYR1-überexprimierende Pflanzen verlängerte Wurzeln.

Dagegen führt die Expression eines verkürzten NtSYR1-Proteins, dessen Produkt mit der Funktion des endogenen NtSYR1 interferiert, zu einer Inhibierung des Wurzelwachstums und einer veränderten Zell- und Blattmorphologie (Geelen *et al.*, 2002). Diese Entwicklungsspezifischen Defekte sind wiederum mit den Daten aus Arabidopsis (*syp121-syp122*-Doppelmutante) und den eigenen Daten aus Kartoffel (*StSYR1*-RNAi und *StSNAP33*-RNAi) vergleichbar. Berichte über eine Beteiligung von NtSYR1 an der Pathogenabwehr existieren derzeit nicht. Allerdings führt Verwundung lokal zu einer transienten Expression (Leyman *et al.*, 2000). Eine Verbindung zur Pathogenabwehr könnte über die PAMP-induzierte Stomata-Schließung hergestellt werden. (Melotto *et al.*, 2006) zeigten, dass die bakteriellen PAMPS Flagellin und LPS zu einer ABA-vermittelten Schließung der Stomata führen. An diesem Prozess könnte NtSYR1 maßgeblich beteiligt sein, schließlich führt seine Inaktivierung zu einem Verlust der ABA-vermittelten Ionenströme in den Schließzellen, die der Stomata-Schließung vorausgehen (Leyman *et al.*, 1999).

In Abb. 54 ist ein mögliches Schema dargestellt, das die eigenen Ergebnisse in Verbindung mit abgeleiteten Daten aus der Literatur zu einem Gesamtbild der Funktion von *StSYR1* und *StSNAP33* in Kartoffel für die Entwicklung und die Pathogenabwehr zusammenfasst.

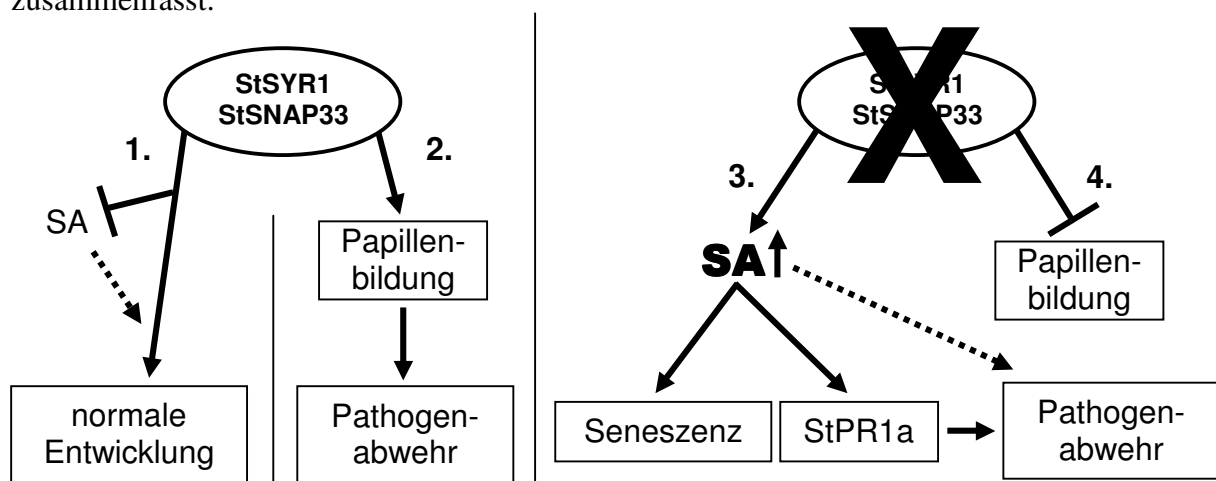


Abb. 54. Schematische Darstellung der möglichen Funktionen von *StSYR1* und *StSNAP33*. Details s. Text.

StSYR1 und *StSNAP33* erfüllen Aufgaben während der normalen Pflanzenentwicklung (1.) und der Pathogenabwehr (2.). Während der Pflanzenentwicklung kommt ihnen dabei eine Rolle als negative Regulatoren des SA-Signals zu (s. auch Zhang *et al.*, 2007). Dies zeigten die eigenen Daten aus den *StSYR1*-RNAi- und den *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen, sowie die aus der Arabidopsis *syp121-syp122*-Doppelmutante. Hier finden sich in allen genannten Linien erhöhte SA-Mengen, die mit einer konstitutiven PR1-Expression (in *StSNAP33*-RNAi nicht gezeigt) und einem verfrühten Seneszenz-Phänotyp bzw. Zwergwuchs korrelieren (3.). Für eine entwicklungs-spezifische Funktion sprechen auch die Phänotypen in Tabak (inaktiviertes NtSYR1: veränderte Blattmorphologie und Wurzellänge) und der Arabidopsis *snap33*-Mutante (Seneszenz- und Zwergwuchs-Phänotyp), sowie die Interaktion von Arabidopsis SNAP33 mit dem Cytokinese-spezifischen Syntaxin KNOLLE. In der Literatur finden sich viele Belege für einen Zusammenhang zwischen endogenem SA-Gehalt und Pflanzenwuchs (z. B. Jirage *et al.*, 2001). Dabei ist die zu Grunde liegende Regulation nicht bekannt (1.). Bei einem Verlust der Funktion von *StSYR1* bzw. *AtSYR121* ist während Pathogenbefall die Papillenbildung inhibiert bzw. verzögert. Die Abwehr-spezifische Rolle ist also gestört (4.). In Kartoffel führt dies nicht zu einer erhöhten Infektion mit *P. infestans*, da die stark erhöhten endogenen SA-Mengen und die daraus resultierende konstitutive *StPR1a*-Expression, möglicherweise zusammen mit einem noch unbekanntem SA-abhängigen Signal, eine verstärkte Abwehrreaktion hervorrufen (3.). Diese führt zu der überschießenden Zelltodreaktion, die sich auch durch Spontan-Nekrosen zwischen den Inokulationsstellen bemerkbar macht und *P. infestans* während der biotrophen Phase der Infektion an der weiteren Ausbreitung hindert.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle des StLOX1-Weges für die Pathogenabwehr in Kartoffel untersucht. In Infektionsexperimenten mit *Phytophthora infestans* und suszeptiblen Pflanzen der Sorte Désirée, die eine herabgesetzte Expression der Pathogen-induzierbaren Enzyme StLOX1 und St9DES aufweisen (*StLOX1*-RNAi- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen), wurde auf mikroskopischer Ebene der Infektionsphänotyp untersucht. In beiden Fällen ist die Ausprägung der Abwehrantworten und des Zelltodes in den transgenen Pflanzen unverändert. Eine mögliche Rolle während der Rasse-Sorten-spezifischen Resistenz gegen *P. infestans* wurde in *StLOX1*-RNAi- und *St9DES*-RNAi-Pflanzen untersucht, die das *RI*-Resistenzgen tragen. Hier zeigten die transgenen Pflanzen ebenfalls keine veränderte Resistenz. Der StLOX1-Weg hat also in Kartoffel für die Ausprägung der basalen und der *R*-Gen-vermittelten Resistenz gegen *P. infestans* keine entscheidende Funktion. Das gleiche gilt für den chemisch induzierten Resistenzzustand gegen *P. infestans* in den suszeptiblen RNAi-Pflanzen. Auch Versuche mit anderen Pathogenen und abiotische Behandlungen, die zu oxidativem Stress führen, ließen keine Funktion des StLOX1-Weges in der Abwehr- bzw. der Entgiftungsantwort erkennen.

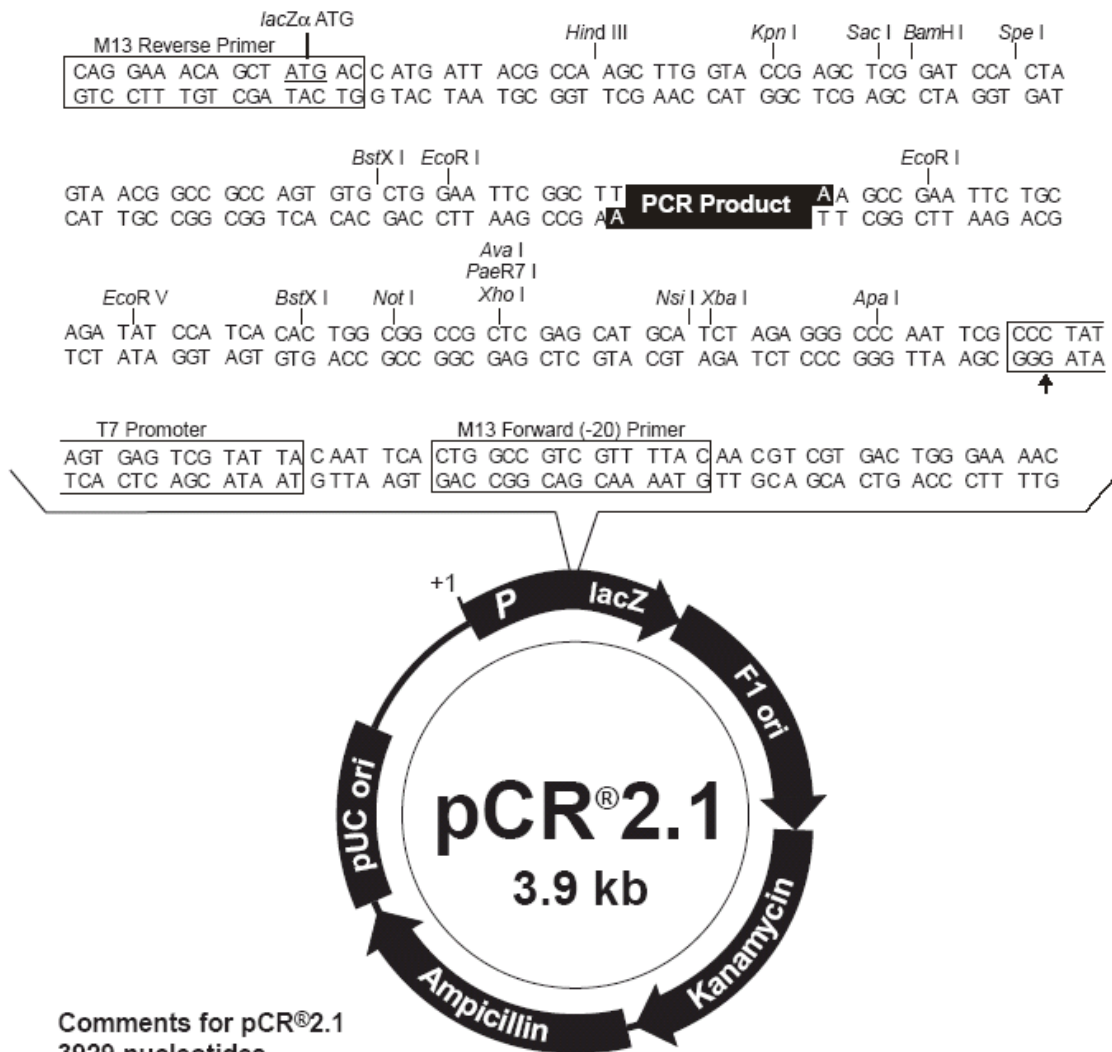
In Microarray-Experimenten wurden die Kandidatengene *StSYR1* und *StSNAP33* als Pathogen-induzierte Markergene der Abwehrantwort in Kartoffel identifiziert. Transgene Pflanzen, die RNAi-Konstrukte gegen jeweils eins der beiden Gene exprimieren, zeigten einen verfrühten Seneszenz-ähnlichen Phänotyp und akkumulierten erhöhte Mengen an Salicylsäure. Damit ging eine konstitutive StPR1a-Expression in den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen einher. In Infektionsexperimenten mit *P. infestans* zeigten beide RNAi-Linien einen veränderten Infektionsphänotyp, der sich durch Nekrosenbildung lokal an und zwischen den Inokulationsstellen bemerkbar machte. In den *StSYR1*-RNAi-Pflanzen korrelierte dieser Phänotyp mit erhöhter Resistenz. Auf mikroskopischer Ebene zeigten die *StSYR1*-RNAi-Pflanzen einen Verlust der lokal fokussierten Vesikel-Akkumulation an der Stelle des versuchten Eindringens durch *P. infestans*. Daraus resultierend blieb die Papillen-Bildung an den Penetrationsstellen weitgehend aus. Der Seneszenz-Phänotyp und die veränderte Infektionsausprägung in den beiden RNAi-Linien deuten darauf hin, dass StSYR1 und StSNAP33 funktionell an Entwicklungs-spezifischen Mechanismen und der Pathogenabwehr beteiligt sind.

A. Anhang



A.1. Schematische Darstellung der RNAi-Kassette des pHellsgate8-Vektors

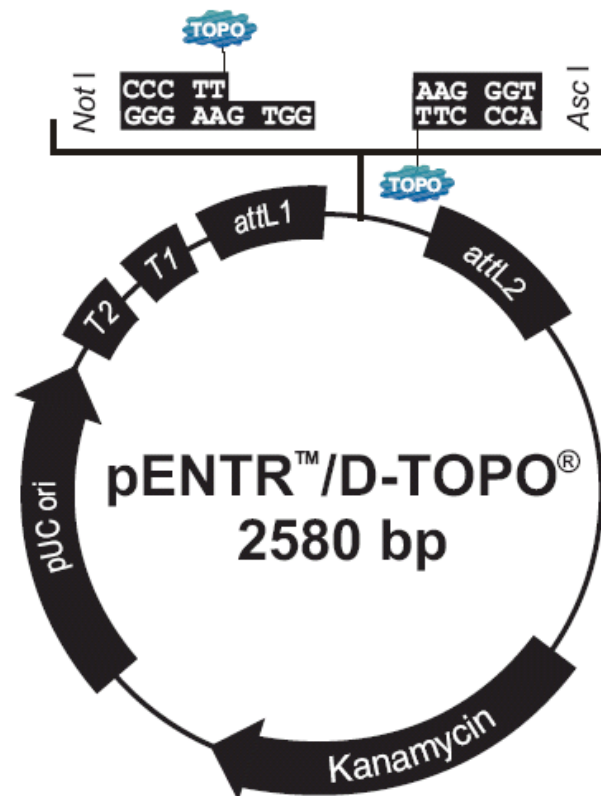
A.2. Vektorkarten.



Comments for pCR®2.1
3929 nucleotides

- LacZα gene: bases 1-545
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- T7 promoter: bases 362-381
- M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
- f1 origin: bases 546-983
- Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
- Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
- pUC origin: bases 3134-3807

pCR2.1-Vektor
Invitrogen, Karlsruhe



Comments for pENTR™/D-TOPO®
2580 nucleotides

rrnB T2 transcription termination sequence: bases 268-295

rrnB T1 transcription termination sequence: bases 427-470

M13 forward (-20) priming site: bases 537-552

attL1: bases 569-668 (c)

TOPO® recognition site 1: bases 680-684

Overhang: bases 685-688

TOPO® recognition site 2: bases 689-693

attL2: bases 705-804

T7 Promoter/priming site: bases 821-840 (c)

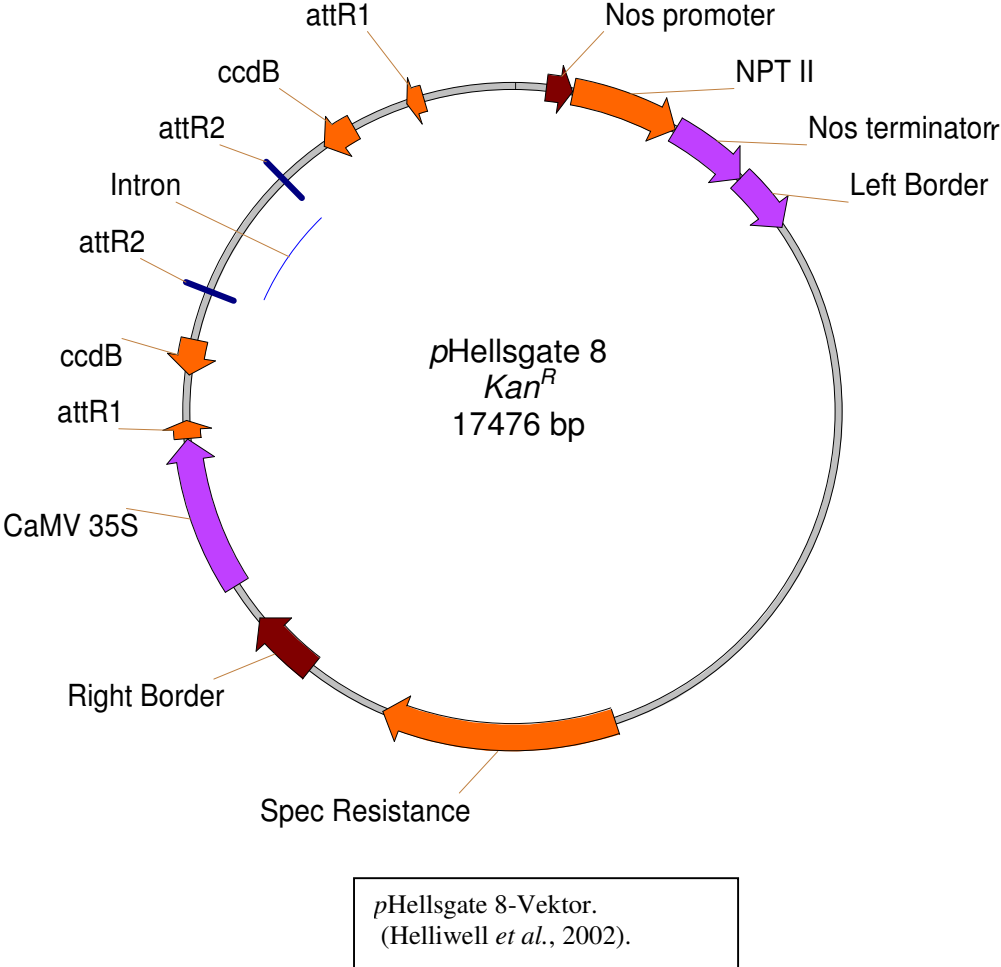
M13 reverse priming site: bases 845-861

Kanamycin resistance gene: bases 974-1783

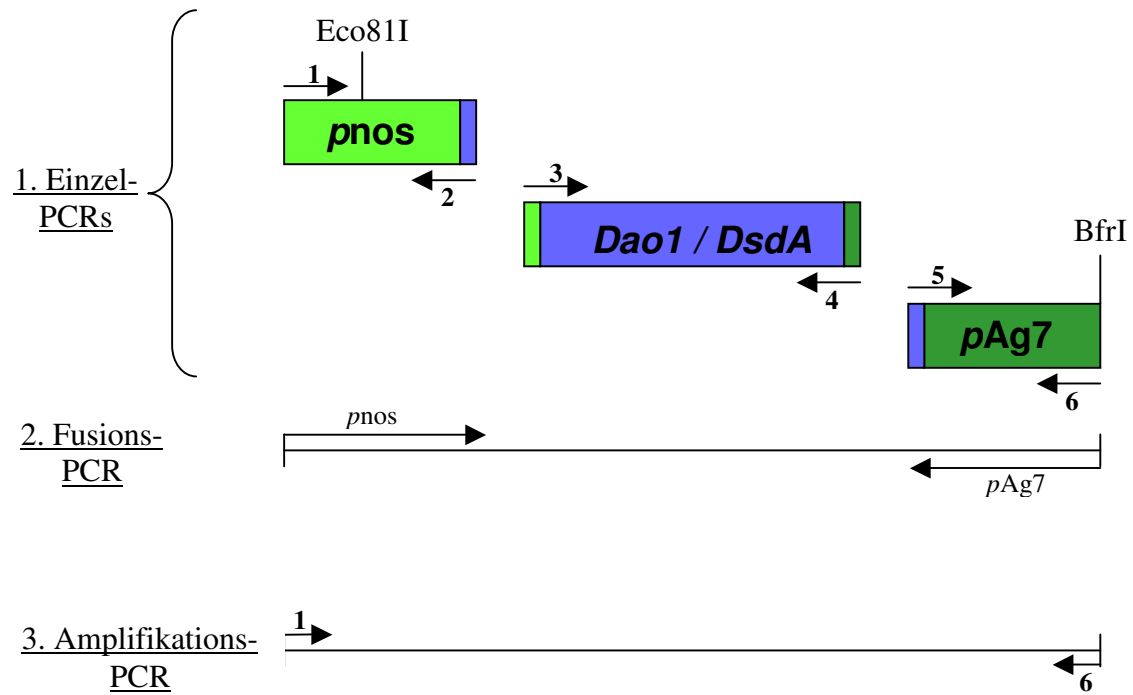
pUC origin: bases 1904-2577

(c) = complementary sequence

pENTR™/D-TOPO®-Vektor.
Invitrogen, Karlsruhe



A.3. Hygromycin-Kassette im *pBHTX*-Vektor. Amplifiziert mit den angegebenen Primern zur Klonierung in den *pHELLSGATE8*-Vektor (s. 2.2.18.).



A.4. Fusions-PCR zur Generierung des *DAOI*- bzw. *DSDA*-Austauschkonstrukts (vgl. 2.2.19.).
 Primer zur Amplifikation der Einzel-Fragmente:

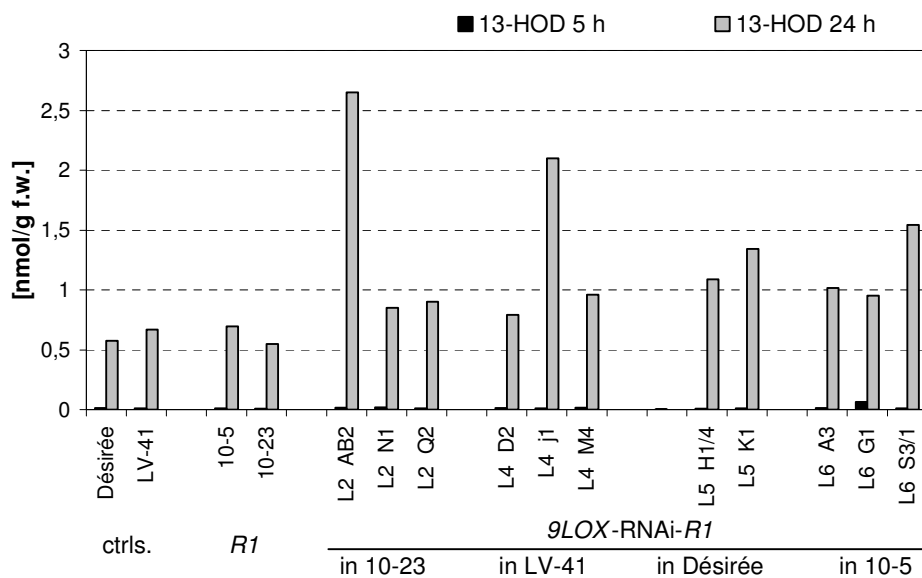
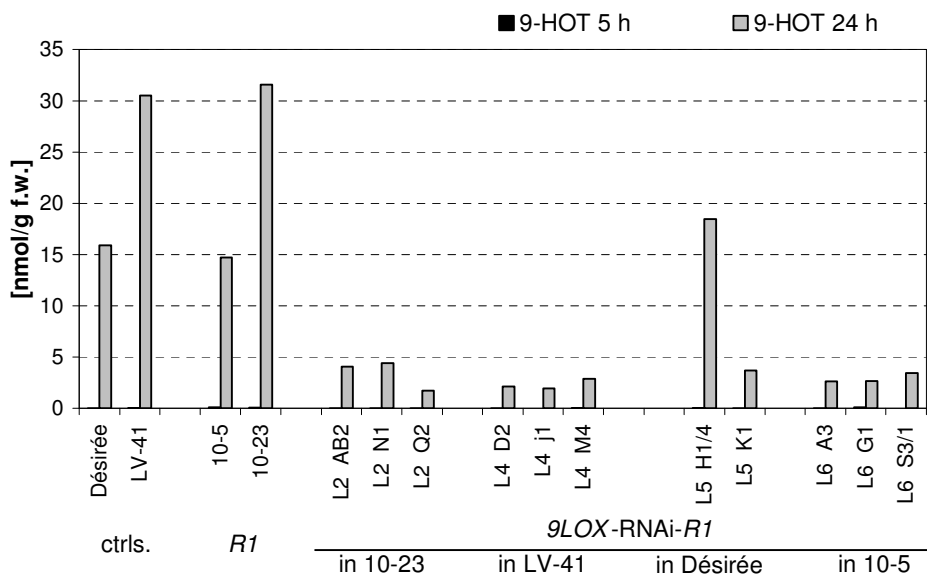
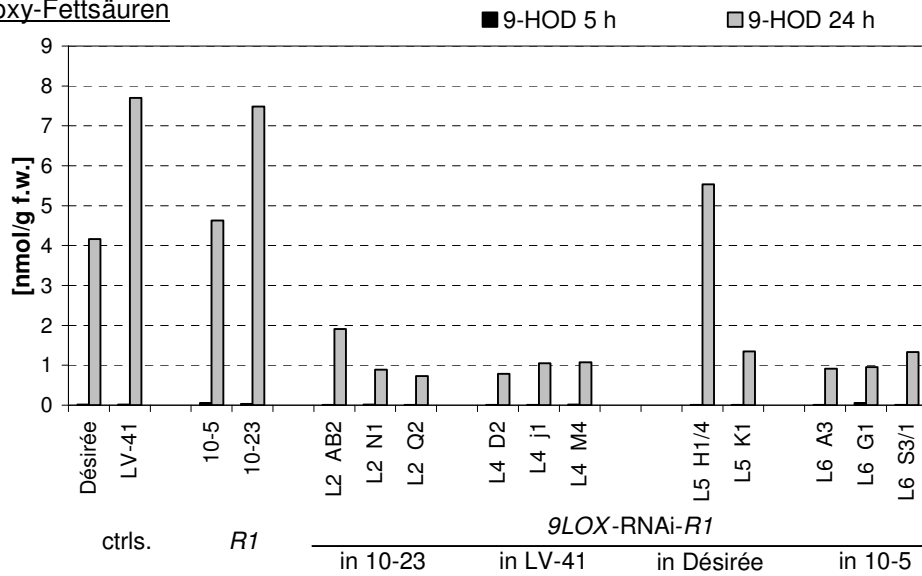
<i>pnos</i>	1: pnos-pHG8_5	2: pnos_3-daoI_5a bzw. pnos_3-dsdA_5a
<i>Dao1</i>	3: pnos_3-daoI_5b	4: daoI_3-pAg7_5a
<i>DsdA</i>	3: pnos_3-dsdA_5b	4: dsdA_3-pAg7_5a
<i>pAg7</i>	5: daoI_3-pAg7_5b bzw. dsdA_3-pAg7_5b	6: pAg7-BfrI_3

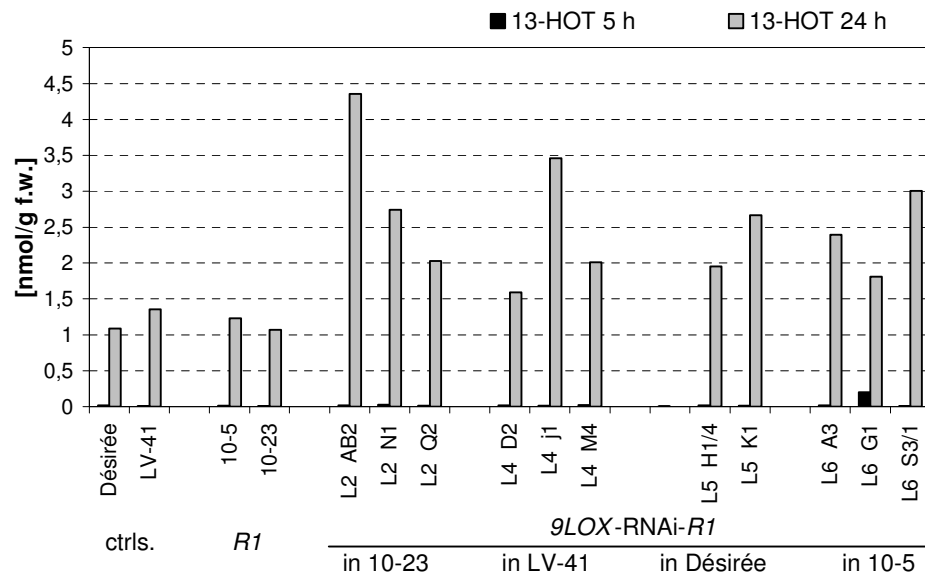
Die amplifizierten Einzel-Fragmente wurden PCR-vermittelt fusioniert und dann amplifiziert.

A.5. Oxylinprofil der *StLOX1*-RNAi-*R1*-Pflanzen nach Pep-13-Infiltration.

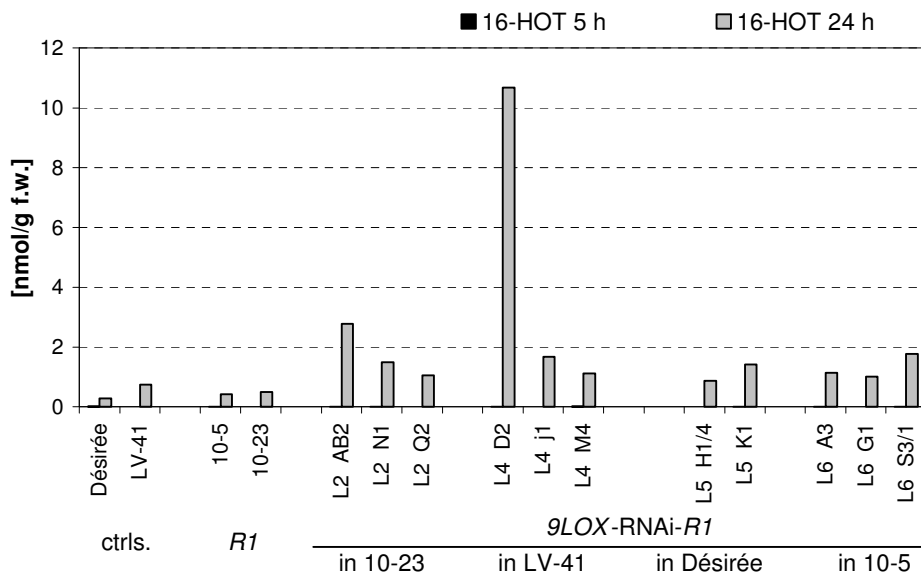
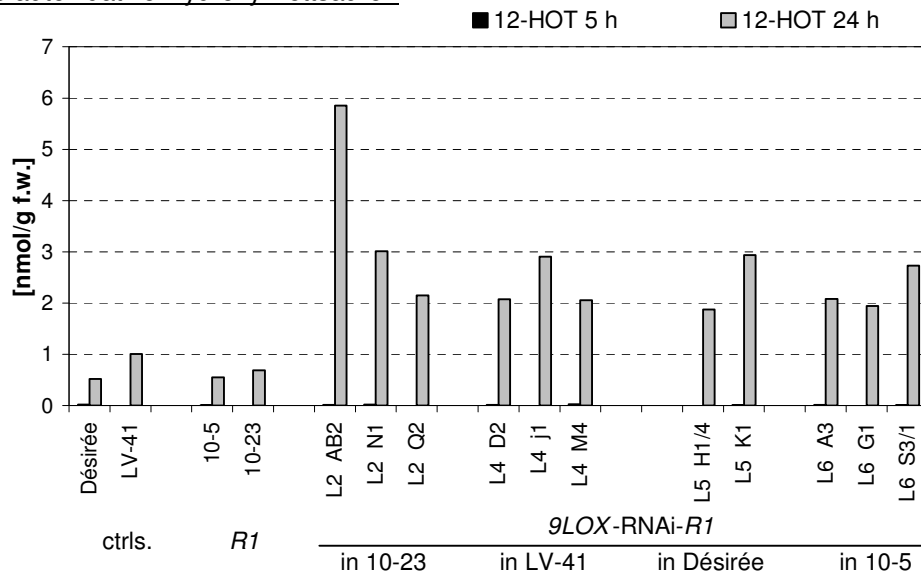
LV-41= Leerer Vektor; ctrls.= Kontrollen; *R1*= *R1*-Gen-tragende Kontrollen; RNAi-Linien= s. 3.4.1.

a) freie Hydroxy-Fettsäuren

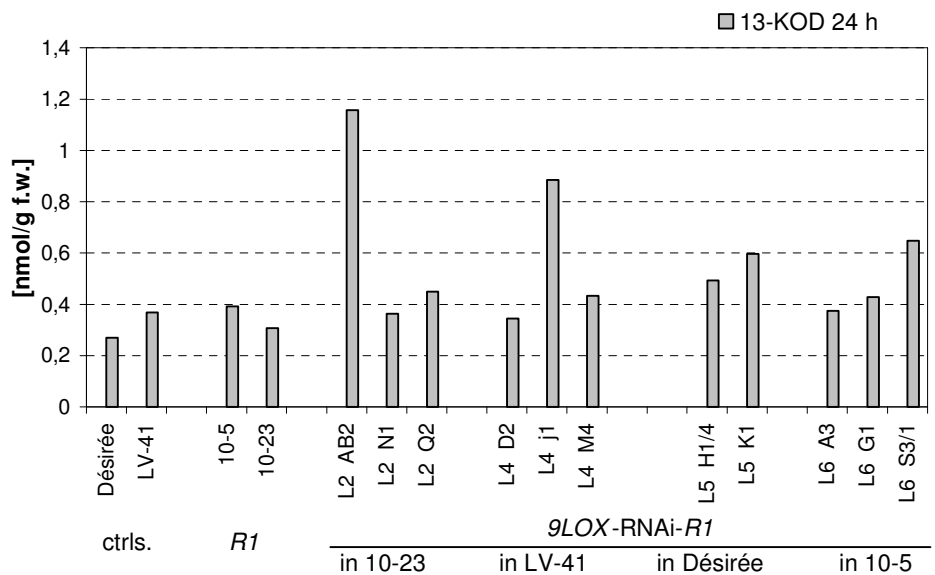
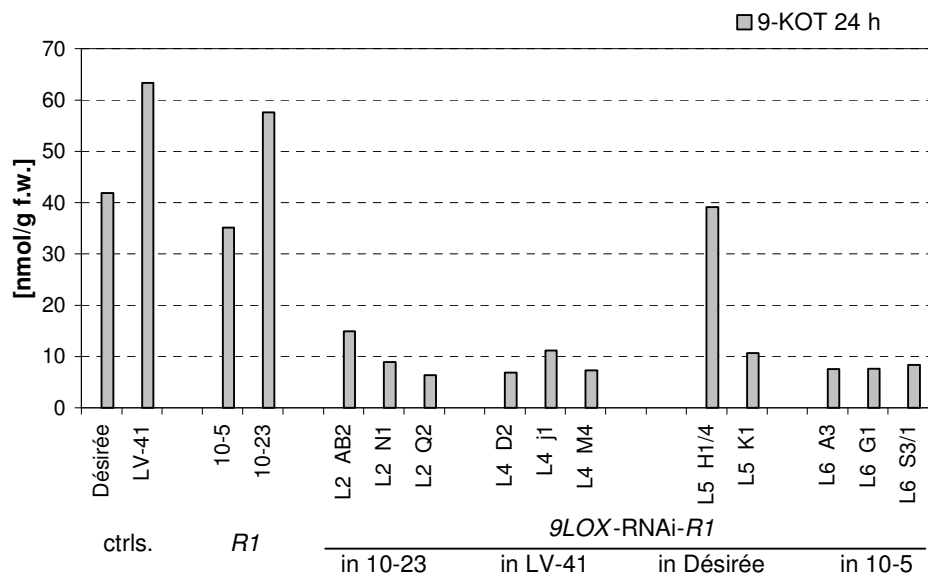
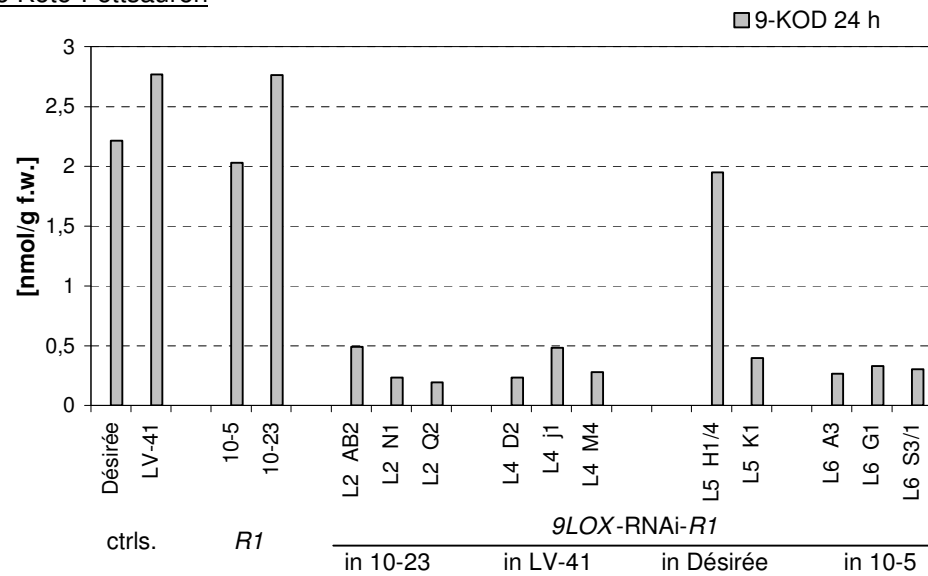




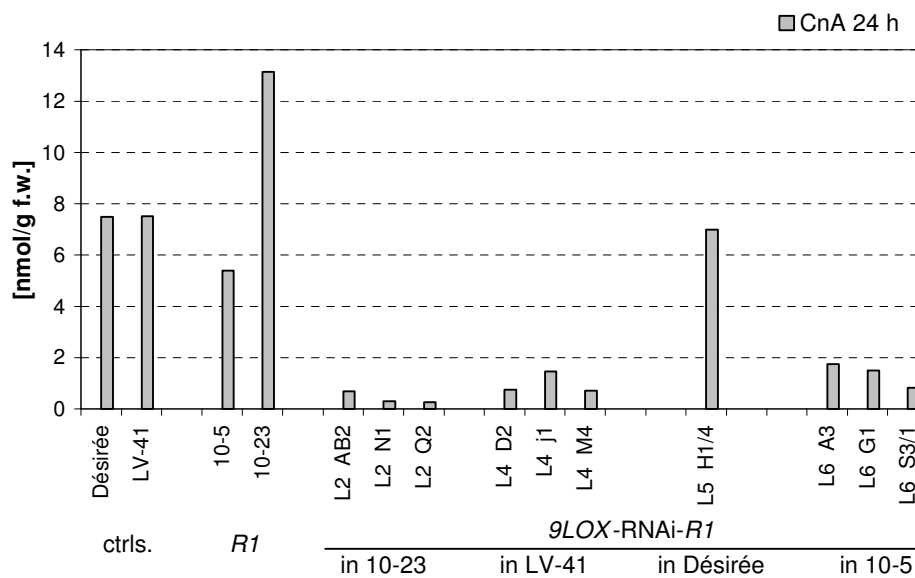
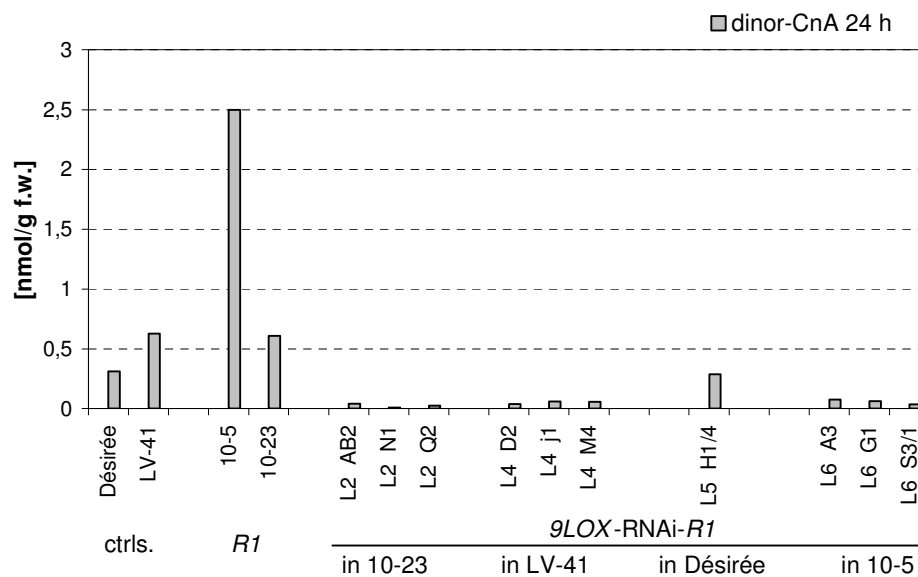
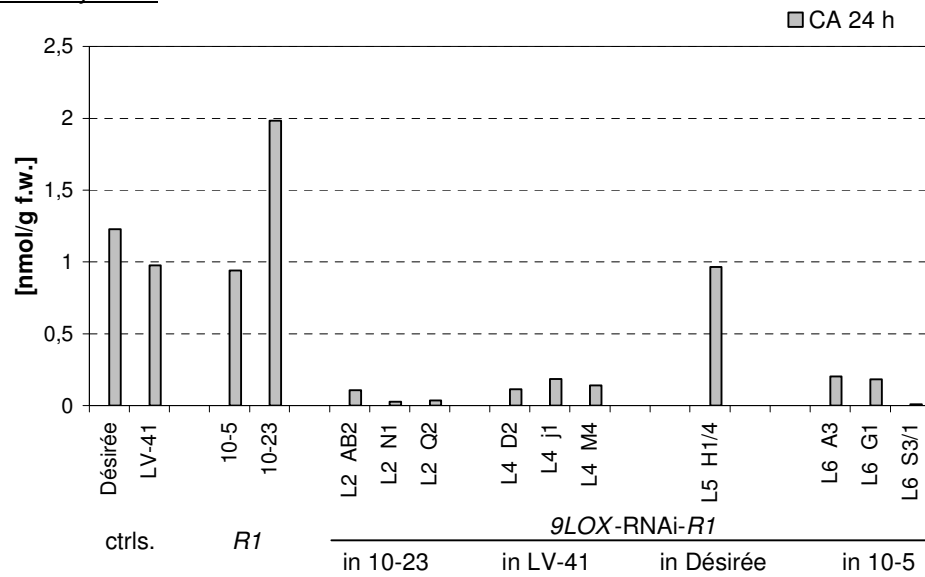
b) freie autoxidative Hydroxy-Fettsäuren



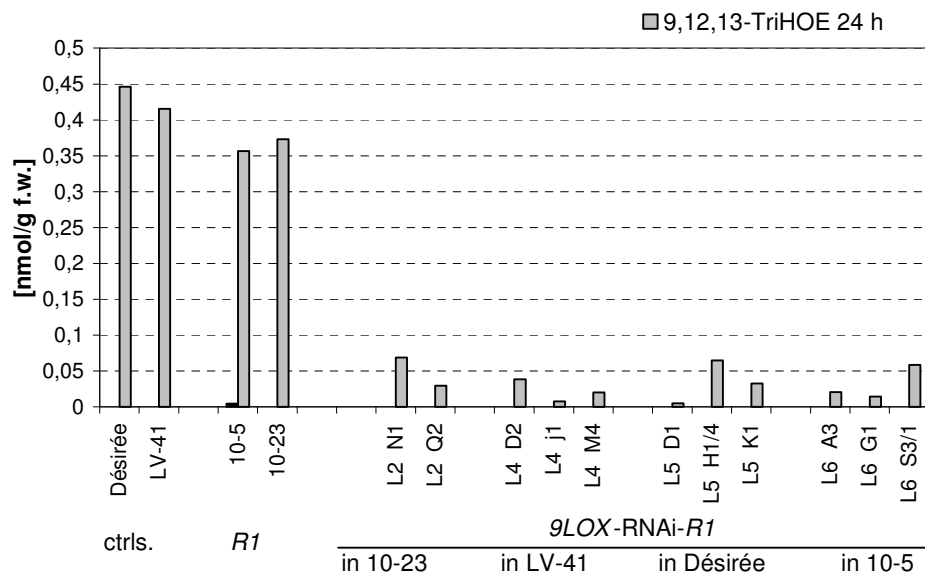
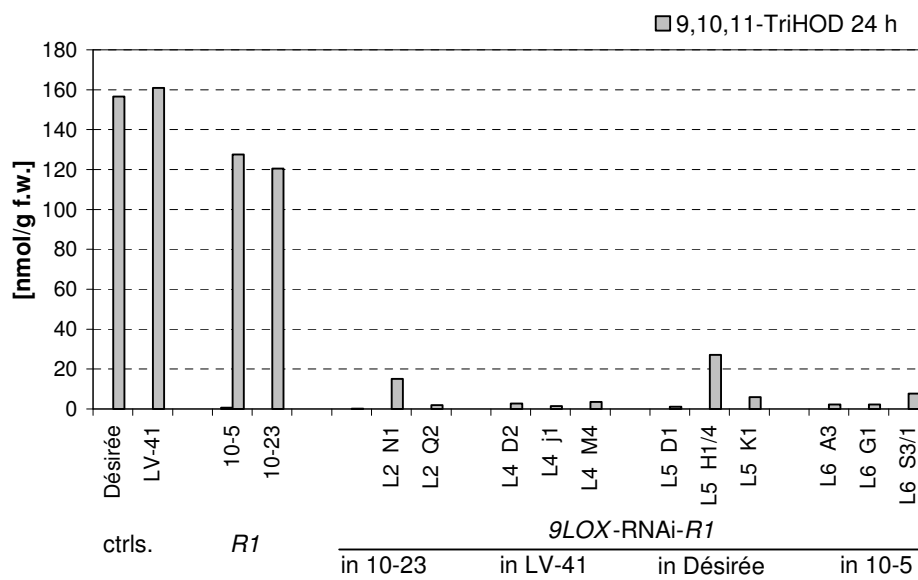
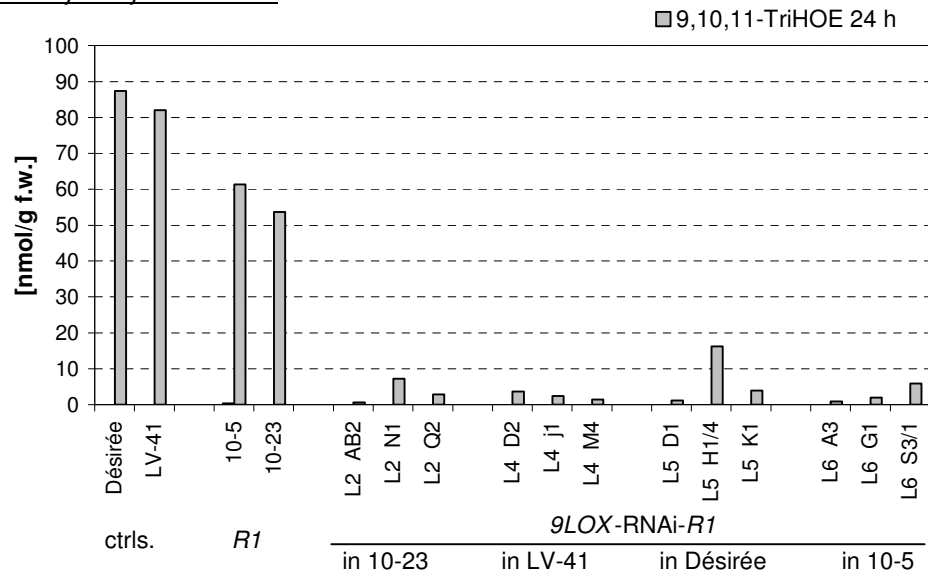
c) freie Keto-Fettsäuren

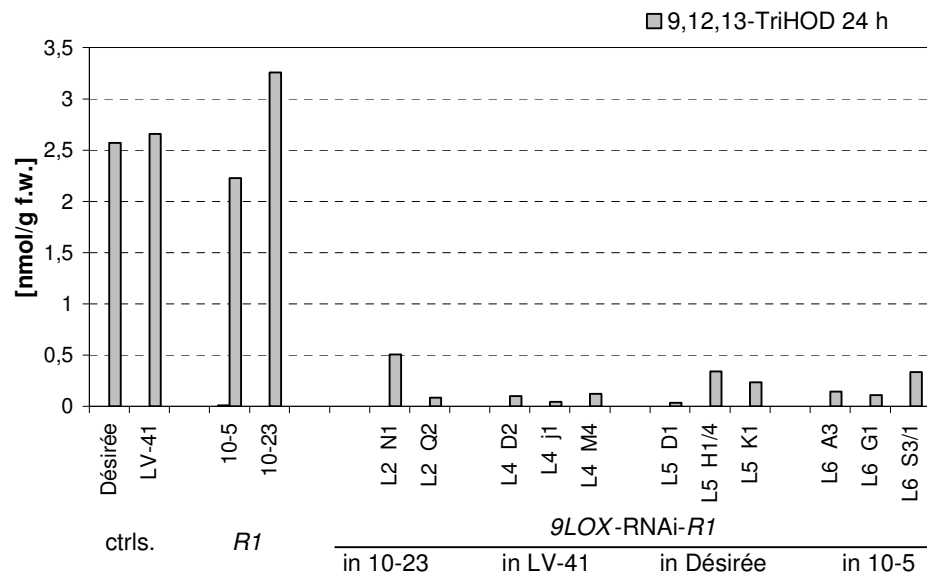


d) freie Divinylether

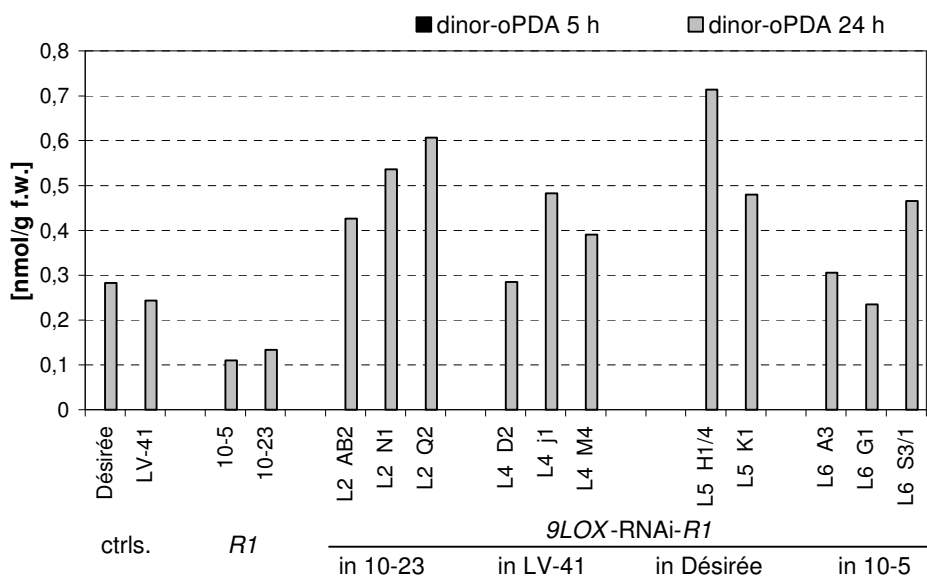
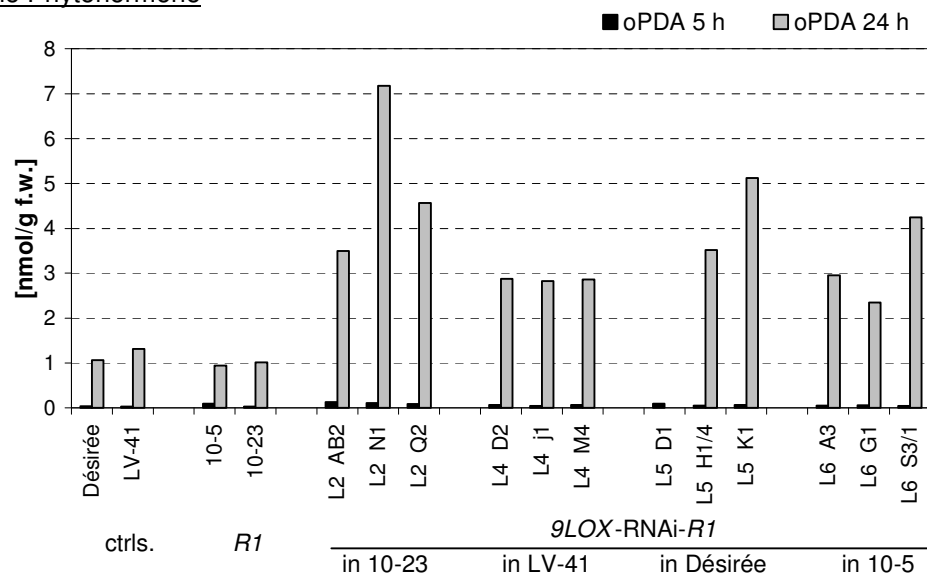


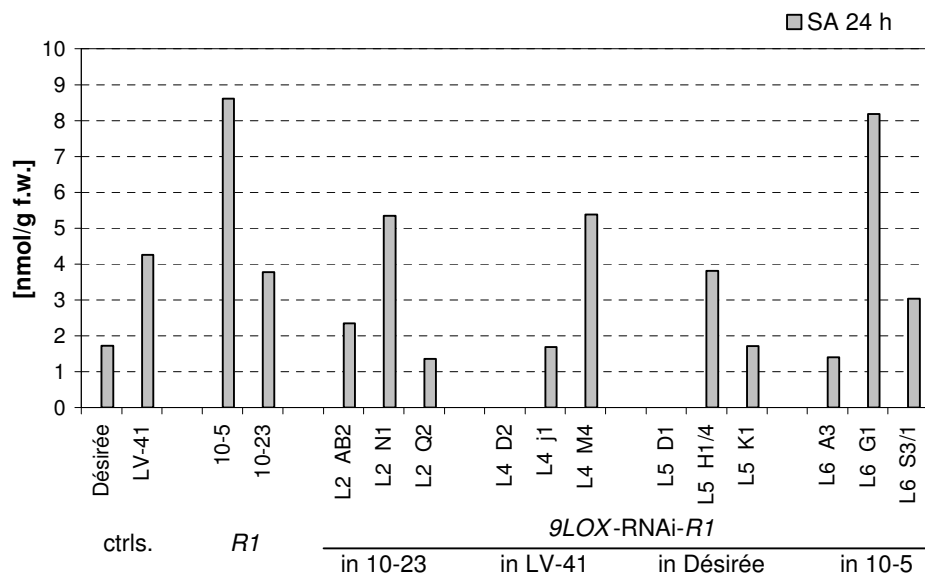
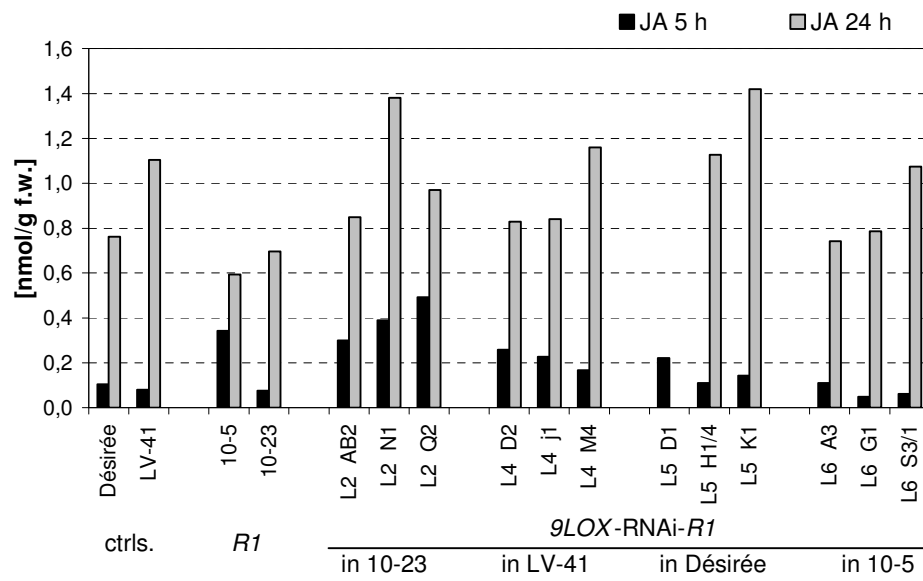
e) freie Trihydroxy-Fettsäuren





f) freie Phytohormone





A.6. klonierte Gen-Fragmente für die Pflanzentransformation (alle in *pHELLSGATE8*).**- *StLOX1* (STU60202) für die Transformation von *Désirée-R1*-Pflanzen**

StPOTLX-3-AS_3: tatgttgcagtgaaatgactcg
 StPOTLX-3-AS_5: caccggatagttgaattagc (378 bp)

tatgttgcagtgaaatgactcggggtgtccatcagctaaattagtcactggttgaatacacacgcagccattgagcct
 tttgtgattgctacaaacaggcaactaagtgtgcttcacccaattcataagcttttacatcctcattttcgtgac
 acgatgaacataaatgctttggcaagacagatcttaataatgctggtggagtcttgagatgacagttttcct
 gccaaatgatgcgatggaaatgtcagctgtagtttacaaaagttgggttttctgaacaagcactccagctgat
 cttataaagaggggagtggccgtagaggactctagttccccacatggtggttcgctt**gctaattcaagactatccg
 gtg**

- *St9DES* (STU309541) für die Transformation von *Désirée-R1*-Pflanzen

StDES-AS_5: aaatcttccgattcgtgaaattc
 StDES-AS_3a: caccgctgcatggtttgatc (356 bp)

aaatcttccgattcgtgaaattccaggggactatggtttccctataattagcgcgattaaagatcgatacgatta
 tttctataaccaaggtgaagatgcttggttccataacaaagctgaaaaatacaaatctactggtgcaaaatcaa
 catggcaccaggtccattcacatctaatgactacaaattggtagcatttttagatgccaatagctttggttgcat
 gtttgataattccctcatcgataaaaactgacactcttgggtggtacatttaagcctggtaaaagaatactacagtgg
 ttatcgtcccgttgcgtttatcgatacgaaa**gatccaaaccatgcagcggggtgggtg**

- *StAOS3* (AJ868542) für die Transformation von *Désirée*-Pflanzen

St9AOS-AS_5: cgactttcattacaatcaaggtgc
 St9AOS-AS_3: caccgttatcactcatgggattgaag (431 bp)

cgactttcattacaatcaaggtgctgatgaatttttcaggtctcgtatggaaaaacatgattccactatcttttag
 aaccaatgtccctcctggtcctttcaatgctcgtactccaaagttggtgctcttggagcgcggttagttatcc
 catcctttttgataattcccaagtcgataaaggaaaactactttgaaggtactttcatgctctcccatctttcaa
 tgggtggttataaggtttgtggttttcttggtaaaactgatcctaaacacactacactaaaaggtcttttcttgtc
 taccctaactagattgcatgacaagttcatccctatctttactacctcaatcactcagatggttacaagctcttga
 aaaagaattgtctgagaaaggaacgtctta**cttcaatcccagatgataacgggtg**

- *StSYR1* (AY616763) für die Transformation von *Désirée*-Pflanzen

StSYR1_RNAi_5: ctacaggtcaaagtgagacattc
 StSYR1_3: caccatctcattttcttccatggctg (374 bp)

CTACAGGTCAAAGTGAGACATTCTTACAAAAGGCAATACAAGAAACAAGGAAGAGGACAAGTGATGGACACAATA
 ATGGAGATTCAAGAAAGGCATGAAGCTGTGAAGGAAATAGAAAGGAATTTGAAAGAAGCTCATCAAGTTTTCTTG
 GACATGGCTGTTTTAGTGGAATCTCAAGGTGAACAACCTTGATGATATTGAGAGCCAAGTGAATAGGGCTAATTCA
 TATGTTAGAGGAGGTGCTCAACAATTACAAGTGGCAAGAAAACACCAAAAAGAATACAAGAAAATGGACTTGTTTT
 GCTATTATTCTTTTGCTTATCATCATCTTGATAGTGGTTCTTTCTATT**CAGCCATGGAAGAAATGAGATGGGTG**

- *StSNAP33* (TIGR StMDC73) für die Transformation von *Désirée*-Pflanzen

StSNAP33_RNAi_5: caccGTTATCACAAGAATGTCAGATG
 StSNAP33_3: CTGGTTTACTTTCCAAGCAAGC

CACCGTTATCACAAGAATGTCAGATGATCCAGTTCAAAGAAGGGGCAACCACTTGGAGCAGAGGGAGAAATTAGG
 ATTGAGCTCTGCACCCAAGGCAAGGTCAAGTTCAGGACACCACCCAGAGCCTACAAATGCTCTGCAGAAAGT
 TGAGGCCGAGAAAGCAAAGCAAGATGATGGACTGTGAGAACTCAGCGATCTGTTGGGGGAGCTCAAGAATATGGC
 TGTTGACATGGGATCTGAAATTGAGAGGCATAAAGAGGCATTGGATCATACTGAACAGGATGTTGATGAGCTTG
 TACCAGAGTTCAGGGGCAACCGGAGGATTCCGG**GCTTGCTTGAAAGTAAACCAG**

A.7. klonierte Gen-Fragmente für radioaktive Sonden.

Die Klonierungen wurden teils in dieser Arbeit, teils von Angelika Weinel, Sebastian Schulze und Daniel Paape (IPB Halle) durchgeführt.

a) TIGR-Microarray-Kandidatengene**- StAEC (TC116733)**

StAEC_5: CATTGGACATTCACCTTATCAG

StAEC_3: caccAAGTAACTTGACAGAGTCTTG (380 bp)

CATTGGACATTCACCTTATCAGCTGATAAGAAGTTTCATCCTTGAAAATTCAAAGCACTAAAAACAGCAGAGGAGAA
CGAAGCGATTAAGGGACCAAACAATGACTCGGAGACAAATGAAAAGTCTTACCTTCTTGACAACAATTCTCAAGA
TCAGCTTCCTATTAGTACCACAAAAACAAGTAAAATCAAACAGTAGAAGTATCATCATGGCGAAAAATAGTAGG
TGTGGTACACACTTTCTTAGAAGAGCTAACAGCACCTCCTACTCTTGGAGCTATTGTAGGATTCCTATTTGGTTC
AGTTACATGGCTGAAAAATCTGGTGATTGGGGATGCTGCTCCCCTTAGAGTTATT**CAAGACTCTGTCAAGTTACT
TGGTG**

- StCAO (TC130280)

StCAO_5: AGCACCACCTTCATAATGGAAGT

StCAO_3: CACCATGATAGAGTTAGTAGCCAAGTC (338 bp)

AGCACCACCTTCATAATGGAAGTGATAAAAGTATTACACATTTCTGTTGCTTTTTTCTTCTTGTCTTTTCTATTA
ACTCTCAATGTCATCCTTTAGATCCTCTTAATCCTGATGAAATCAATCAAATTAGAGTCATTATCCAAAAATCCC
ACCTTTCCAATGTAACATTTTCATGATGTAGACCTTGATGAACCAGAAAAGAATGATGTCCTTCATTGGCTTTCCCT
TTGATAAATCAAACAATGCCTCTTTTCTTATCGTCGAGCCAAGGTAGTAGTTCGCGCTAATGGTGAGTCATATG
AACTCACAATA**GACTTGGCTACTAACTCTATCATGGTG**

- StCYP (TC121996)

StCYP_N67_RNAi_5: CTTAGTAGCTCTTCCTATCGTAC

StCYP_N67_RNAi_3: caccTTTTTCGCATTTCTCTCCAATAGTC (359 bp)

CTTAGTAGCTCTTCCTATCGTACTCAATTTCTAGCCAAAAAGGGTAGGAAAAATGTTATGCCACCTGGTCCTTT
AGGGTTGCCATTTATTGGAAATTTGCATCAATATGATGGTTTAAACCCTCATATTTATTTTTCGAAACTTTCCAA
AAAATATGGGAAAAATATTTTCATTAATAAAGTTGGTTCTGCTCCAATAGTTGTAATTTCTTCAGCAAAATAGCAAA
AGAAGTATTGAAAATACAAGATTTAACATTTTGTAGTAGACCTTCTTTTCTTAGCCAACAAAAATATCTTATAA
TGGTCTTGATGTTGGCTTTGCGCCTTACAAT**GACTATTGGAGAGAAATGCGAAAAGGTG**

- StDBP (TC123587)

StDBP1_RNAi_5: GAGACAATCATCAGGAGCTTCTAG

StDBP1_RNAi_3: caccAGGCTTCTAATAATAGCAGCTTG (256 bp)

GAGACAATCATCAGGAGCTTCTAGAATAAGTGATGATCAAATTGCTGATCTCGTATCAAAGTTACAATTACTTAT
CCCTGAAAGCCGCAGTACTAGGAGTTCCGATAAGGTTGAAGCTTCCAAAGTGTGCAAGAAACATGTAATTACAT
AAGAAGTTTACACAGAGAAGTGAAGACTTAAGTGATAGATTATCAGTCTTTTTGGAACTACTGAGAGTGACAG
TGCT**CAAGCTGCTATTATTAGAAGCTGGTG**

- StDOX (TC121274)

StDOX_5: GCAGATCCTATGGTTGTTGCAAC
 StDOX_3: caccATTGCGAACATCACCAGAGATG (421 bp)

GCAGATCCTATGGTTGTTGCAACAAAGCTGCTAGCACGCAGAAAATTCATAGACACAGGAAAAACAATTTAACATG
 ATAGCTGCCTCATGGATACAATTTATGATTCATGATTGGATCGATCATTGGGAAGATACTCAACAGATTGAGCTA
 AGGGCACCTGAAGAAGTTGCAAGTGAGTGTCTCTCAAGTCCTTTAAGTTTTTCAAGACCCAGCAAACCTCCTACG
 GTTTTATGTGATATCAAGACTGGGCACCTGAACATGCGTACTCCACAATGGGATGGAAGTGCTATTTATGGGAGC
 AACGCAGAAGTTTTCAAGAAGTGAGGACATTTAAAGACGAAAAATTGAAACTATCAGAAAAATGGGCTCCTTGAA
 CAAGATGAAAAATGGGAAAAAT**CATCTCTGGTGATGTTGCGCAATGGTG**

- StEAR (TC120910)

StEAR_RNAi_5: CTCAAAACTGTCCTGTAACAGAC
 StEAR_RNAi_3: caccTAATCTCCATCAAAGAGCCATCTG (370 bp)

CTCAAAAACTGTCCTGTAACAGACTTGCCAGTAGTTGTCATGTTTCATCCATTCAACATTTTTGGCGCAGTTTCA
 CATCTACGACTCAAAAAGTTACAGAAAAGTTGTCACCAAGGCAAAAATCAGAAGCTGATGATAGCAAGCCTGCCTCCG
 TGTGGCCGATTGATTTGAGAGGTAAGGGCTTTTATAGCTGGTATAGCTGATGATAATGGATATGGGTGGGCTA
 TTGCTAAGTCCCTGGCTGCTGCAGGTGCCGAAATTCTAGTTGGAACCTGGGTGCCAGCCTTAAACATTTTTGAAA
 CAAGTCTTCGACGTGGGAAGTTTGATGAATCACGCGTTTTGC**CAGATGGCTCTTTGATGGAGATTAGGTG**

- StFAD (TC124103)

StFAD-RNAi_5: GTCATCTCCAAGAGTTCCATCTG
 StFAD-RNAi_3: caccGACGACGATGACTATGCTTCCATG (379 bp)

GTCATCTCCAAGAGTTCCATCTGCAAAGCCCCCTTTTACACTTGGCGATGTCAAGAAGGCCATTCCCTCCTCACT
 GCTTCCAACGTTCTTATTTCGCTCCTTCTTATTCTTATTCAAGATCTCATACTTGTCTCCATCTTCTATTATA
 TTGCCAACACTTACTTCCACCTCCTTCCATCCCCATTAACCTTACCTTGGCTGGCCTGCTTATTGGATCGCGCAAG
 GTTGTGTTTGCACCTGGAATATGGGTCATTGGACATGAATGTGGTCATCATGGCTTTAGTGATTACCAATGGGTAG
 ATGACACTGTTGGCCATATCCTCCACTCTGCCCTTTAACACCCTACTTTG**CATGGAAGCATAGTCATCGTCGTC**
GGTG

- StLTP1 (TC126090)

StLTP1_5: GCATGCCTTGTTGTTTTGTG
 StLTP1_3: caccATCAACCTTACCTGGACC (331 bp)

GCATGCCTTGTTGTTTTGTGCATGATAGTGGTTGCACCCCATGCAGAAGCACTAAGCTGCGGCCAGGTTACATCT
 GGCTTGGCTCCTTGCTCCTTATCTCCAGGGACGCGCCCTCTAGGAGGGTGTGTGGTGGAGTTAAGGGTCTG
 TTGGGTGCAGCCAAGACCCAGCGGACCGAAAGACAGCATGTACTTGCCTCAAATCAGCCGCTAGTGCTATTAAA
 GGCATTGATGTGGGCAAAGCCGCTGGTATCCCTAGTGTGTTGTGGCGTAAACATTCTTACAAGATCAGCCCCCTC
 ACTGACTGCTCCAAG**GGTCCAGTAAGGTTGATGGTG**

- StSCL11 (TC120066)

StSCL11_5: GCTATTCTACCACTACTTACTAC
 StSCL11_3: caccATCTTCTCCATAAGCATCTGAC (431 bp)

GCTATTCTACCACTACTTACTACTTCAACAGCATTTTTCTTCTATATAATCAGGTACCATTCTCAGTTCCTATTTT
 TTGTTTCAGTTTCTTTTCTTTTTTTTTTTGTTAGAATTTCTGTGATTCTTGATTTCTTCAATCAAACATCTCAG
 AATTTAGTAGCTCAAACCAATTTCCATGGAAGCCCTTTTTCAAGAACAGCTTTTTTCTTGTGCTGATTCTTTTCAT
 TTTTAGGCACCCTTCAATTCCAATGGATCCAAGAAAAGATGTTGTACAAAATGGTGTCAATAATCATCCTAGTTT
 TGTTCAAGATTACCTTTCAAATCATGTTGTTGGAAAGGGAGATTCTTCTTCTCTTAAAGAGGAAGGGGAAAGGGA
 CTATTCTGATGCAATGTACAAATCTTAA**GTCAGATGCTTATGGAAGAAGATGGTG**

- StTLP (TC116097)

StTLP_5: ATGGCGGAAGAATTAGAAACTC
 StTLP_3: caccTTGACACTAAGACCAAAGAGAG (393 bp)

ATGGCGGAAGAATTAGAAACTCCGCTGATAAATAAAAAAGATTACTACGAGAATTGTCCGGGTTGTAAAGTAGAT
 CTACACAAAGCGGGTCAAACGGGTTTACCCATTAAGGAGCTCTTCACTGTATGGGTTGTCATCCTTAGCGCAGCA
 CTGCCAATATCATCTCTCTTTCCATTTGTTTATTTTCATGATAAAGGACTTTCACATTGCAAAGAGAGAGGAAGAT
 ATTAGTACATATGCAGGTTATGTAGGTTCTGCATTTATGCTTGGAAAGAGCTTTGACATCTGTCTTTGGGGAACA
 GTGGCTGATCGATATGGACGAAAACCAGTTATAGTTTTTCGGCACTTTTGTAGTGTTATTTTCAATA**CTCTCTTT**
GGTCTTAGTGTCAAGGTG

b) andere Genfragmente- Colletotrichum coccodes ITS1-2 (INTERNAL TRANSCRIBED SPACER)-Region

CcITS1/2-F: tgccgcctgcccagccccct
 CcITS1/2-R: ggctccgagaggggtccgcca

ggctccgagaggggtccgccactacctttaagggcctacgtcaaccgtagggccccaacaccaagcagagcttgag
 ggttgaaatgacgctcgaacaggcatgcccgcagaatgctggcgggcgcaatgtgcggtcaaagattcgatgat
 tcaactgaattctgcaattcacattacttatcgcatcttgcggtccttcatcgatgccagaaccaagagatccg
 ttggtgaaagtttaattatttgccttgctgcccactcagaagaaacgctcgttaaaatagagtttggtatcctccggc
 gggcgctccgcccgtgagggcagggccggg**aggggggtccgcaggcggca**

- St9DES-Fragment außerhalb der RNAi-Region (vgl. A.6)

St9DES-RT_5: tgatgcatttagcaagtccg
 ST9DES-RT_3: caaccaatattaacctacc

tgatgcatttagcaagtccgctgtgtccatattggatgaagcagaaaaacttggaatcaaaagagaagaagctgt
 acaaaacattcttttctcgtggggatcaatatgtttgcgggcttgaacgctttctcccctcatctcttcaggtt
 tgtgggcgaagcaggggctagtctacacacacaacttgctaaagaaatcaggaccgttattaagaagaggggtgg
 tgcaatcacattatcagcgttaacaaaatgagtttagtcaagtcgtagtgatgagacattgaggcttcgccc
 accagtaccattacagtatggtaagggcgaagaaagacttcatggttcaaagccacgatgcatcttacaagatcaa
 taaagggcaattcgtcggttgatatacagcctatggctagttagggaccctaagattttcgccaaccctgatgagtt
 tgttctgataggttcatgaatgatgggtgagaaaatgctgaaacatggtctatggtctaaggaagggaaacaga
 aatccagcaccagataacaagcaatgtccaggcaagatttggtgcacctatt**gggtaggttaaatattggttg**

A.8. verwendete Antibiotika.Bakterien-Selektion:

- pENTRTM- bzw. pCR2.1-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) mit klonierten RNAi- und Kandidatengen-Fragmenten: Kanamycin (50 mg / L)
- pHELLSGATE8-RNAi-Vektoren: Spectinomycin (50 mg / L)

Pflanzen-Selektion + anti-Agrobacterium-Antibiotikum:

- StSYR1-RNAi, StSNAP33-RNAi, StAOS3-RNAi: Kanamycin (50 mg / L) + Carbenicillin oder Cefotaxim (500 mg / L)
- StLOX1-RNAi-R1: Hygromycin (3,5 mg / L)

- Adam, L und Somerville, S C** (1996). "Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*." Plant Journal **9**(3): 341-356.
- Aist, J R** (1976). "Papillae and Related Wound Plugs of Plant-Cells." Annual Review of Phytopathology **14**: 145-163.
- Anderson, J P, Badruzsaufari, E, Schenk, P M, Manners, J M, Desmond, O J, Ehlert, C, Maclean, D J, Ebert, P R und 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**(12): 3460-3479.
- Andrivon, D, Lucas, J M, Guérin, C und Jouan, B** (1998). "Colonization of roots, stolons, tubers and stems of various potato (*Solanum tuberosum*) cultivars by the black dot fungus *Colletotrichum coccodes*." Plant Pathology **47**(4): 440-445.
- Arcand, M M und Schneider, K D** (2006). "Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review." Anais Da Academia Brasileira De Ciencias **78**(4): 791-807.
- Aro, E M, Virgin, I und Andersson, B** (1993). "Photoinhibition of Photosystem-2 - Inactivation, Protein Damage and Turnover." Biochimica Et Biophysica Acta **1143**(2): 113-134.
- Assaad, F F, Mayer, U, Wanner, G und Jürgens, G** (1996). "The KEULE gene is involved in cytokinesis in *Arabidopsis*." Molecular & General Genetics **253**(3): 267-277.
- Assaad, F F, Qiu, J L, Youngs, H, Ehrhardt, D, Zimmerli, L, Kalde, M, Wanner, G, Peck, S C, Edwards, H, Ramonell, K, Somerville, C R und Thordal-Christensen, H** (2004). "The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae." Molecular Biology of the Cell **15**(11): 5118-5129.
- Baillieux, F, Genetet, I, Kopp, M, Saindrenan, P, Fritig, B und Kauffmann, S** (1995). "A New Elicitor of the Hypersensitive Response in Tobacco - a Fungal Glycoprotein Elicits Cell-Death, Expression of Defense Genes, Production of Salicylic-Acid, and Induction of Systemic Acquired-Resistance." Plant Journal **8**(4): 551-560.
- Ballvora, A, Ercolano, M R, Weiss, J, Meksem, K, Bormann, C A, Oberhagemann, P, Salamini, F und 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 Journal **30**(3): 361-371.
- Bate, N J und Rothstein, S J** (1998). "C-6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes." Plant Journal **16**(5): 561-569.
- Beckers, G J M und Spoel, S H** (2006). "Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate." Plant Biology **8**(1): 1-10.
- Belkhadir, Y, Subramaniam, R und Dangl, J L** (2004). "Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners." Curr Opin Plant Biol **7**(4): 391-9.

- Bent, A F und Mackey, D** (2007). "Elicitors, effectors, and *R* genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions." Annual Review of Phytopathology **45**: 399-436.
- Bhat, R G und Subbarao, K V** (1999). "Host range specificity in *Verticillium dahliae*." Phytopathology **89**(12): 1218-1225.
- Bhattacharjee, S, Hiller, N L, Liolios, K, Win, J, Kanneganti, T D, Young, C, Kamoun, S und Haldar, K** (2006). "The malarial host-targeting signal is conserved in the Irish potato famine pathogen." Plos Pathogens **2**(5): 453-465.
- Block, A, Schmelz, E, Jones, J B und Klee, H J** (2005). "Coronatine and salicylic acid: the battle between *Arabidopsis* and *Pseudomonas* for phytohormone control." Molecular Plant Pathology **6**(1): 79-83.
- Blokhina, O, Virolainen, E und Fagerstedt, K V** (2003). "Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review." Annals of Botany **91**(2): 179-194.
- Bock, J B, Matern, H T, Peden, A A und Scheller, R H** (2001). "A genomic perspective on membrane compartment organization." Nature **409**(6822): 839-841.
- Brodhagen, M und Keller, N P** (2006). "Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation." Molecular Plant Pathology **7**(4): 285-301.
- Brooks, D M, Bender, C L und Kunkel, B N** (2005). "The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*." Molecular Plant Pathology **6**(6): 629-639.
- Büttner, D und Bonas, U** (2003). "Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria." Curr Opin Plant Biol **6**(4): 312-9.
- Büttner, D und Bonas, U** (2006). "Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion." Curr Opin Microbiol **9**(2): 193-200.
- Cacas, J L, Vaillau, F, Davoine, C, Ennar, N, Agnel, J P, Tronchet, M, Ponchet, M, Blein, J P, Roby, D, Triantaphylidès, C und Montillet, J L** (2005). "The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response." Plant Cell and Environment **28**(11): 1367-1378.
- Calvo, A M, Hinze, L L, Gardner, H W und Keller, N P** (1999). "Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp." Applied and Environmental Microbiology **65**(8): 3668-3673.
- Carter, C J, Bednarek, S Y und Raikhel, N V** (2004). "Membrane trafficking in plants: new discoveries and approaches." Curr Opin Plant Biol **7**(6): 701-707.
- Castillo, M C, Martinez, C, Buchala, A, Métraux, J P und Leon, J** (2004). "Gene-specific involvement of beta-oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*." Plant Physiology **135**(1): 85-94.
- Caten, C E** (1970). "Spontaneous Variability of Single Isolates of *Phytophthora infestans* .2. Pathogenic Variation." Canadian Journal of Botany **48**(5): 897-905.

- Caten, C E und Jinks, J L** (1968). "Spontaneous Variability of Single Isolates of *Phytophthora infestans* .I. Cultural Variation." Canadian Journal of Botany **46**(4): 329-348.
- Chapman, E R, An, S, Barton, N und Jahn, R** (1994). "Snap-25, a T-Snare Which Binds to Both Syntaxin and Synaptobrevin Via Domains That May Form Coiled Coils." Journal of Biological Chemistry **269**(44): 27427-27432.
- Chini, A, Fonseca, S, Fernández, G, Adie, B, Chico, J M, Lorenzo, O, García-Casado, G, López-Vidriero, I, Lozano, F M, Ponce, M R, Micol, J L und Solano, R** (2007). "The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling." Nature **448**(7154): 666-71.
- Chisholm, S T, Coaker, G, Day, B und Staskawicz, B J** (2006). "Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response." Cell **124**(4): 803-814.
- Chomeczynski, P und Sacchi, N** (1987). "Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction." Analytical Biochemistry **162**(1): 156-159.
- Cohen, Y, Gisi, U und Niderman, T** (1993). "Local and Systemic Protection against *Phytophthora infestans* Induced in Potato and Tomato Plants by Jasmonic Acid and Jasmonic Methyl-Ester." Phytopathology **83**(10): 1054-1062.
- Cohen, Y R** (2002). "beta-aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens." Plant Disease **86**(5): 448-457.
- Collins, N C, Thordal-Christensen, H, Lipka, V, Bau, S, Kombrink, E, Qiu, J L, Hückelhoven, R, Stein, M, Freialdenhoven, A, Somerville, S C und Schulze-Lefert, P** (2003). "SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall." Nature **425**(6961): 973-7.
- Conrath, U, Beckers, G J M, Flors, V, García-Agustín, P, Jakab, G, Mauch, F, Newman, M A, Pieterse, C M J, Poinssot, B, Pozo, M J, Pugin, A, Schaffrath, U, Ton, J, Wendehenne, D, Zimmerli, L, Mauch-Mani, B und Grp, P-A-P** (2006). "Priming: Getting ready for battle." Molecular Plant-Microbe Interactions **19**(10): 1062-1071.
- Constabel, C P, Bertrand, C und Brisson, N** (1993). "Transgenic Potato Plants Overexpressing the Pathogenesis-Related *Sth-2* Gene Show Unaltered Susceptibility to *Phytophthora infestans* and Potato Virus-X." Plant Molecular Biology **22**(5): 775-782.
- Coquoz, J L, Buchala, A J, Meuwly, P und Métraux, J P** (1995). "Arachidonic-Acid Induces Local but Not Systemic Synthesis of Salicylic-Acid and Confers Systemic Resistance in Potato Plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*." Phytopathology **85**(10): 1219-1224.
- Cowley, T und Walters, D** (2005). "Local and systemic effects of oxylipins on powdery mildew infection in barley." Pest Management Science **61**(6): 572-576.
- Currier, H B und Strugger, S** (1956). "Aniline Blue and Fluorescence Microscopy of Callose in Bulb Scales of *Allium-Cepa* L." Protoplasma **45**(4): 552-559.

de Torres-Zabala, M, Truman, W, Bennett, M H, Lafforgue, G, Mansfield, J W, Egea, P R, Bögre, L und Grant, M (2007). "*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease." Embo Journal **26**(5): 1434-1443.

de Wit, P J (2007). "How plants recognize pathogens and defend themselves." Cell Mol Life Sci **64**(21): 2726-32.

Dean, J V, Mohammed, L A und Fitzpatrick, T (2005). "The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures." Planta **221**(2): 287-296.

Delaney, T P, Uknes, S, Vernooij, B, Friedrich, L, Weymann, K, Negrotto, D, Gaffney, T, Gutrella, M, Kessmann, H, Ward, E und Ryals, J (1994). "A Central Role of Salicylic-Acid in Plant-Disease Resistance." Science **266**(5188): 1247-1250.

Deslandes, L, Olivier, J, Peeters, N, Feng, D X, Khounlotham, M, Boucher, C, Somssich, I, Genin, S und 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." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 8024-9.

Després, C, Chubak, C, Rochon, A, Clark, R, Bethune, T, Desveaux, D und Fobert, P R (2003). "The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1." Plant Cell **15**(9): 2181-2191.

Dietrich, R A, Delaney, T P, Uknes, S J, Ward, E R, Ryals, J A und Dangl, J L (1994). "Arabidopsis Mutants Simulating Disease Resistance Response." Cell **77**(4): 565-577.

Dodds, P N, Lawrence, G J, Catanzariti, A M, Teh, T, Wang, C I, Ayliffe, M A, Kobe, B und Ellis, J G (2006). "Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(23): 8888-93.

Dong, X (1998). "SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants." Curr Opin Plant Biol **1**(4): 316-23.

English, J, Bonner, J und Haagen-Smit, A J (1939). "The Wound Hormones of Plants: II. The Isolation of a Crystalline Active Substance." Proc Natl Acad Sci U S A **25**(7): 323-9.

Erikson, O, Hertzberg, M und Näsholm, T (2004). "A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants." Nature Biotechnology **22**(4): 455-458.

Erikson, O, Hertzberg, M und Näsholm, T (2005). "The *dsdA* gene from *Escherichia coli* provides a novel selectable marker for plant transformation." Plant Molecular Biology **57**(3): 425-433.

Eschen-Lippold, L (2004). "Entwicklung einer Realtime-PCR basierten Methode zur Bestimmung des Wachstums von *Phytophthora infestans* auf Kartoffelpflanzen mit unterschiedlicher Resistenz." Diploma-Thesis.

- Eschen-Lippold, L, Rothe, G, Stumpe, M, Göbel, C, Feussner, I und Rosahl, S** (2007). "Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants." Phytochemistry **68**(6): 797-801.
- Fammartino, A, Cardinale, F, Göbel, C, Mène-Saffrané, L, Fournier, J, Feussner, I und Esquerré-Tugayé, M T** (2007). "Characterization of a divinyl ether biosynthetic pathway specifically associated with pathogenesis in tobacco." Plant Physiology **143**(1): 378-388.
- Feltkamp, D, Baumann, E, Schmalenbach, W, Masterson, R und Rosahl, S** (1995). "Expression of the Mannopine Synthase Promoter in Roots Is Dependent on the *mas* Elements and Correlates with High Transcript Levels of *mas*-Binding Factor." Plant Science **109**(1): 57-65.
- Feng, S H, Ma, L G, Wang, X P, Xie, D X, Dinesh-Kumar, S P, Wei, N und Deng, X W** (2003). "The COP9 signalosome interacts physically with SCFCO11 and modulates jasmonate responses." Plant Cell **15**(5): 1083-1094.
- Feussner, I und Wasternack, C** (2002). "The lipoxygenase pathway." Annual Review of Plant Biology **53**: 275-297.
- Feys, B J, Wiermer, M, Bhat, R A, Moisan, L J, Medina-Escobar, N, Neu, C, Cabral, A und Parker, J E** (2005). "Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity." Plant Cell **17**(9): 2601-2613.
- Fobert, P R und Després, C** (2005). "Redox control of systemic acquired resistance." Curr Opin Plant Biol **8**(4): 378-82.
- Forouhar, F, Yang, Y, Kumar, D, Chen, Y, Fridman, E, Park, S W, Chiang, Y, Acton, T B, Montelione, G T, Pichersky, E, Klessig, D F und Tong, L** (2005). "Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1773-1778.
- Freialdenhoven, A, Peterhänsel, C, Kurth, J, Kreuzaler, F und Schulze-Lefert, P** (1996). "Identification of genes required for the function of non-race-specific mlo resistance to powdery mildew in barley." Plant Cell **8**(1): 5-14.
- Friedrich, L, Lawton, K, Ruess, W, Masner, P, Specker, N, Rella, M G, Meier, B, Dincher, S, Staub, T, Uknes, S, Métraux, J P, Kessmann, H und Ryals, J** (1996). "A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco." Plant Journal **10**(1): 61-70.
- Gaffney, T, Friedrich, L, Vernooij, B, Negrotto, D, Nye, G, Uknes, S, Ward, E, Kessmann, H und Ryals, J** (1993). "Requirement of Salicylic-Acid for the Induction of Systemic Acquired-Resistance." Science **261**(5122): 754-756.
- Gao, X Q, Shim, W B, Göbel, C, Kunze, S, Feussner, I, Meeley, R, Balint-Kurti, P und Kolomiets, M** (2007). "Disruption of a maize 9-lipoxygenase results in increased resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with mycotoxin fumonisin." Molecular Plant-Microbe Interactions **20**(8): 922-933.

Gao, X Q, Starr, J, Göbel, C, Engelberth, J, Feussner, I, Tumlinson, J und Kolomiets, M (2008). "Maize 9-lipoxygenase ZmLOX3 controls development, root-specific expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes." Molecular Plant-Microbe Interactions **21**(1): 98-109.

Gatz, C, Froberg, C und Wendenburg, R (1992). "Stringent Repression and Homogeneous De-Repression by Tetracycline of a Modified Camv 35s Promoter in Intact Transgenic Tobacco Plants." Plant Journal **2**(3): 397-404.

Geelen, D, Leyman, B, Batoko, H, Di Sansabastiano, G P, Moore, I und Blatt, M R (2002). "The abscisic acid-related SNARE homolog NtSyr1 contributes to secretion and growth: Evidence from competition with its cytosolic domain." Plant Cell **14**(2): 387-406.

Geerts, A, Feltkamp, D und Rosahl, S (1994). "Expression of Lipoxygenase in Wounded Tubers of *Solanum tuberosum* L." Plant Physiology **105**(1): 269-277.

Glazebrook, J (2001). "Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis - 2001 status." Curr Opin Plant Biol **4**(4): 301-308.

Göbel, C, Feussner, I, Hamberg, M und Rosahl, S (2002). "Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves." Biochem Biophys Acta, **1584**: 55-64.

Göbel, C, Feussner, I und Rosahl, S (2003). "Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases." J Biol Chem **278**(52): 52834-40.

Göbel, C, Feussner, I, Schmidt, A, Scheel, D, Sanchez-Serrano, J, Hamberg, M und Rosahl, S (2001). "Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells." Journal of Biological Chemistry **276**(9): 6267-6273.

Grant, M und Lamb, C (2006). "Systemic immunity." Curr Opin Plant Biol **9**(4): 414-20.

Greenberg, J T, Guo, A L, Klessig, D F und Ausubel, F M (1994). "Programmed Cell-Death in Plants - a Pathogen-Triggered Response Activated Coordinately with Multiple Defense Functions." Cell **77**(4): 551-563.

Hahlbrock, K, Bednarek, P, Ciolkowski, I, Hamberger, B, Heise, A, Liedgens, H, Logemann, E, Nürnberger, T, Schmelzer, E, Somssich, I E und Tan, J W (2003). "Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 14569-14576.

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, Eschen-Lippold, L, Altmann, S, Birschwilks, M, Scheel, D und Rosahl, S (2007). "Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*." Molecular Plant-Microbe Interactions **20**(11): 1346-1352.

- Halim, V A, Hunger, A, Macioszek, V, Landgraf, P, Nürnberger, T, Scheel, D und Rosahl, S** (2004). "The oligopeptide elicitor Pep-13 induces salicylic acid-dependent and -independent defense reactions in potato." Physiological and Molecular Plant Pathology **64**(6): 311-318.
- Halim, V A, Vess, A, Scheel, D und Rosahl, S** (2006). "The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence." Plant Biology **8**(3): 307-313.
- Hamiduzzaman, M M, Jakab, G, Barnavon, L, Neuhaus, J M und Mauch-Mani, B** (2005). "beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling." Molecular Plant-Microbe Interactions **18**(8): 819-829.
- Hardham, A R, Jones, D A und Takemoto, D** (2007). "Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance." Curr Opin Plant Biol **10**(4): 342-348.
- Hatanaka, A, Kajiwara, T und Sekiya, J** (1987). "Biosynthetic-Pathway for C-6-Aldehydes Formation from Linolenic Acid in Green Leaves." Chemistry and Physics of Lipids **44**(2-4): 341-361.
- Heath, M C** (2000). "Nonhost resistance and nonspecific plant defenses." Curr Opin Plant Biol **3**(4): 315-9.
- Heese, A, Ludwig, A A und Jones, J D G** (2005). "Rapid phosphorylation of a syntaxin during the Avr9/Cf-9-race-specific signaling pathway." Plant Physiology **138**(4): 2406-2416.
- Heese, M, Gansel, X, Sticher, L, Wick, P, Grebe, M, Granier, F und Jürgens, G** (2001). "Functional characterization of the KNOLLE-interacting t-SNARE AtSNAP33 and its role in plant cytokinesis." Journal of Cell Biology **155**(2): 239-249.
- Helliwell, C A, Wesley, S V, Wielopolska, A J und Waterhouse, P M** (2002). "High-throughput vectors for efficient gene silencing in plants." Functional Plant Biology **29**(10): 1217-1225.
- Hildebrand, D F, Brown, G C, Jackson, D M und Hamiltonkemp, T R** (1993). "Effects of Some Leaf-Emitted Volatile Compounds on Aphid Population Increase." Journal of Chemical Ecology **19**(9): 1875-1887.
- Hobert, O** (2002). "PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic C-elegans." Biotechniques **32**(4): 728-730.
- Höfgen, R und Willmitzer, L** (1988). "Storage of Competent Cells for *Agrobacterium* Transformation." Nucleic Acids Research **16**(20): 9877-9877.
- Hückelhoven, R** (2007). "Transport and secretion in plant-microbe interactions." Curr Opin Plant Biol **10**(6): 573-579.
- Humbeck, K, Quast, S und Krupinska, K** (1996). "Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants." Plant Cell and Environment **19**(3): 337-344.

- Hunt, M D, Delaney, T P, Dietrich, R A, Weymann, K B, Dangel, J L und Ryals, J A** (1997). "Salicylate-independent lesion formation in *Arabidopsis lsd* mutants." Molecular Plant-Microbe Interactions **10**(5): 531-536.
- 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 und Lee, I** (2008). "Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis." Developmental Cell **14**(2): 183-192.
- Innes, R W** (2004). "Guarding the goods. New insights into the central alarm system of plants." Plant Physiology **135**(2): 695-701.
- Isakeit, T, Gao, X und Kolomiets, M** (2007). "Increased resistance of a maize mutant lacking the 9-lipoxygenase gene, *ZmLOX3*, to root rot caused by *Exserohilum pedicellatum*." Journal of Phytopathology **155**(11-12): 758-760.
- Ishiguro, S, Kawai-Oda, A, Ueda, J, Nishida, I und Okada, K** (2001). "The *DEFECTIVE IN ANTHE DEHISCENCE1* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*." Plant Cell **13**(10): 2191-2209.
- Itoh, A und Howe, G A** (2001). "Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450." J Biol Chem **276**(5): 3620-7.
- Itoh, A, Schillmiller, A L, McCaig, B C und Howe, G A** (2002). "Identification of a jasmonate-regulated allene oxide synthase that metabolizes 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids." Journal of Biological Chemistry **277**(48): 46051-46058.
- Jakab, G, Cottier, V, Toquin, V, Rigoli, G, Zimmerli, L, Métraux, J P und Mauch-Mani, B** (2001). "beta-Aminobutyric acid-induced resistance in plants." European Journal of Plant Pathology **107**(1): 29-37.
- Jalloul, A, Montillet, J L, Assigbetsé, K, Agnel, J P, Delannoy, E, Triantaphylidès, C, Daniel, J F, Marmey, P, Geiger, J P und Nicole, M** (2002). "Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction." Plant Journal **32**(1): 1-12.
- Jia, Y, McAdams, S A, Bryan, G T, Hershey, H P und Valent, B** (2000). "Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance." Embo J **19**(15): 4004-14.
- Jirage, D, Zhou, N, Cooper, B, Clarke, J D, Dong, X N und Glazebrook, J** (2001). "Constitutive salicylic acid-dependent signaling in *cpr1* and *cpr6* mutants requires PAD4." Plant Journal **26**(4): 395-407.
- Jones, J D G und Dangel, J L** (2006). "The plant immune system." Nature **444**(7117): 323-329.
- Kang, J H, Wang, L, Giri, A und Baldwin, I T** (2006). "Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*." Plant Cell **18**(11): 3303-3320.

- Kargul, J, Gansel, X, Tyrrell, M, Sticher, L und Blatt, M R** (2001). "Protein-binding partners of the tobacco syntaxin NtSyr1." Febs Letters **508**(2): 253-258.
- Katsir, L, Schillmiller, A L, Staswick, P E, He, S Y und Howe, G A** (2008). "COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(19): 7100-7105.
- Keogh, R C, Deverall, B J und McLeod, S** (1980). "Comparison of Histological and Physiological-Responses to *Phakopsora pachyrhizi* in Resistant and Susceptible Soybean." Transactions of the British Mycological Society **74**(APR): 329-333.
- Keppler, L D und Novacky, A** (1987). "The Initiation of Membrane Lipid-Peroxidation During Bacteria-Induced Hypersensitive Reaction." Physiological and Molecular Plant Pathology **30**(2): 233-245.
- Kolomiets, M V, Chen, H, Gladon, R J, Braun, E J und Hannapel, D J** (2000). "A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection." Plant Physiology **124**(3): 1121-1130.
- Kolomiets, M V, Hannapel, D J, Chen, H, Tymeson, M und Gladon, R J** (2001). "Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development." Plant Cell **13**(3): 613-26.
- Kongrit, D, Jisaka, M, Kobayasi, K, Nishigaichi, Y, Nishimura, K, Nagaya, T und Yokota, K** (2006). "Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution of a potato sprout allene oxide synthase involved in a 9-lipoxygenase pathway." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **70**(9): 2160-2168.
- Koo, A J K, Chung, H S, Kobayashi, Y und Howe, G A** (2006). "Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in arabidopsis." Journal of Biological Chemistry **281**(44): 33511-33520.
- Kumar, D und Klessig, D F** (2003). "High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 16101-6.
- Kunze, G, Zipfel, C, Robatzek, S, Niehaus, K, Boller, T und Felix, G** (2004). "The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants." Plant Cell **16**(12): 3496-3507.
- Kwon, C, Neu, C, Pajonk, S, Yun, H S, Lipka, U, Humphry, M, Bau, S, Straus, M, Kwaaitaal, M, Rampelt, H, El Kasmi, F, Jürgens, G, Parker, J, Panstruga, R, Lipka, V und Schulze-Lefert, P** (2008). "Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses." Nature **451**(7180): 835-U10.
- Landgraf, P, Feussner, I, Hunger, A, Scheel, D und Rosahl, S** (2002). "Systemic accumulation of 12-oxo-phytodienoic acid in SAR-induced potato plants." European Journal of Plant Pathology **108**(3): 279-283.
- Lazo, G R, Stein, P A und Ludwig, R A** (1991). "A DNA Transformation-Competent Arabidopsis Genomic Library in Agrobacterium." Bio-Technology **9**(10): 963-967.

- Ledford, H K und Niyogi, K K** (2005). "Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae." Plant Cell and Environment **28**(8): 1037-1045.
- Lees, A K und Hilton, A J** (2003). "Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato." Plant Pathology **52**(1): 3-12.
- Lehrach, H, Diamond, D, Wozney, J M und Boedtke, H** (1977). "RNA Molecular-Weight Determinations by Gel-Electrophoresis under Denaturing Conditions, a Critical Re-Examination." Biochemistry **16**(21): 4743-4751.
- Leyman, B, Geelen, D und Blatt, M R** (2000). "Localization and control of expression of Nt-Syr1, a tobacco snare protein." Plant Journal **24**(3): 369-381.
- Leyman, B, Geelen, D, Quintero, F J und Blatt, M R** (1999). "A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels." Science **283**(5401): 537-540.
- Li, C Y, Schillmiller, A L, Liu, G H, Lee, G I, Jayanty, S, Sageman, C, Vrebalov, J, Giovannoni, J J, Yagi, K, Kobayashi, Y und Howe, G A** (2005). "Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato." Plant Cell **17**(3): 971-986.
- Li, L, Zhao, Y F, McCaig, B C, Wingerd, B A, Wang, J H, Whalon, M E, Pichersky, E und Howe, G A** (2004). "The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development." Plant Cell **16**(1): 126-143.
- Liu, D, Raghothama, K G, Hasegawa, P M und Bressan, R A** (1994). "Osmotin Overexpression in Potato Delays Development of Disease Symptoms." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(5): 1888-1892.
- Loake, G und Grant, M** (2007). "Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists." Curr Opin Plant Biol **10**(5): 466-472.
- Loeffler, C, Berger, S, Guy, A, Durand, T, Bringmann, G, Dreyer, M, von Rad, U, Durner, J und Mueller, M J** (2005). "B-1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses." Plant Physiology **137**(1): 328-340.
- Lorenzo, O und Solano, R** (2005). "Molecular players regulating the jasmonate signalling network." Curr Opin Plant Biol **8**(5): 532-540.
- Lu, M, Tang, X Y und Zhou, J M** (2001). "Arabidopsis NHO1 is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria." Plant Cell **13**(2): 437-447.
- Lucht, J M, Mauch-Mani, B, Steiner, H Y, Métraux, J P, Ryals, J und Hohn, B** (2002). "Pathogen stress increases somatic recombination frequency in Arabidopsis." Nature Genetics **30**(3): 311-314.
- Lukowitz, W, Mayer, U und Jürgens, G** (1996). "Cytokinesis in the Arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product." Cell **84**(1): 61-71.

- Maldonado, A M, Doerner, P, Dixon, R A, Lamb, C J und Cameron, R K** (2002). "A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis." Nature **419**(6905): 399-403.
- Marmey, P, Jalloul, A, Alhamdia, M, Assigbetse, K, Cacas, J L, Voloudakis, A E, Champion, A, Clerivet, A, Montillet, J L und Nicole, M** (2007). "The 9-lipoxygenase *GhLOX1* gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*." Plant Physiology and Biochemistry **45**(8): 596-606.
- Marois, E, Van den Ackerveken, G und Bonas, U** (2002). "The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host." Molecular Plant-Microbe Interactions **15**(7): 637-646.
- Melan, M A, Dong, X N, Endara, M E, Davis, K R, Ausubel, F M und Peterman, T K** (1993). "An *Arabidopsis thaliana* Lipoxygenase Gene Can Be Induced by Pathogens, Abscisic-Acid, and Methyl Jasmonate." Plant Physiology **101**(2): 441-450.
- Melotto, M, Underwood, W, Koczan, J, Nomura, K und He, S Y** (2006). "Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion." Cell **126**(5): 969-980.
- Mène-Saffrané, L, Esquerré-Tugayé, M T und Fournier, J** (2003). "Constitutive expression of an inducible lipoxygenase in transgenic tobacco decreases susceptibility to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*." Molecular Breeding **12**(4): 271-282.
- Miersch, O, Weichert, H, Stenzel, I, Hause, B, Maucher, H, Feussner, I und Wasternack, C** (2004). "Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus) elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves." Phytochemistry **65**(7): 847-856.
- Mita, G, Fasano, P, De Domenico, S, Perrone, G, Epifani, F, Iannacone, R und Santino, A** (2007). "9-Lipoxygenase metabolism is involved in the almond/*Aspergillus carbonarius* interaction." Journal of Experimental Botany **58**(7): 1803-1811.
- Mittal, V, Singh, O, Nayyar, H, Kaur, J und Tewari, R** (2008). "Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2)." Soil Biology & Biochemistry **40**(3): 718-727.
- Montillet, J L, Chamnongpol, S, Rustérucci, C, Dat, J, van de Cotte, B, Agnel, J P, Battesti, C, Inze, D, Van Breusegem, F und Triantaphylidès, C** (2005). "Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves." Plant Physiology **138**(3): 1516-1526.
- Morgan, W und Kamoun, S** (2007). "RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes." Curr Opin Microbiol **10**(4): 332-8.
- Mou, Z, Fan, W H und Dong, X N** (2003). "Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes." Cell **113**(7): 935-944.

- Mucciarelli, M, Scannerini, S, Berteà, C und Maffei, M** (2003). "In vitro and in vivo peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization." New Phytologist **158**(3): 579-591.
- Mucciarelli, M, Scannerini, S, Berteà, C M und Maffei, M** (2002). "An ascomycetous endophyte isolated from *Mentha piperita* L.: biological features and molecular studies." Mycologia **94**(1): 28-39.
- Mueller, M J** (2004). "Archetype signals in plants: the phytoprostanes." Curr Opin Plant Biol **7**(4): 441-448.
- Mueller, S, Hilbert, B, Dueckershoff, K, Roitsch, T, Krischke, M, Mueller, M J und Berger, S** (2008). "General Detoxification and Stress Responses Are Mediated by Oxidized Lipids through TGA transcription Factors in Arabidopsis." Plant Cell **20**(3): 768–785.
- Murashige, T und Skoog, F** (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." Physiologia Plantarum **15**(3): 473-&.
- Mysore, K S und Ryu, C M** (2004). "Nonhost resistance: how much do we know?" Trends Plant Sci **9**(2): 97-104.
- Nandi, A, Welti, R und Shah, J** (2004). "The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene *SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1* is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance." Plant Cell **16**(2): 465-77.
- Narváez-Vásquez, J, Florin-Christensen, J und Ryan, C A** (1999). "Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves." Plant Cell **11**(11): 2249-2260.
- Navarro, L, Zipfel, C, Rowland, O, Keller, I, Robatzek, S, Boller, T und Jones, J D G** (2004). "The transcriptional innate immune response to flg22. interplay and overlap with *Avr* gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis." Plant Physiology **135**(2): 1113-1128.
- Nawrath, C, Heck, S, Parinthewong, N und Métraux, J P** (2002). "EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family." Plant Cell **14**(1): 275-286.
- Nühse, T S, Boller, T und Peck, S C** (2003). "A plasma membrane syntaxin is phosphorylated in response to the bacterial elicitor flagellin." Journal of Biological Chemistry **278**(46): 45248-45254.
- Nürnberg, T und Brunner, F** (2002). "Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns." Curr Opin Plant Biol **5**(4): 318-324.
- Nürnberg, T, Brunner, F, Kemmerling, B und Piater, L** (2004). "Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences." Immunol Rev **198**: 249-66.

Nürnberg, T und Kemmerling, B (2006). "Receptor protein kinases--pattern recognition receptors in plant immunity." Trends Plant Sci **11**(11): 519-22.

Nürnberg, T und Lipka, V (2005). "Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon." Molecular Plant Pathology **6**(3): 335-345.

Nürnberg, T, Nennstiel, D, Jabs, T, Sacks, W R, Hahlbrock, K und Scheel, D (1994). "High-Affinity Binding of a Fungal Oligopeptide Elicitor to Parsley Plasma-Membranes Triggers Multiple Defense Responses." Cell **78**(3): 449-460.

O'Donnell, P J, Schmelz, E A, Moussatche, P, Lund, S T, Jones, J B und Klee, H J (2003). "Susceptible to intolerance - a range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response." Plant Journal **33**(2): 245-257.

Osborn, A E (1996). "Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack." Plant Cell **8**(10): 1821-1831.

Osborn, A E (1999). "Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary." Fungal Genet Biol **26**(3): 163-8.

Papadopoulou, K, Melton, R E, Leggett, M, Daniels, M J und Osborn, A E (1999). "Compromised disease resistance in saponin-deficient plants." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12923-8.

Perfect, S E, Hughes, H B, O'Connell, R J und Green, J R (1999). "*Colletotrichum* - A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions." Fungal Genetics and Biology **27**(2-3): 186-198.

Peškan-Berghöfer, T, Shahollari, B, Giong, P H, Hehl, S, Markert, C, Blanke, V, Kost, G, Varma, A und Oelmüller, R (2004). "Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane." Physiologia Plantarum **122**(4): 465-477.

Peterhänsel, C, Freialdenhoven, A, Kurth, J, Kolsch, R und Schulze-Lefert, P (1997). "Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death." Plant Cell **9**(8): 1397-1409.

Pieterse, C M J, Van Pelt, J A, Van Wees, S C M, Ton, J, Leon-Kloosterziel, K M, Keurentjes, J J B, Verhagen, B W M, Knoester, M, Van der Sluis, I, Bakker, P A H M und Van Loon, L C (2001). "Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: Triggering, signalling and expression." European Journal of Plant Pathology **107**(1): 51-61.

Pieterse, C M J, van Wees, S C M, van Pelt, J A, Knoester, M, Laan, R, Gerrits, N, Weisbeek, P J und van Loon, L C (1998). "A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis." Plant Cell **10**(9): 1571-1580.

Powles, S B (1984). "Photoinhibition of Photosynthesis Induced by Visible-Light." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **35**: 15-44.

Pratelli, J, Sutter, J U und Blatt, M R (2004). "A new catch in the SNARE." Trends in Plant Science **9**(4): 187-195.

- Prost, I, Dhondt, S, Rothe, G, Vicente, J, Rodriguez, M J, Kift, N, Carbonne, F, Griffiths, G, Esquerré-Tugayé, M T, Rosahl, S, Castresana, C, Hamberg, M und Fournier, J** (2005). "Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens." Plant Physiology **139**(4): 1902-1913.
- Rancé, I, Fournier, J und Esquerré-Tugayé, M T** (1998). "The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6554-6559.
- Redman, R S, Dunigan, D D und Rodriguez, R J** (2001). "Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?" New Phytologist **151**(3): 705-716.
- Reyes, I, Valery, A und Valduz, Z** (2006). "Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine." Plant and Soil **287**(1-2): 69-75.
- Robert-Seilaniantz, A, Navarro, L, Bari, R und Jones, J D** (2007). "Pathological hormone imbalances." Curr Opin Plant Biol **10**(4): 372-379.
- Rosahl, S und Feussner, I** (2004). "Oxylipins. In: Murphy, D.J. (Ed.)." Plant Lipids: Biology, Utilisation and Manipulation. Blackwell Publisher, Oxford: 329–354.
- Rowe, R C, Davis, J R, Powelson, M L und Rouse, D I** (1987). "Potato Early Dying - Causal Agents and Management Strategies." Plant Disease **71**(6): 482-489.
- Royo, J, León, J, Vancanneyt, G, Albar, J P, Rosahl, S, Ortego, F, Castañera, P und Sánchez-Serrano, J J** (1999). "Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1146-1151.
- Royo, J, Vancanneyt, G, Pérez, A G, Sanz, C, Störmann, K, Rosahl, S und Sánchez-Serrano, J J** (1996). "Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns." Journal of Biological Chemistry **271**(35): 21012-21019.
- Rustérucci, C, Montillet, J L, Agnel, J P, Battesti, C, Alonso, B, Knoll, A, Bessoule, J J, Etienne, P, Suty, L, Blein, J P und Triantaphylidès, C** (1999). "Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves." Journal of Biological Chemistry **274**(51): 36446-36455.
- Ryals, J A, Neuenschwander, U H, Willits, M G, Molina, A, Steiner, H Y und Hunt, M D** (1996). "Systemic acquired resistance." Plant Cell **8**(10): 1809-1819.
- Ryan, C A, Huffaker, A und Yamaguchi, Y** (2007). "New insights into innate immunity in Arabidopsis." Cellular Microbiology **9**(8): 1902-1908.
- Sambrook, J, Fritsch, E F und Maniatis, T** (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanabria, N, Goring, D, Nürnberger, T und Dubery, I (2008). "Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity." New Phytologist **178**(3): 503-513.

Sanderfoot, A A, Assaad, F F und Raikhel, N V (2000). "The Arabidopsis genome. An abundance of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors." Plant Physiology **124**(4): 1558-1569.

Schaller, F, Biesgen, C, Müssig, C, Altmann, T und Weiler, E W (2000). "12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis." Planta **210**(6): 979-984.

Scheller, R H (1995). "Membrane Trafficking in the Presynaptic Nerve-Terminal." Neuron **14**(5): 893-897.

Schmelz, E A, Engelberth, J, Alborn, H T, O'Donnell, P, Sammons, M, Toshima, H und Tumlinson, J H (2003). "Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(18): 10552-10557.

Schmidt, A, Grimm, R, Schmidt, J, Scheel, D, Strack, D und Rosahl, S (1999). "Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA : Tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase." Journal of Biological Chemistry **274**(7): 4273-4280.

Schulze-Lefert, P (2004). "Knocking on heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall." Curr Opin Plant Biol **7**(4): 377-383.

Schützendübel, A und Polle, A (2002). "Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization." Journal of Experimental Botany **53**(372): 1351-1365.

Seo, H S, Song, J T, Cheong, J J, Lee, Y H, Lee, Y W, Hwang, I, Lee, J S und Choi, Y D (2001). "Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4788-4793.

Seskar, M, Shulaev, V und Raskin, I (1998). "Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants." Plant Physiology **116**(1): 387-392.

Shan, L B, He, P und Sheen, J (2007). "Endless hide-and-seek: Dynamic co-evolution in plant-bacterium warfare." Journal of Integrative Plant Biology **49**(1): 105-111.

Si-Ammour, A, Mauch-Mani, B und 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." Molecular Plant Pathology **4**(4): 237-248.

Siemens, J, Keller, I, Sarx, J, Kunz, S, Schuller, A, Nagel, W, Schmülling, T, Parniske, M und Ludwig-Müller, J (2006). "Transcriptome analysis of Arabidopsis clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development." Molecular Plant-Microbe Interactions **19**(5): 480-494.

Sitte, P und Strasburger, E (1999). Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Heidelberg ; Berlin, Spektrum Akad. Verl.

Staswick, P E (2008). "JAZing up jasmonate signaling." Trends Plant Sci **13**(2): 66-71.

Staswick, P E und Tiryaki, I (2004). "The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis." Plant Cell **16**(8): 2117-2127.

Staswick, P E, Yuen, G Y und Lehman, C C (1998). "Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*." Plant Journal **15**(6): 747-754.

Sticher, L, Mauch-Mani, B und Métraux, J P (1997). "Systemic acquired resistance." Annual Review of Phytopathology **35**: 235-270.

Strawn, M A, Marr, S K, Inoue, K, Inada, N, Zubieta, C und Wildermuth, M C (2007). "Arabidopsis isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses." Journal of Biological Chemistry **282**(8): 5919-5933.

Stumpe, M, Göbel, C, Demchenko, K, Hoffmann, M, Klösgen, R B, Pawlowski, K und Feussner, I (2006). "Identification of an allene oxide synthase (CYP74C) that leads to formation of alpha-ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato." Plant Journal **47**(6): 883-896.

Stumpe, M, Kandzia, R, Göbel, C, Rosahl, S und Feussner, I (2001). "A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells." FEBS Lett **507**(3): 371-6.

Sutter, J U, Campanoni, P, Blatt, M R und Paneque, M (2006). "Setting SNAREs in a different wood." Traffic **7**(6): 627-638.

Takemoto, D, Jones, D A und Hardham, A R (2006). "Re-organization of the cytoskeleton and endoplasmic reticulum in the Arabidopsis *pen1-1* mutant inoculated with the non-adapted powdery mildew pathogen, *Blumeria graminis* f. sp *hordei*." Molecular Plant Pathology **7**(6): 553-563.

Theodoulou, F L, Job, K, Slocombe, S P, Footitt, S, Holdsworth, M, Baker, A, Larson, T R und Graham, I A (2005). "Jasmonoic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes." Plant Physiology **137**(3): 835-840.

Thines, B, Katsir, L, Melotto, M, Niu, Y, Mandaokar, A, Liu, G, Nomura, K, He, S Y, Howe, G A und Browse, J (2007). "JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling." Nature **448**(7154): 661-5.

Thordal-Christensen, H (2003). "Fresh insights into processes of nonhost resistance." Curr Opin Plant Biol **6**(4): 351-7.

- Ton, J und Mauch-Mani, B** (2004). "beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose." Plant Journal **38**(1): 119-130.
- Truman, W, Bennett, M H, Kubigsteltig, I, Turnbull, C und Grant, M** (2007). "Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 1075-1080.
- Tsuda, K, Sato, M, Glazebrook, J, Cohen, J D und Katagiri, F** (2008). "Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses." Plant Journal **53**(5): 763-775.
- Uemura, T, Ueda, T, Ohniwa, R L, Nakano, A, Takeyasu, K und Sato, M H** (2004). "Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: Dissection of the post-Golgi network in plant cells." Cell Structure and Function **29**(2): 49-65.
- Uppalapati, S R, Ayoubi, P, Weng, H, Palmer, D A, Mitchell, R E, Jones, W und Bender, C L** (2005). "The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato." Plant Journal **42**(2): 201-217.
- Vancanneyt, G, Sanz, C, Farmaki, T, Paneque, M, Ortego, F, Castañera, P und Sánchez-Serrano, J J** (2001). "Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 8139-8144.
- Varma, A, Verma, S, Sudha, Sahay, N, Butehorn, B und Franken, P** (1999). "*Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte." Applied and Environmental Microbiology **65**(6): 2741-2744.
- 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." Phytochemical Analysis **13**(1): 45-50.
- Vernooij, B, Friedrich, L, Goy, P A, Staub, T, Kessmann, H und Ryals, J** (1995). "2,6-Dichloroisonicotinic Acid-Induced Resistance to Pathogens without the Accumulation of Salicylic-Acid." Molecular Plant-Microbe Interactions **8**(2): 228-234.
- Véronési, C, Rickauer, M, Fournier, J, Pouénat, M L und Esquerré-Tugayé, M T** (1996). "Lipoxygenase gene expression in the tobacco *Phytophthora parasitica nicotianae* interaction." Plant Physiology **112**(3): 997-1004.
- Waizenegger, I, Lukowitz, W, Assaad, F, Schwarz, H, Jürgens, G und Mayer, U** (2000). "The Arabidopsis KNOLLE and KEULE genes interact to promote vesicle fusion during cytokinesis." Current Biology **10**(21): 1371-1374.
- Wakelin, S A, Gupta, V V S R, Harvey, P R und Ryder, M H** (2007). "The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern Australia." Canadian Journal of Microbiology **53**(1): 106-115.
- Walters, D R, Cowley, T, Weber, H und Nashaat, N L** (2005). "Changes in oxylipins in compatible and incompatible interactions between oilseed rape and the downy mildew pathogen *Peronospora parasitica*." Physiological and Molecular Plant Pathology **67**(3-5): 268-273.

- Wang, D, Amornsiripanitch, N und Dong, X N** (2006). "A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants." PLoS Pathogens **2**(11): 1042-1050.
- Wang, D, Weaver, N D, Kesarwani, M und Dong, X N** (2005). "Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance." Science **308**(5724): 1036-1040.
- Wasternack, C** (2007). "Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development." Annals of Botany **100**(4): 681-697.
- Weber, H, Chetelat, A, Caldelari, D und Farmer, E E** (1999). "Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves." Plant Cell **11**(3): 485-493.
- Weigel, R R, Pfitzner, U M und Gatz, C** (2005). "Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates *PR* gene expression in Arabidopsis." Plant Cell **17**(4): 1279-1291.
- 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 und Waterhouse, P M** (2001). "Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants." Plant Journal **27**(6): 581-590.
- Weymann, K, Hunt, M, Uknes, S, Neuenschwander, U, Lawton, K, Steiner, H Y und Ryals, J** (1995). "Suppression and restoration of lesion formation in Arabidopsis *lsd* mutants." Plant Cell **7**(12): 2013-2022.
- Whitelaw, M A, Harden, T J und Helyar, K R** (1999). "Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*." Soil Biology & Biochemistry **31**(5): 655-665.
- Wick, P, Gansel, X, Oulevey, C, Page, V, Studer, I, Durst, M und Sticher, L** (2003). "The expression of the t-SNARE AtSNAP33 is induced by pathogens and mechanical stimulation." Plant Physiology **132**(1): 343-351.
- Wildermuth, M C, Dewdney, J, Wu, G und Ausubel, F M** (2001). "Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence." Nature **414**(6863): 562-565.
- Xu, L H, Liu, F Q, Lechner, E, Genschik, P, Crosby, W L, Ma, H, Peng, W, Huang, D F und Xie, D X** (2002). "The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis." Plant Cell **14**(8): 1919-1935.
- Yu, D Q, Liu, Y D, Fan, B F, Klessig, D F und Chen, Z X** (1997a). "Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato?" Plant Physiology **115**(2): 343-349.
- Yu, X, Hallett, S G, Sheppard, J und Watson, A K** (1997b). "Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores." Applied Microbiology and Biotechnology **47**(3): 301-305.

Zhang, Z G, Feechan, A, Pedersen, C, Newman, M A, Qiu, J L, Olesen, K L und Thordal-Christensen, H (2007). "A SNARE-protein has opposing functions in penetration resistance and defence signalling pathways." Plant Journal **49**(2): 302-312.

Zimmerli, L, Jakab, C, Métraux, J P und Mauch-Mani, B (2000). "Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta-aminobutyric acid." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12920-12925.

Zimmerli, L, Métraux, J P und Mauch-Mani, B (2001). "beta-aminobutyric acid-induced protection of Arabidopsis against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*." Plant Physiology **126**(2): 517-523.

Zipfel, C und Felix, G (2005). "Plants and animals: a different taste for microbes?" Curr Opin Plant Biol **8**(4): 353-360.

Zolman, B K, Silva, I D und Bartel, B (2001). "The Arabidopsis *pxa1* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation." Plant Physiology **127**(3): 1266-1278.

Ich danke allen Kollegen, meiner Familie und Freunden für die freundliche Unterstützung, den Spaß und die Geduld während meiner Promotion.

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau Dr. Rosahl und Herrn Prof. Scheel, die mir das Thema zur Bearbeitung überließen und mich stets unterstützt haben. Auch den Gutachtern und der Prüfungskommission gilt mein besonderer Dank für ihren Anteil am Verfahren.

Für die nette Arbeitsatmosphäre danke ich besonders meiner Arbeitsgruppe und befreundeten Kaffeetrinkern. Aktuell sind dies Desy, Dierk, Lore, Simone, Michaela, Ulrike, Katrin, Janett, Tilo, Gerit und Claudia B.. Außerdem danke ich der gesamten Abteilung SE für die schöne Zeit und allen „Ehemaligen“ für die nette Wegbegleitung.

Dankend hervorheben möchte ich auch die technische Unterstützung und den Rat bei methodischen Fragen: Ulrike und Angelika danke ich für die vielfältige Unterstützung im Labor; Frau Ortel, Herrn Dr. Miersch, Herrn Steen und Herrn Dr. Kramell danke ich für die Hilfe bei JA-Bestimmungen; Conny und Herrn Prof. Feussner danke ich für die Oxylinbestimmungen; Tilo und Kai danke ich für die kommenden Messungen; Gerit danke ich für die Hilfe bei Western-Blots; Franziska danke ich für die Hilfe bei der Zählung des Mammuts, Olaf und Herrn Prof. Humbeck danke ich für die Möglichkeit, Starklichtexperimente durchführen zu können; Mariela und Herrn Prof. Deising danke ich für die Bereitstellung der *Colletotrichum*-Spezies; Herrn Prof. Mauch danke ich für die Bereitstellung von *P. infestans* 208m2. Außerdem möchte ich ausdrücklich den Handwerkern, den Gärtnern, den Computer-Fachleuten und der Verwaltung für ihre Unterstützung im Arbeitsalltag danken.

Name: Lennart Eschen-Lippold
Adresse: Franz-Andres-Str. 8
06108 Halle / Saale
Geburtsdatum: 15.11.1978
Geburtsort: Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch

1985-86 Ev. Grundschule „Viktoriastraße“, Stadt Troisdorf
1986-89 Grundschule „Tannenweg“, Glinde (Kreis Stormarn)
1989-91 Gymnasium im Schulzentrum Glinde (Kreis Stormarn)
1991-98 Gymnasium „Allee-Altona“, Stadt Hamburg
1998-99 Zivildienst (Bahnhofsmission Hamburg)
1999-2004 Studium der Biologie an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
2004 Abschluss des Studiums mit Diplom
Anfertigung der Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
(AG Rosahl) zum Thema „Entwicklung einer Realtime-PCR basierten Methode
zur Bestimmung des Wachstums von *Phytophthora infestans* auf
Kartoffelpflanzen mit unterschiedlicher Resistenz“
2005-08 Anfertigung der Promotionsarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
(AG Rosahl) zum Thema „Analyse der Funktion des 9-Oxylipin-Stoffwechsels
und von SNARE-Homologen für die Pathogenabwehr der Kartoffel“

Halle / Saale, 17.06.2008