

**Untersuchung des Pathosystems
Arabidopsis thaliana (L.) – *Phytophthora infestans*
und Charakterisierung von Mutanten mit einem veränderten
Nichtwirtsresistenz-Phänotyp**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Jörn Landtag
geb. am 19. September 1974 in Halle (Saale)

Halle (Saale), den 06. März 2006

Verteidigungsdatum: 12. Juli 2006

Inhalt

A	Einleitung	1
1	Grundlagen pflanzlicher Pathogenresistenz.....	1
1.1	Pathogenperzeption	3
1.2	<i>R</i> -Gen-spezifische Wirtsresistenz	4
1.3	Induzierbare pflanzliche Abwehrreaktionen.....	9
1.4	Salizylsäure-abhängige Abwehrreaktionen	13
1.5	Jasmonsäure- und Ethylen-abhängige Abwehrreaktionen.....	15
1.6	„Cross-talk“ der unterschiedlichen Signaltransduktionswege.....	17
1.7	Nichtwirtsresistenz	18
1.7.1	Komponenten der Nichtwirtsresistenz gegen <i>Blumeria graminis</i>	20
1.7.2	Das Nichtwirtspathosystem <i>Arabidopsis thaliana</i> – <i>Phytophthora infestans</i>	22
1.8	Zielsetzung der Arbeit	23
B	Material und Methoden	24
1	Material.....	24
1.1	Laborchemikalien, Enzyme, Radioisotope und Oligonukleotide.....	24
1.2	Organismen und Plasmid-Vektoren	24
1.2.1	Pflanzen	24
1.2.2	Phytopathogene Organismen, Bakterien und Plasmid-Vektoren	24
1.2.3	Oligonukleotide.....	24
1.3	Medien und Kultivierungen	27
1.3.1	Medien und Kultivierung von Bakterien.....	27
1.3.2	Lagerung der Bakterien	27
1.3.3	Herstellung und Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	27
1.3.4	Medien und Kultivierung von Phytopathogenen Organismen	27
1.3.4.1	<i>Phytophthora infestans</i>	28
1.3.4.1.1	Lagerung von <i>Phytophthora infestans</i>	28
1.3.4.2	<i>Alternaria brassicicola</i>	28
1.3.4.2.1	Lagerung von <i>Alternaria brassicicola</i>	28
1.3.4.3	<i>Botrytis cinerea</i>	28
1.3.4.3.1	Lagerung von <i>Botrytis cinerea</i>	29
1.3.5	Substrat und Anzucht von Pflanzen	29
1.3.6	Pathogeninfektion von Pflanzen	29
2	Methoden	29
2.1	Standardmethoden	29
2.2	Nukleinsäureanalytik	30

2.2.1	Isolierung von DNA	30
2.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.1.1.1	Mini-Präparation	30
2.2.1.1.2	Midi-Präparation	30
2.2.1.2	Präparation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
2.2.1.2.1	Mini-Präparation	30
2.2.2	Isolierung von RNA	31
2.2.2.1	Präparation von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
2.2.3	Gelelektrophorese von DNA und RNA	31
2.2.3.1	Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	31
2.2.3.2	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
2.2.3.3	Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen	32
2.2.4	Nachweis spezifischer RNA-Moleküle	33
2.2.4.1	Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern-Blot).....	33
2.2.4.2	Radioaktive Hybridisierung.....	33
2.2.5	Enzymatische Modifikation von DNA.....	33
2.2.5.1	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	34
2.2.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.5.3	Genotypisierung	34
2.2.5.4	Grobkartierung der Sekundärmutation	35
2.2.5.5	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	35
2.2.5.5.1	Automatisierte Sequenzierung	35
2.2.5.5.2	Computergestützte Sequenzanalyse.....	36
2.3	Mikroskopische Analysen	36
2.3.1	Lichtmikroskopische Analyse	36
2.3.1.1	Trypan-Blau-Färbung infizierter Blätter	36
2.3.1.2	DAB-Färbung infizierter Blätter	36
2.3.1.3	Anilin-Blau-Färbung infizierter Blätter	37
2.3.1.4	Kombinierte Trypan-Blau- und Anilin-Blau-Färbung infizierter Blätter.....	37
2.3.1.5	Untersuchung der Autofluoreszenz	37
2.3.2	Elektronenmikroskopische Analyse.....	37
2.4	Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten	38
2.4.1	EMS-Remutagenese von <i>pen2</i> -Samen.....	38
2.4.2	Bestimmung der Penetrations-Häufigkeit	38
2.4.3	Quantifizierung des hypersensitiven Zelltods, der H ₂ O ₂ -Akkumulation und der Autofluoreszenz	39

2.4.4	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
2.4.5	Statistische Auswertung der Daten	39
C	Ergebnisse	40
1	Charakterisierung des Nichtwirts-Pathosystems <i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Phytophthora infestans</i>	40
1.1	Nekrose-Phänotyp nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	40
1.2	Autofluoreszenz-Phänotyp nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	41
1.3	Hypersensitiver Zelltod nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	43
1.4	Zytologische Analyse des Nichtwirts-Pathosystems <i>Arabidopsis thaliana</i> – <i>Phytophthora infestans</i>	44
1.4.1	Trypan-Blau-Färbung: Analyse von Pathogenwachstum und hypersensitivem Zelltod in <i>pen2</i> und <i>gl1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	44
1.4.2	Analyse der Autofluoreszenz in <i>pen2</i> und <i>gl1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	46
1.4.3	DAB-Färbung: Untersuchung der H ₂ O ₂ -Akkumulation in <i>pen2</i> und <i>gl1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	48
1.4.4	Anilin-Blau-Färbung: Untersuchung der Kallose-Akkumulation in <i>pen2</i> und <i>gl1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	50
1.4.5	Elektronenmikroskopische Analyse: Untersuchung von zellulären Feinstrukturen in <i>pen2</i> und <i>gl1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	51
1.4.6	Zytologische Analyse von Col-0, <i>pen1</i> und <i>pen2 pen1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	53
1.5	Untersuchung der Penetrations-Häufigkeit nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	54
1.6	Untersuchung der <i>PR</i> -Genexpression nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	55
1.6.1	<i>PR</i> -Genexpression in <i>gl1</i> und <i>pen2</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	55
1.6.2	<i>PR</i> -Genexpression unterschiedlicher <i>Arabidopsis thaliana</i> -Genotypen nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	57
2	Untersuchung der Nichtwirtsresistenz in unterschiedlichen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten und transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Linien.....	59
2.1	HR-Phänotyp unterschiedlicher <i>Arabidopsis thaliana</i> -Signaltransduktions- Mutanten im <i>pen2</i> -Hintergrund nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	59
2.2	HR-Phänotyp einer <i>NahG</i> exprimierenden <i>Arabidopsis thaliana</i> -Linie im <i>pen2</i> -Hintergrund nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	63
2.3	HR-Phänotyp der <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutante <i>pmr4-1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	63

3	Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	64
3.1	EMS-Remutagenese des <i>pen2</i> -Saatguts	64
3.2	Durchmusterung der M2-Nachkommenschaft der remutagenisierten <i>pen2</i> -Population	64
3.3	Effizienz der Remutagenese des <i>pen2</i> -Saatguts	64
3.4	Primärcharakterisierung putativer <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten in der M2-Nachkommenschaft.....	64
3.5	Untersuchung des Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyps putativer <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten in der M3-Nachkommenschaft.....	66
3.6	Charakterisierung der putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten.....	68
3.6.1	HR-Phänotyp putativer <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	69
3.6.2	Untersuchung der Penetrations-Häufigkeit in putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	70
3.6.3	Hypersensitiver Zelltod in putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	71
3.6.4	H_2O_2 -Akkumulation in putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	73
3.6.5	Zytologische Analyse der putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	75
3.6.5.1	Elektronenmikroskopische Analyse: Untersuchung von zellulären Feinstrukturen in den putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	75
3.6.6	<i>PR</i> -Genexpression in putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	76
3.6.7	Kreuzungsanalysen der putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten 202 und 222	79
3.6.7.1	Segregationsanalysen in den Kartierungspopulationen der putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten 202 und 222	79
3.6.7.2	Grobkartierung der Sekundärmutation 222	82
3.6.7.3	HR-Phänotyp der Doppelmutante 202 / 222 im <i>pen2</i> -Hintergrund nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	85
3.6.8	Untersuchung der Resistenz der putativen Mutanten gegen unterschiedliche nekrotrophe Phytopathogene	87
3.6.8.1	Analyse der Interaktion mit <i>Alternaria brassicicola</i>	87

3.6.8.2	Analyse der Interaktion mit <i>Botrytis cinerea</i>	89
D	Diskussion	91
1	Charakterisierung des Nichtwirts-Pathosystems <i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Phytophthora infestans</i>	91
2	Analyse der Nichtwirtsresistenz gegen <i>Phytophthora infestans</i> in unterschiedlichen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Signaltransduktionsmutanten.....	98
3	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	103
E	Zusammenfassung	112
F	Literatur	114

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AVR	Avirulenz
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
ca.	zirka
CAPS	<i>Cleaved amplified polymorphic sequence</i>
CC	<i>Coiled coil</i>
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv	Kultivar
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
d. h.	das heißt
DIC	<i>Differential interference contrast</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
ET	Ethylen
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
F _(x)	Generation nach Kreuzung (Filialgeneration)
f. sp.	forma specialis
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
gl1	<i>glabrous1</i>
h	Stunde(n)
hpi	Stunde(n) nach Infektion
HR	Hypersensitive Reaktion
JA	Jasmonsäure
L.	Linné
l	Liter

LRR	<i>Leucinrich-repeats</i>
$M_{(x)}$	Generation nach Mutagenese
M	mol/l
min	Minute(n)
ml	Milliliter
<i>NahG</i>	Salizylhydroxylasegen aus <i>Pseudomonas putida</i>
NBS	<i>Nucleotide-binding site</i>
N-Terminus	Aminoterminus, aminoendständiger Aminosäure-Rest
nm	Nanometer
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<i>pen</i>	<i>penetration</i> -Mutanten
PCD	<i>Programmed cell death</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PR	<i>Pathogenesis related</i>
pv	Pathovar
R	Resistenz
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Konstante
SA	Salizylsäure
SAR	Systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSLP	<i>Simple sequence length polymorphism</i>
Tab.	Tabelle
TLR	<i>Toll-like-receptors</i>
U	<i>Unit(s)</i>
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumenanteil(e)
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z. B.	zum Beispiel

A Einleitung

1 Grundlagen pflanzlicher Pathogenresistenz

Pflanzen sind aufgrund ihrer sessilen Lebensweise unterschiedlichen abiotischen und biotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Neben dem Schutz vor lebensfeindlichen klimatischen Einflüssen, wie UV-Strahlung, Trocken- oder Temperaturstress müssen sich Pflanzen ebenso vor einer Vielzahl phytopathogener Organismen, wie Pilzen, Bakterien und Viren schützen.

Durch das komplexe Zusammenwirken verschiedener Abwehrmechanismen stellt die Besiedlung einer Pflanze durch ein Pathogen in ihrer natürlichen Umgebung jedoch eher die Ausnahme dar. Ein Grund hierfür wird in den zu den passiven Abwehrmechanismen gehörenden strukturellen und chemischen Barrieren in der pflanzlichen Zellperipherie gesehen (Kombrink & Somssich, 1995). Strukturelle Modifikationen, wie die Lignifizierung der Zellwand oder die Einlagerung von Cutin und Suberin in die Kutikula bzw. chemische Modifikationen, wie die Zellwandeinlagerung antimikrobiell wirksamer Substanzen (z. B. phenolischer Verbindungen) bilden so eine erste Ebene der Pathogenabwehr (Osborn, 1996). Des Weiteren stellt die präformierte Akkumulation von biologisch inaktiven Vorstufen antibiotischer Substanzen, wie zyanogenen Glykosiden eine weitere Form der passiven Abwehr dar.

Gelingt es dem Pathogen, diese erste Ebene der Abwehr zu durchbrechen, kann die Aktivierung weiterer Abwehrreaktionen eine folgende Parasitierung durch das Pathogen verhindern. Voraussetzung für die Aktivierung von Abwehrmechanismen ist jedoch eine durch die Pflanze erfolgte Erkennung des eindringenden Pathogens als „Nicht-selbst“. Diese Fähigkeit bildet die Grundlage der angeborenen Immunität (*innate immunity*), einem gleichermaßen in pflanzlichen als auch in tierischen Organismen zu findenden Prozess, welcher gegen mikrobielle Infektionen gerichtet ist (Medzhitov & Janeway, 1997; Nürnberger & Scheel, 2001; Nürnberger *et al.*, 2004). Ein Teil der nach Erkennung eines potentiellen Pathogens induzierten Abwehr stellt die transkriptionelle Aktivierung von Abwehr-assoziierten Genen, wie z. B. den *PR*-Genen (*pathogenesis related*; Kombrink & Somssich, 1995; Scheel, 1998; Eulgem, 2005) dar. Neben der Expression eines sogenannten „Abwehr-Transkriptoms“ spielen aber auch posttranskriptionale Modifikationen von Proteinen, z. B. der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) eine Rolle in der induzierten Pathogenabwehr (Scheel, 1998; Bolwell *et al.*, 2002; Jonak *et al.*, 2002). Grundsätzlich unterscheidet man in der pflanzlichen Pathogenresistenz zwei Typen. Die in der Natur vorherrschende Resistenzform ist die Nichtwirtsresistenz, welche auch als Basisinkompatibilität oder Basisresistenz bezeichnet wird (Heath, 2000; Abb. A-1; siehe 1.7, A Einleitung).

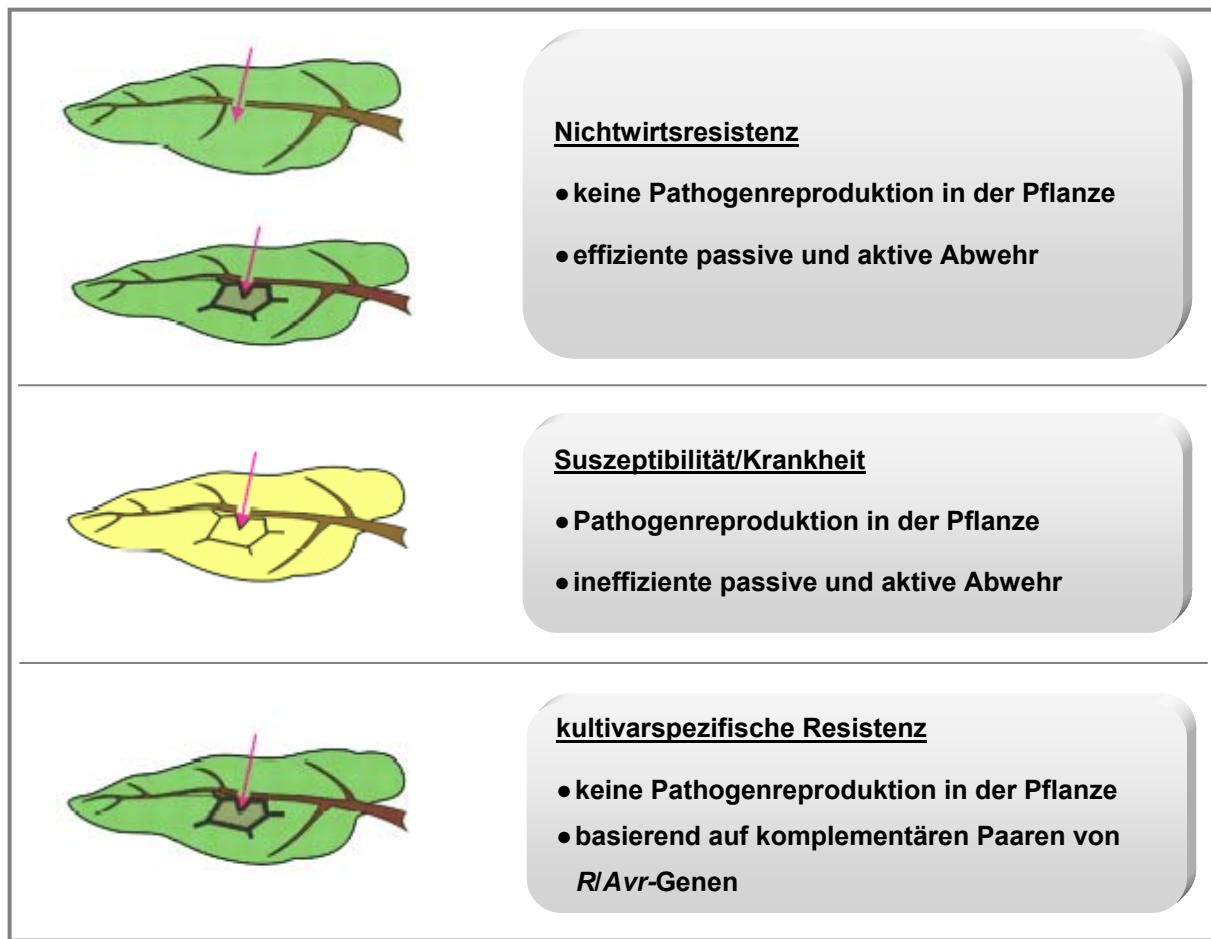


Abb. A-1: Konzepte pflanzlicher Pathogenresistenz (nach Nürnberger *et al.*, 2004).

Einigen Pathogenen ist es im Verlauf der Evolution gelungen, die Basisresistenz bestimmter Pflanzen zu überwinden bzw. zu unterdrücken, was zu einer Besiedlung der anfälligen Wirtspflanzen durch den phytopathogenen Organismus führt.

Diese, vergleichsweise selten, auftretende Wechselwirkung zwischen dem virulenten Pathogen und der suszeptiblen Wirtspflanze wird als kompatible Pflanze-Pathogen-Interaktion bezeichnet (Abb. A-1). Der auf den Wirtspflanzen lastende Selektionsdruck führte jedoch zu resistenten Kultivaren innerhalb der suszeptiblen Pflanzenspezies. Diese Form der Resistenz ist jedoch nur gegen eine oder wenige Pathogenrassen gerichtet und wird daher als rassen- oder kultivarspezifische Wirtsresistenz bezeichnet (Prell *et al.*, 1996; Cohn *et al.*, 2001; Dangl & Jones, 2001; Nürnberger *et al.*, 2004; Abb. A-1). Ein genetisches Modell der Resistenzausprägung in einer solchen inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktion wird durch die von Flor (1971) aufgestellte „Gen-für-Gen-Hypothese“ beschrieben. Danach ist die Inkompatibilität durch die Interaktion von komplementären Paaren der Avirulenzgene (AVR) der eindringenden Pathogene und der dominanten Resistenzgene (R) der Pflanzen determiniert, welche schließlich zur Ausprägung der *R*-Gen-vermittelten Resistenz führt. Es wird angenommen, dass AVR-Proteine primär als Virulenzfaktoren die Kolonisierung suszeptibler Wirtspflanzen ermöglichen und einen

selektiven Vorteil für das Pathogen darstellten. Im Verlauf der Koevolution von Wirtspflanze und virulentem Pathogen erfolgte jedoch eine Erkennung der AVR-Proteine oder deren Funktion durch die *R*-Genprodukte, was zur Ausprägung der kultivarspezifischen Resistenz führte (Collmer, 1998; Galan & Collmer, 1999; Staskawicz *et al.*, 2001). Als sogenannte spezifische Elicitoren sind AVR-Proteine daher in der Lage, *R*-Protein-vermittelte Abwehrreaktionen in resistenten Kultivaren der Wirtspflanzen auszulösen. In Wirtspflanzen, denen die korrespondierenden *R*-Proteine fehlen, d. h. in Abwesenheit einer spezifischen Erkennung des Pathogens, kann die sogenannte basale Abwehr, welche weniger effizient als die *R*-Gen-vermittelte Abwehr ist, die Besiedlung der Wirtspflanze zumindestens limitieren aber nicht verhindern (Glazebrook *et al.*, 1997b).

1.1 Pathogenperzeption

Als Auslöser basaler Abwehrreaktionen sind die als sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*; PAMPs) oder als generelle Elicitoren bezeichneten Signalmoleküle, wie z. B. (Glyko)proteine, Glykolipide, Peptide oder Lipopolysacchride (LPS) beschrieben worden (Boller, 1995; Ebel & Scheel, 1997; Ebel & Mithöfer, 1998; Nürnberger, 1999; Dow, 2000; Heath, 2000). PAMPs sind typischerweise charakteristisch für eine ganze Klasse mikrobieller Pathogene, wie z. B. die pilzlichen Zellwandbestandteile Chitin und Ergosterol oder das bakterielle Flagellin (Granado *et al.*, 1995; Felix *et al.*, 1993). Ein weiteres Merkmal von PAMPs ist ihre stark konservierte Struktur, welche jedoch nicht in potentiellen Wirtsorganismen vorkommt. Außerdem sind PAMPs für bestimmte Lebensfunktionen notwendig und sind daher für das Pathogen von essentieller Bedeutung. Pflanzen sind also in der Lage, mikrobielle Strukturen als „Nicht-selbst“ zu erkennen und in Folge dessen Abwehrreaktionen auszulösen. Wie eingangs erwähnt, zeigt dieser Prozess der Erkennung von „Nicht-selbst“ starke Parallelen mit den Mechanismen der angeborenen Immunität in tierischen Systemen und deutet so auf einen hohen Grad der Konservierung pflanzlicher und tierischer Pathogenerkennungsmechanismen (Medzhitov & Janeway, 2000; Aderem & Ulevitch, 2000; Khush & Lemaitre, 2000; Imler & Hoffmann, 2001; Underhill & Ozinsky, 2002). Die differenzierte Erkennung von Pathogenmustern durch entsprechende Rezeptoren liefern aber auch Hinweise für eine konvergente Evolution der Pathogenperzeptionsysteme innerhalb eukaryontischer Organismen (Zipfel & Felix, 2005).

Aufgrund der für großen strukturellen Diversität der PAMPs wird angenommen, dass unterschiedliche strukturelle Motive durch entsprechende Rezeptoren erkannt werden und Abwehrreaktionen auslösen können. Dabei scheint die Fähigkeit der Wahrnehmung komplexer statt einzelner Pathogenstrukturen die Effizienz der Pathogenabwehr entscheidend zu beeinflussen (Boller, 1995; Ebel & Scheel, 1997; Nürnberger & Brunner, 2002).

Die Bindung des Elicitors an den Rezeptor stellt den ersten Schritt in der vom Pathogen ausgelösten Signaltransduktionskaskade dar (Yang *et al.*, 1997; Grant & Mansfield, 1999). Die

dabei induzierten pflanzlichen Abwehrreaktionen (1.3) sind grundsätzlich relativ ähnlich und unabhängig von der Art des auslösenden Pathogens (Yang *et al.*, 1997; Nürnberger & Scheel, 2001; Xiao *et al.*, 2001). Studien der Elicitor-Rezeptor-Bindung in verschiedenen Pflanze-Pathogen-Interaktionen deuten darauf hin, dass die Bindeproteine genereller Elicitoren als Teil von Multikomponentenkomplexen in der Zelle vorliegen (Mithöfer *et al.*, 2000; Cosio *et al.*, 1992).

Ein detailliert untersuchtes Beispiel der Signalperzeption von PAMPs stellt das aus 22 Aminosäuren bestehende Fragment des bakteriellen Flagellins (flg22) dar. Als Hauptbestandteil der bakteriellen Flagelle bildet Flagellin eine charakteristische Oberflächenstruktur gram-negativer phytopathogener Bakterien und erfüllt daher ein Merkmal der PAMPs. In Untersuchungen von Felix *et al.* (1999) wurde gezeigt, dass flg22 in Tomate und *Arabidopsis* Abwehrreaktionen auslösen kann. Neuere Studien belegen, dass flg22-Perzeption in *Arabidopsis* auch Resistenz gegen bakterielle Pathogene induziert (Zipfel *et al.*, 2004). Mutantenanalysen in *Arabidopsis* führten über die Isolierung Flagellin-insensitiver Mutanten zur Identifizierung der Rezeptorkinase FLS2 (Flagellin-sensing2). Weiterführende Studien belegten, dass entweder direkt oder indirekt eine Erkennung von flg22 durch FLS2 stattfindet (Gomez-Gomez & Boller, 2000; Bauer *et al.*, 2001). Durch Sequenzanalysen wurde einerseits gezeigt, dass FLS2 extrazelluläre leucinreiche Sequenzwiederholungen (leucin-rich-repeats, LRR) sowie eine intrazelluläre Serin/Threonin-Proteinkinase-Domäne besitzt, andererseits wurde eine hohe Homologie des N-Terminus zum Toll-Rezeptor aus *Drosophila melanogaster* bzw. zu den menschlichen TLR-Rezeptoren (Toll-like-receptors) gefunden (Gomez-Gomez & Boller, 2000). Die sehr ähnliche extrazelluläre Struktur des menschlichen TLR5-Rezeptors, welcher bakterielles Flagellin erkennt und des FLS2-Rezeptors stellt ein weiteres Beispiel dar, das die bereits erwähnte evolutionäre Konservierung pflanzlicher als auch tierischer Pathogenerkennung belegt (Hayashi *et al.*, 2001).

Weitere Beispiele der Erkennung charakteristischer Pathogenmuster durch pflanzliche Perzeptionssysteme und deren Funktion als generelle Elicitoren von Abwehrreaktionen stellen das 13 Aminosäuren umfassende Peptidfragment einer Zellwandtransglutaminase aus *Phytophthora sojae* (Pep-13) und die zentrale Region eines RNA-Bindeproteins (RNP-1) gram-positiver Bakterien (Nürnberger *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2002; Felix & Boller, 2003) dar. Während Pep-13 Abwehrreaktionen in Petersilie und Kartoffel elicitiert, ist RNP-1 in der Lage, die Abwehr in Tabak zu induzieren (Nürnberger *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2002; Halim *et al.*, 2004; Felix & Boller, 2003). In beiden PAMPs stellt die für die Abwehr-induzierende Funktion notwendige sowie ausreichende Region eine hochkonservierte Sequenz dar, welche gleichzeitig unverzichtbar für die jeweils essentielle physiologische Funktion ist.

1.2 *R*-Gen-spezifische Wirtsresistenz

In der bereits erwähnten, auf der Interaktion von komplementären *R*/*Avr*-Genprodukten basierenden, kultivarspezifischen Wirtsresistenz führte die Untersuchung zahlreicher

Pathosysteme zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der *R*-Gen-spezifischen Resistenz. Eine Klassifizierung der *R*-Proteine erfolgte in Abhängigkeit von Strukturmerkmalen in fünf Klassen, wobei jedoch eine grundsätzliche Typisierung in die Gruppe der *R*-Proteine mit extrazellulären oder intrazellulären leucinreichen Regionen (*leucine-rich repeats*; LRRs) gemacht wird (Dangl & Jones, 2001). Die zentrale Nukleotid-Bindungs-Stelle (*nucleotide-binding site*; NBS) ist ein gemeinsames Strukturmerkmal der meisten LRR-Proteine, welche für die Bindung bzw. Hydrolyse eines ATPs verantwortlich ist und potentiell eine Funktion in der Signaltransduktion hat (Tameling *et al.*, 2002). Die Gruppe der *R*-Proteine mit intrazellulären LRRs besitzt Amino-terminal entweder eine „*coiled-coil*“-Struktur (CC) oder die bereits erwähnte TIR-Domäne. Durch genetische Analysen wurden unterschiedliche Mutanten mit einem Verlust der Resistenz gegen avirulente Pathogene isoliert. Die Identifizierung der Mutanten zeigte, dass die korrespondierenden Gene für NBS-LRR-Proteine kodierenden, denen daher eine prinzipielle Funktion in der Resistenzausprägung gegen avirulente Pathogene zugeordnet wird (Holt *et al.*, 2003).

Unabhängig von strukturellen Merkmalen besitzen alle *R*-Proteine das Potential, AVR-Proteine direkt oder indirekt zu erkennen und infolgedessen durch Transduktion eines Signals Abwehrreaktionen in der Zelle auszulösen. Experimentelle Hinweise, welche eine direkte Interaktion von *R*- und AVR-Protein belegen (Rezeptor-Ligand-Modell) sind bisher selten beschrieben worden. Die physische Interaktion eines Liganden mit dem korrespondierenden *R*-Protein ist beispielweise für die Interaktion des *R*-Proteins PI-TA aus Reis mit dem AVR-Protein aus *Magnaporthe grisea* PITA nachgewiesen worden (Jia *et al.*, 2000).

Vielmehr wird angenommen, dass *R*-Proteine durch eine indirekte Erkennung von AVR-Proteinen, z. B. durch Erkennung der AVR-Funktion, in der Lage sind, Abwehr zu induzieren. Das als „*guard hypothesis*“ bezeichnete Modell der *R*-Gen-Funktion nimmt an, dass *R*-Proteine eine „Überwachungsfunktion“ in der Zelle übernehmen und daher auf Veränderungen von Zielmolekülen, welche in der Gegenwart der AVR-Proteine potentiell modifiziert vorliegen, reagieren und Resistenz aktivieren (Van der Biezen & Jones, 1998; Dangl & Jones, 2001). Das Modell setzt voraus, dass in Abwesenheit komplementärer *R*-Genprodukte die Avr-Genprodukte zelluläre Proteine modifizieren und so durch Störung der Wirtszellhomöostase als Virulenzfaktoren die Krankheit der Wirtspflanze auslösen (Belkhadir *et al.*, 2004). Experimentelle Daten hierfür kommen hauptsächlich aus Untersuchungen der Interaktion von *R*-Proteinen mit bakteriellen AVR-Proteinen (Effektorproteinen), welche über das *Typ-III(Three)-Sekretionssystem* (TTSS) bakterieller Phytopathogene direkt in pflanzliche Zellen injiziert werden (Nimchuk *et al.*, 2001, Staskawicz *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass RIN4 (*RESISTANCE to PSEUDOMONAS SYRINGAE* pv *MACULICOLA1* *INTERACTOR* 4) ein Zielmolekül von drei unterschiedlichen TTSS-Effektorproteinen, AVR-RPM1 (AVR-*RESISTANCE to P. SYRINGAE* pv *MACULICOLA1*), AVR-RPT2 (AVR-*RESISTANCE to P. SYRINGAE* pv *TOMATO2*) und AVR-B (AVR-*proteinB* from *P.*

SYRINGAE pv *GLYCNEA*) darstellt und *in vivo* mit diesen AVR-Proteinen interagiert (Mackey *et al.*, 2002; Mackey *et al.*, 2003; Axtell & Staskawicz, 2003). Es wird angenommen, dass durch die Bindung der Effektorproteine an RIN4 dessen Funktion als negativer Regulator der basalen Abwehr stimuliert wird (Mackey *et al.*, 2003; Axtell & Staskawicz, 2003; Kim *et al.*, 2005; Lim & Kunkel, 2004). Eine von der AVR/R-Protein-Interaktion unabhängige Funktion von RIN4 in der Regulation der PAMP-induzierten basalen Abwehr ist in Untersuchungen von Kim *et al.* (2005) demonstriert worden. Die experimentelle Befunde zeigen, dass die Überexpression von RIN4 eine Suppression der Kallose-Auflagerungen sowie der *PR*-Genexpression nach *flg22*-Induzierung bewirkt. Übereinstimmend damit reagieren *flg22*-behandelte *rin4*-Mutanten mit einer verstärkt aktivierbaren Kallose-Akkumulation und *PR*-Genexpression.

In resistenten Kultivaren erfolgt möglicherweise eine indirekte Wahrnehmung der Störung der RIN4-Funktion über die R-Proteine RPM1 und RPS2. Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von RIN4 (im Fall von AVR-RPM1 und AVR-B) bzw. die proteolytische Eliminierung von RIN4 (im Fall von AVR-RPT2) durch die entsprechenden R-Proteine wahrgenommen werden (Mackey *et al.*, 2003; Axtell & Staskawicz, 2003; Day *et al.* 2005).

Einen weiteren Hinweis für die indirekte Aktivierung von R-Proteinen liefert das Beispiel von RPS5 (RESISTANCE to *P. SYRINGAE*5), einem NBS-LRR-R-Protein, welches Resistenz gegen AVR-PPHB (AVR-gene B FROM *P. SYRINGAE* pv PHASEOLICOLA)-exprimierende Stämme von *P. syringae* vermittelt (Warren *et al.*, 1998). Die Erkennung von AVR-PPHB durch RPS5 erfordert die Proteinkinase PBS1 (AVR-PPHB SUSCEPTIBLE1), welche ein direktes Substrat der Zystein-Protease AVR-PPHB ist. Es wurde gezeigt, dass die Spaltung von PBS1 sowie die Kinaseaktivität für die RPS5-vermittelte Resistenz notwendig ist (Shao *et al.*, 2003). Die Erkennung des AVR-Proteins PphB durch RPS5 erfolgt also auch hier indirekt durch Wahrnehmung des durch Spaltung modifizierten Zielmoleküls PBS1. Diese und weitere experimentellen Befunde der molekularen Funktion der R-Gene lassen die Richtigkeit der „guard-hypothesis“ als sehr wahrscheinlich erscheinen (van der Hoorn *et al.*, 2002; Mackey *et al.*, 2003; Axtell & Staskawicz, 2003; Lim & Kunkel, 2004; Day *et al.*, 2005).

Als eine weitere Komponente in der Regulation von R-Proteinkomplexen einiger NBS-LRR-Proteine ist zytosolisches HSP90 (HEAT SHOCK PROTEIN90) beschrieben worden (Schulze-Lefert, 2004; Hubert *et al.*, 2003). HSP90 scheint eine Funktion in der Aufrechterhaltung und Stabilisierung eines Aktivierungs-kompetenten R-Proteinkomplexes in Abwesenheit eines Pathogenstimulus zu haben (Pratt & Toft, 2003). Die Notwendigkeit eines durch negative Regulatoren deaktivierten und stabilisierten Komplexes in Abwesenheit eines Pathogens erscheint sinnvoll, um eine unkontrollierte Signaltransduktion durch basale R-Proteinaktivität zu vermeiden (Belkhadir *et al.*, 2004; Shirasu & Schulze-Lefert, 2003). In Anwesenheit eines Pathogens ist es im Gegensatz dazu notwendig, über eine destabilisierende und Degradations-sensitive Konformationsänderung einen aktivierte Zustand des R-Proteins, d. h. die Signaltransduktion zu

ermöglichen (Moffett *et al.*, 2002; Bendahmane *et al.*, 2002). Es ist davon auszugehen, dass HSP90 über intra- und intermolekulare Wechselwirkungen unter Beteiligung weiterer Kochaperone Einfluss auf die Stabilität und Aktivität von R-Protein-Erkennungskomplexen nimmt (Belkhadir *et al.*, 2004; Sangster & Queitsch, 2005).

Eine Unterstützung der Annahme der durch intramolekulare Interaktion bewirkten Regulation in der *R*-Gen-vermittelten Signaltransduktion lieferten Untersuchungen von Moffett *et al.*, (2002). Es wurde gezeigt, dass die *in vivo*-Interaktion zwischen der NBS-LRR-Domäne und der N-terminalen CC-Domäne des R-Proteins RX (*RESISTANCE to POTATO VIRUS X*) aus Kartoffel durch PVX *coat protein* (*POTATO VIRUS X*) verhindert werden kann, was zu der Annahme führte, dass die PVX-vermittelte Aktivierung von RX durch Inhibierung intramolekularer Interaktionen erfolgt.

Durch Mutantenanalysen, welche hauptsächlich in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt wurden, konnte in der Vergangenheit eine zunehmende Zahl von Komponenten identifiziert werden, für die eine Rolle in der *R*-Gen-vermittelten Resistenz belegt worden ist. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Signaltransduktion in der durch NBS-LRR-R-Proteine vermittelten Resistenz grundsätzlich durch zwei, von der Struktur des N-Terminus des R-Proteins abhängige Wege erfolgen. Mit einigen Ausnahmen transduzieren TIR-NBS-LRR R-Proteine über *EDS1*- und CC-NBS-LRR R-Proteine über *NDR1*-abhängige abhängige Signalkaskaden (Aarts *et al.*, 1998).

Die Identifizierung von *EDS1* (*ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1*) erfolgte nach Durchmusterung von Mutanten mit einer erhöhten Anfälligkeit gegen virulente Stämme von *Pseudomonas syringae* bzw. virulente Rassen des Oomyzeten *Hyaloperonospora parasitica* (Glazebrook *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1996). Die Mutante *ndr1* (*nonrace-specific disease resistance1*) wurde in einer Durchmusterung von *A. thaliana*-Mutanten mit einem Verlust der Resistenz gegen den avirulenten *P. syringae* pv *tomato*-Stamm DC3000 (*avrB*) isoliert (Century *et al.*, 1995; 1997). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die biochemische Funktion des Membran-lokalierten *NDR1* gegenwärtig noch unklar ist. Ein Verlust der Funktion von *EDS1* und *NDR1* führt zur Störung der *R*-Gen-vermittelten Signaltransduktion bzw. zur Anfälligkeit gegenüber ansonsten avirulenter Pathogene.

Weiterhin wurde gezeigt, dass neben *EDS1* auch *PAD4* (*PHYTOALEXIN DEFICIENT4*) für die Signaltransduktion von TIR-NBS-LRR R-Proteinen notwendig ist (Glazebrook *et al.*, 1996; Feys *et al.*, 2001). Die von Feys *et al.* (2001) demonstrierte *in vivo*-Interaktion von *EDS1* und *PAD4* unterstützt das Modell einer gemeinsamen Funktion von *EDS1* und *PAD4* in der *R*-Gen-vermittelten Resistenz. Obwohl eine katalytische Funktion von *EDS1* und *PAD4* bisher nicht gezeigt wurde, wird angenommen, dass die Homologie beider Komponenten zu eukaryontischen Lipasen sowie die Funktion als positive Regulatoren der Salizylsäure (*salicylic acid*; SA)-Akkumulation ein Hinweis für eine mögliche Beteiligung von *EDS1* und *PAD4* an der Lipid-

abhängigen SA-Signaltransduktion liefert (Falk *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1998; Wiermer *et al.*, 2005). Als ein weiterer Interaktionspartner von EDS1 ist kürzlich SAG101 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101) identifiziert worden, welches in Kombination mit PAD4 eine Funktion in der EDS1-abhängigen Resistenz hat (Feys *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass SAG101 als Komplex mit EDS1 im Gegensatz zu den im Zytosol und im Zellkern befindlichen EDS1-Komplexen ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass EDS1 eine potentielle Funktion in der Stabilisierung der Komponenten PAD4 und SAG101 hat, wobei ebenso eine Stabilisierung von EDS1 durch Komplexbildung mit PAD4 und SAG101 erfolgt. Es wird angenommen, dass PAD4 und SAG101 neben der Stabilisierung von EDS1 auch eine Funktion als Signalkomponente in der durch TIR-NBS-LRR R-Proteine ausgelösten Signaltransduktion haben. Die Zellkompartiment-abhängigen dynamischen Interaktionen von EDS1 scheinen daher entscheidende Funktionen in der *R*-Gen-spezifischen Resistenz zu haben.

Die Betrachtungsweise einer vom Strukturtyp des entsprechenden R-Proteins abhängigen, entweder durch *EDS1*- oder *NDR1*-vermittelten *R*-Gen-Resistenzausprägung musste jedoch nach der Identifizierung zweier weiterer Komponenten, RAR1 (REQUIRED for MLA12 RESISTANCE1) und SGT1 (SUPPRESSOR of G-TWO ALLELE of SUPPRESSOR of KINETOCROME PROTEIN1) erweitert werden.

RAR1 ist erstmals in Mutantenanalysen in Gerste (*Hordeum vulgare*) isoliert worden und scheint ein Konvergenzpunkt in der Kultivarspezifischen Wirtsresistenz gegen zahlreiche Mehltau-Isolate zu sein (Shirasu *et al.*, 1999). Untersuchungen des RAR1-Homologs in *Arabidopsis* deuten auch hier auf eine konservierte Funktion von *RAR1* in der *R*-Gen-spezifischen Resistenz gegen Pathogene verschiedener Klassen, welche von R-Proteinen des CC-NBS-LRR- als auch des TIR-NBS-LRR-Typs vermittelt werden (Muskett *et al.*, 2002; Torneo *et al.*, 2002). Sequenzvergleiche zeigten, dass RAR1 zwei zinkbindende Domänen (zystein- und histidinreiche Domäne; CHORD I und II) sowie eine CS-Domäne (CHORD and SGT1-motif) aufweist und innerhalb des eukaryontischen Reiches hoch konserviert ist. Tatsächlich konnten Interaktionsstudien mit verschiedenen Pflanzen-Proteinextrakten eine direkte physische Interaktion von RAR1 und SGT1 nachweisen (Azevedo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). Eine Mutation in einem von zwei sequenzverwandten *Arabidopsis SGT1*-Genen, *SGT1b*, führte zur Störung einer Reihe von sowohl TIR- als auch CC-NBS-LRR-R-Protein-vermittelter Resistenzen gegen den Oomyzet *H. parasitica* (Austin *et al.*, 2002; Tör *et al.*, 2002). Obwohl RAR1 und SGT1 in *Arabidopsis* physisch interagieren und als Komplex vorliegen, sind für verschiedene R-Proteine aus *Arabidopsis* unterschiedliche Notwendigkeiten der Beteiligung von RAR1, SGT1 bzw. RAR1 und SGT1 in Kombination an der *R*-Gen-vermittelten Resistenz gezeigt worden (Muskett *et al.*, 2002; Torneo *et al.*, 2002; Austin *et al.*, 2002). So belegen Untersuchungen von Torneo *et al.* (2002), dass das R-Protein RPM1 in der *rar1*-Mutante destabilisiert vorliegt. Es wird angenommen, dass RAR1

und/oder SGT1, ähnlich der erwähnten Funktion von zytosolischem HSP90, als Kochaperone für die Zusammensetzung einiger, jedoch nicht aller R-Protein-Erkennungskomplexe notwendig sind (Gray *et al.*, 2003; Shirasu & Schulze-Lefert, 2003). In Studien von Takahashi *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass die direkte Interaktion von HSP90, RAR1 und SGT1 für die Ausprägung der RPS2-vermittelten Resistenz notwendig ist. RAR1 und SGT1 scheinen daher gemeinsame und unterschiedliche Funktionen in der *R*-Gen-vermittelten Wirtsresistenz zu haben.

Durch Identifizierung von SGT1-*in vivo*-Interaktoren wurde weiter zur Aufklärung von *R*-Gen-vermittelten Resistenzmechanismen beigetragen. Parallelen zu zellulären Ubiquitinierungsprozessen wurden nach Untersuchung der SGT1-Interaktoren SKP1 (S-phase kinase associated protein1) und CUL1 (CULLIN1), welche Komponenten des SCF (SKP1-CULLIN-E-BOX)-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes darstellen, erstmals beobachtet (Kitagawa *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). SCF-Komplexe vermitteln die Ubiquitinierung und Degradation von Proteinen durch das 26S-Proteasom und könnten somit eine spezifische Funktion in der Stabilisierung bzw. Destabilisierung, d. h. in der Regulation von Resistenz-vermittelnden Proteinkomplexen haben. Experimentelle Hinweise für die Beteiligung von SCF-Komplexen in der *R*-Gen-Resistenz kommen aus *gene-silencing*-Studien in *N. benthamiana*. Das Inaktivieren von SKP1-Genen führte zu einer Beeinträchtigung der *N*-Gen-vermittelten Resistenz gegen das Tabak-Mosaik-Virus (Liu *et al.*, 2002).

Ein strukturell von den zuvor beschriebenen und durch LRR-Domänen gekennzeichneten *R*-Genen stellt das *R*-Gen *RPW8* (RESISTANCE to POWDERY MILDEW8) dar, welches zu einer Resistenzausprägung gegen mehrere Mehltaupilze in *Arabidopsis* notwendig ist (Xiao *et al.*, 2001). RPW8 besitzt lediglich ein CC-Motiv sowie eine Transmembran-Domäne. Neben EDS1 und PAD4 ist die RPW8-vermittelte Resistenz auch abhängig von SGT1 jedoch unabhängig von RAR1 und NDR1 (Hammond-Kosack & Parker, 2003; Xiao *et al.*, 2005). Ergänzend in der Reihe der vom NBS-LRR-Strukturtyp abweichenden *R*-Proteine ist die intrazelluläre Proteinkinase PTO aus Tomate zu erwähnen, welche Resistenz gegen *P. syringae* (*avrPto*)-Stämme vermittelt (Martin *et al.*, 1993). Die durch PTO vermittelte Resistenz ist abhängig von dem NBS-LRR Protein PRF (PSEUDOMONAS RESISTANCE and FENTHION SENSITIVITY) sowie von RAR1 (Salmeron *et al.*, 1996). Die Resistenzmechanismen der atypischen *R*-Gene RPW8 und Pto liefern somit einen Hinweis, dass sowohl LRR- als auch nicht-LRR-R-Proteine Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Wege oder Konvergenzpunkte in der *R*-Gen-spezifischen Signaltransduktion zeigen (Bonas & Lahaye, 2002).

1.3 Induzierbare pflanzliche Abwehrreaktionen

Wie eingangs erwähnt stellt die Gesamtheit der passiven und aktiven Abwehr einen zumeist effizienten Mechanismus der Pflanzen dar, um eindringende Pathogene abzuwehren. Dabei sind die nach Pathogenerkennung ausgelösten intrazellulären Signaltransduktionskaskaden bzw. die

dadurch induzierten Abwehrreaktionen grundsätzlich ähnlich und unabhängig vom Typ der Pflanze-Pathogen-Interaktion (Yang *et al.*, 1997; Nürnberger und Scheel, 2001).

Eine unmittelbar nach spezifischer oder genereller Elicitierung beobachtete Reaktion stellt die Aktivierung von Ionenkanälen in der Plasmamembran bzw. der nachfolgende Efflux von Cl^- und K^+ sowie Influx von H^+ und Ca^{2+} dar (Atkinson *et al.*, 1996; Gelli *et al.*, 1997; Jabs *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Blatt *et al.*, 1999; Klüsener & Weiler, 1999). So wurde in Petersilie-Zellkulturen gezeigt, dass ein transienter Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Generierung extrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Superoxidanionen (O_2^-) notwendig ist (Blume *et al.*, 2000). Dieser als „*oxidative burst*“ bezeichnete Prozess der Pathogen-induzierten Akkumulation von ROS, welcher durch Plasmamembran-lokalierte NADPH (reduzierte Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)-Oxidasen und apoplastische Peroxidasen katalysiert wird, scheint auf mehreren Ebenen in der Pathogenabwehr involviert zu sein. So wird neben einer direkten toxischen Eigenschaft von H_2O_2 eine Beteiligung von ROS an der oxidativen Quervernetzung der Zellwand sowie in der Signaltransduktion (H_2O_2) nach Pathogenbefall beschrieben (Bradley *et al.*, 1992; Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Lamb & Dixon, 1997). In Petersilie und *Arabidopsis* wurde eine Beteiligung von H_2O_2 bzw. O_2^- an der Auslösung unterschiedlicher Abwehrreaktionen nach Elicitierung bzw. Pathogeninfektion gezeigt (Jabs *et al.*, 1996; Jabs *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 1998).

Des Weiteren ist die kombinierte Funktion von ROS, Ca^{2+} und Stickstoffmonoxid (NO) während der transkriptionellen Aktivierung pflanzlicher Abwehrgene beschrieben worden (Durner *et al.*, 1998; Klessig *et al.*, 2000; Wendehenne *et al.*, 2004). Eine Abhängigkeit von intrazellulärem Ca^{2+} ist beispielsweise für die Bildung von ROS aber auch für die Aktivierung von kalziumabhängigen Proteinkinasen (*calcium-dependent protein kinases*; CDPKs) und Calmodulin demonstriert worden (Romeis *et al.*, 2001; Heo *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2002). Sowohl CDPKs als auch Calmodulin haben essentielle Funktionen in der Aktivierung pflanzlicher Abwehrreaktionen.

Eine weitere häufig beobachtete Abwehrreaktion in der Pflanze-Pathogen-Interaktion ist die hypersensitive Reaktion (HR), welche durch ein lokal begrenztes Absterben pflanzlicher Zellen unmittelbar am Infektionsort gekennzeichnet ist und Ähnlichkeiten mit dem Prozess der Apoptose in tierischen Systemen aufweist (Lam *et al.*, 2001; Beers & McDowell, 2001; Lam, 2004). So ist eine Beteiligung von ROS an der Aktivierung des programmierten Zelltods (*programmed cell death*; PCD) für Pflanzen und Tiere gleichermaßen beschrieben worden (Lam *et al.*, 2001; Ameisen, 2002). Neuere Studien unterstützen dabei die Annahme, dass ROS eine Rolle als Signaltransduktionskomponenten in der pflanzlichen Zelltod-Reaktion spielen (Kachroo *et al.*, 2003; Dat *et al.*, 2003; Yoda *et al.*, 2003). Der erste Beleg für die Beteiligung pflanzlicher NADPH-Oxidasen an der Generierung von ROS und deren Beteiligung am hypersensitiven Zelltod wurde durch Untersuchung der *Arabidopsis respiratory burst oxidase homologues*-Gene, *rbohD* und

rbohF gezeigt (Torres *et al.*, 2002). Ein Verlust der Funktion beider Gene führte zu einer Abnahme der ROS-Akkumulation und zu einem abgeschwächten hypersensitiven Zelltod nach Pathogeninfektion.

Die Aufklärung der in Pflanzen ablaufenden PCD-Prozesse, insbesondere der nach Pathogeninfektion induzierten HR ist durch die Identifizierung der Pflanzen-spezifischen PCD-Regulatoren aus *Arabidopsis* (*LESIONS SIMULATING DISEASE1*; LSD1) und Gerste (MLO) entscheidend vorangetrieben worden (Jabs *et al.*, 1996; Piffanelli *et al.*, 2002). Genetische Studien der *lsd1*-Mutante deuten auf eine Schlüssel-Funktion von LSD1 als negativer Regulator des nach Pathogenstimulus ausgelösten PCDs hin, wobei noch unklar ist, ob LSD1 eine spezifische Funktion in dem Pathogen-induzierten PCD hat oder auch andere Formen des PCDs in Pflanzen kontrolliert (Aviv *et al.*, 2002; Lam *et al.*, 2004).

Die Untersuchung von *mlo*-Mutanten in Gerste zeigte, dass der Verlust der MLO-Funktion zu einem spontan, d. h. ohne äußeren Stimulus aktivierten PCD und zu einer erhöhten Pathogenresistenz führt, was eine Eigenschaft von MLO als Suppressor der Zelltod-Aktivierung und der Pathogenresistenz in Gerste nahelegt (Piffanelli *et al.*, 2002). Es wurde außerdem gezeigt, dass die MLO-Suppressor-Funktion von dem Ca^{2+} -Sensor Calmodulin positiv reguliert wird, was ein Hinweis für eine direkte Modulation der Regulatoren pflanzlicher Pathogenabwehr durch Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen darstellt (Kim *et al.*, 2002; Lam, 2004; Bhat *et al.*, 2005).

Ein weiteres wesentliches Element in der Signaltransduktion während der pflanzlichen Pathogenabwehr stellen die MAPK-Kaskaden dar (Zhang & Klessig, 2001; Jonak *et al.*, 2002; Bent, 2001). MAPK stellen die Endglieder in der nach Pathogenerkennung ausgelösten Signaltransduktionskaskade dar. Die durch Transphosphorylierung erfolgte posttranskriptionale Modifikation der MAPK bewirkt eine transkriptionelle Aktivierung unterschiedlicher Zielgene. So wurde in Petersilie-Zellkulturen die Beteiligung einer nach Elicitierung mit Pep13 in den Zellkern translozierten MAPK an der Induzierung einer von WRKY-Transkriptionsfaktoren abhängigen Abwehrgenexpression beobachtet (Ligterink *et al.*, 1997; Kroj *et al.*, 2003). Weitere experimentelle Befunde aus Analysen transgener Tabakpflanzen, welche konstitutiv aktive MAPK exprimieren, belegen eine Korrelation von MAPK-Aktivierung und *PR*-Genexpression (Yang *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2002). Ebenso ist aber auch eine negative Regulation von pflanzlichen Abwehrreaktionen durch Aktivierung von MAPK beschrieben worden (Petersen *et al.*, 2000; Frye *et al.*, 2001). Beispielsweise führt der Verlust der Funktion des Gens *EDR1* (*ENHANCED DISEASE RESISTANCE1*), welches für eine MAPK-Kinase-Kinase kodiert, in der *Arabidopsis*-Mutante *edr1-1* zu einer erhöhten Resistenz gegen den Mehltaupilz *E. cichoracearum* (Frye *et al.*, 2001). Eine verstärkte Pathogenresistenz ist auch für die *A. thaliana*-Mutante *mpk4* gezeigt worden (Petersen *et al.*, 2000). Die nach Mutation in *AtMPK4* beobachtete erhöhte Pathogenresistenz korreliert außerdem mit einer konstitutiven *PR*-Genexpression sowie erhöhter SA-Akkumulation und liefert daher ein weiteres Beispiel der durch MAPKs negativ regulierten Pathogenabwehr.

Ein in vielen Pflanzen-Spezies beobachtetes Phänomen ist die durch lokale Pathogeninfektion bzw. durch die daraus resultierenden lokalen Abwehrreaktionen induzierte systemische Resistenz in entfernten nicht infizierten Pflanzenteilen. Für die systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance*; SAR), welche durch eine Pathogen-unspezifische und längere Zeit anhaltende systemische Abwehr charakterisiert ist, scheint Salizylsäure (*salicylic acid*; SA) eine herausragende Bedeutung zu haben. (Ryals *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 2001). Experimentelle Hinweise belegen, dass SA notwendig und zugleich hinreichend für die Ausprägung der SAR ist (Ryals *et al.*, 1996). Obwohl SA in verschiedenen Pflanzenteilen nachgewiesen worden ist, scheint es jedoch nicht als mobiles Signal in der SAR in Frage zu kommen (Sticher *et al.*, 1997). Die Identifizierung von *DIR1* (*DEFECTIVE in INDUCED RESISTANCE1*), welches für ein apoplastisches putatives Lipid-Transferprotein kodiert, demonstriert, dass möglicherweise Lipid-ähnliche Signalmoleküle Bedeutung in der Signalübermittlung der SAR haben (Maldonado *et al.*, 2002). Einen weiteren Hinweis dafür lieferte *SFD1* (*SUPPRESSOR of FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1*), welches zur SAR in *Arabidopsis* notwendig ist und ebenfalls im Lipid-Metabolismus involviert ist (Nandi *et al.*, 2004).

Ein charakteristisches Merkmal für die in der SAR beobachtete systemische Abwehr stellt die SA-abhängige Expression verschiedener *PR*-Gene, welche z. B. für 1,3- β -Glukanasen, Chitininasen oder PR1-Proteine kodieren, dar (Ryals *et al.*, 1996).

Eine weitere Form der systemischen Resistenz, die *induzierte systemische Resistenz* (ISR) ist im Gegensatz dazu SA-unabhängig bzw. Jasmonat- (*jasmonic acid*; JA) sowie Ethylen (*ethylene*; ET)-abhängig und kann durch nichtpathogene Wurzelbakterien hervorgerufen werden (Pieterse *et al.*, 1998; 2001; Penninckx *et al.*, 1998).

Generell kann gesagt werden, dass Pflanzen in Abhängigkeit von der Art des eindringenden Pathogens ein komplexes Programm SA- und/oder JA/ET-abhängiger Signaltransduktionswege zur Auslösung zumeist effizienter Abwehrreaktionen nutzen. Es wird angenommen, dass nekrotrophe Pathogene grundsätzlich durch SA-unabhängige Abwehrmechanismen kontrolliert werden bzw. SA-abhängige Abwehrreaktionen in der Pflanze unterdrücken (Thomma *et al.*, 2001; Oliver & Ipcho, 2004). Im Gegensatz dazu werden biotrophe Pathogene in den meisten Fällen durch eine SA-abhängige Abwehr effizient an der Besiedlung der Pflanze gehindert (Ton *et al.*, 2002).

Es gilt als sehr wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Signalwege weniger unabhängig voneinander als vielmehr durch ein komplexes, durch positive und negative Regulation einzelner Signalkomponenten gestaltetes Netzwerk, dem „*signaling cross-talk*“ agieren (Thomma *et al.*, 2001; Kunkel & Brooks, 2002; Glazebrook *et al.*, 2003; Glazebrook, 2005).

1.4 Salizylsäure-abhängige Abwehrreaktionen

Genetische Analysen haben bereits seit längerem gezeigt, dass zur Aktivierung von lokalen Abwehrreaktionen (z. B. HR) als auch zur Ausprägung systemischer Resistenz (SAR) die Akkumulation von SA essentiell ist. Es wurde auch gezeigt, dass in Pathogen-infiziertem Gewebe die SA-Konzentration erhöht ist und dass durch exogene SA-Applikation eine erhöhte Resistenz gegen ein breites Spektrum von Pathogenen induziert werden kann (Ryals *et al.*, 1996). In Übereinstimmung damit führt der Verlust der SA-Akkumulation in transgenen Pflanzen, welche ein für die bakterielle Salizylsäure-Hydroxylase kodierendes Gen (*NahG*) exprimieren, zur Unfähigkeit SAR auszuprägen (Gaffney *et al.*, 1993). Jedoch demonstrieren neuere Studien, dass für die in den *nahG*-Linien beobachtete veränderte Pathogenabwehr neben dem Verlust der SA-Akkumulation auch die gebildeten Abbauprodukte von SA, wie z. B. Catechol verantwortlich sein können (Heck *et al.*, 2003; Van Wees *et al.*, 2003).

Genetische Analysen in *Arabidopsis* führten zur Isolation zahlreicher SA-Biosynthese und SA-Signaltransduktionsmutanten. Die Identifizierung der SA-Biosynthese-Mutanten *sid2* (*salicylic-acid-induction deficient2*) bzw. die der zu *sid2* allelischen Mutante *eds16* zeigte, dass das korrespondierende Gen für eine putative Chloroplast-lokalisierte *Isochorismatsynthase* (ICS) kodiert, welche SA wahrscheinlich über einen alternativ zum Phenylpropan-Stoffwechselweg existierenden Weg synthetisiert (Shah, 2003). *sid2* und *eds16* zeigen neben der Inhibierung von sowohl SA-Synthese als auch SAR-Aktivierung eine verstärkte Pathogenanfälligkeit, welche durch SA-Applikation komplementiert werden kann (Wildermuth *et al.*, 2001; Nawrath & Métraux, 1999). Eine weitere Komponente wurde durch die Identifizierung des Membran-Proteins EDS5 gefunden, welches Homologien zu Transportern des MATE-Typs (*multidrug and toxin extrusion*) zeigt und daher am Transport phenolischer Vorstufen an der SA-Biosynthese beteiligt sein könnte (Nawrath *et al.*, 2002). Genetische und biochemische Studien der Mutanten *eds1* und *pad4*, deren Funktion in der *R*-Gen-Resistenz bereits erwähnt wurde, zeigen eine gestörte Akkumulation von SA nach Pathogeninfektion und legen eine in der Regulation der SA-Biosynthese übergeordnete Funktion von EDS1 und PAD4 relativ zu EDS5 nahe (Jirage *et al.*, 1999; Feys *et al.*, 2001; Nawrath *et al.*, 2002).

Grundsätzlich kann eine Einteilung der SA-abhängigen Signaltransduktion in mindestens zwei Wege erfolgen, welche durch eine vorhandene oder nicht vorhandene Notwendigkeit von NPR1 (*NON-EXPRESSOR of PR-GENES1*) gekennzeichnet sind (Shah, 2003). Die Mutante *npr1*, sowie die zu *npr1* allelische Mutante *nim1* (*non inducible immunity1*) sind SA-insensitiv und in der Resistenz gegen virulente Pathogene eingeschränkt (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1997). NPR1 zeigt neben einem als Ankyrinwiederholung (*Ankyrin-repeat*) bezeichneten Proteinbindungs-Motiv und einer Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localisation sequence*; NLS) noch eine weitere Protein-Protein-Interaktionsdomäne (Cao *et al.*, 1997). NPR1 ist als ein Modulator der *PR*-Genexpression beschrieben worden, wobei *in*

vivo-Interaktionsstudien als auch genetische Studien belegen, dass die Aktivierung SA-abhängiger *PR*-Gene durch *NPR1* nach Bindung von bZIP (*basic leucine-zipper*)-Transkriptionsfaktoren des TGA-Typs erfolgt (Després *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Fan & Dong, 2002; Johnsen *et al.*, 2003). Weitere intensive Analysen zur Aufklärung der Funktion von *NPR1* und SA in der Ausprägung der SAR lieferten unabhängige Hinweise, dass möglicherweise über eine von SA regulierte Veränderung des zellulären Redox-Status eine Änderung der *NPR1*-Aktivität erfolgt (Mou *et al.*, 2003; Després *et al.*, 2003). So wurde gezeigt, dass nach SA-Induktion eine Monomerisierung des als Oligomer im Zytoplasma vorliegenden *NPR1* erfolgt, was eine Translokation des monomerisierten und aktivierte *NPR1* in den Zellkern bewirkt. Es scheint daher, dass die Änderung des Redox-Status, ausgelöst durch eine SA-Akkumulation, die Verbindung zwischen dem SA-Signal und der *NPR1*-Aktivität in der Ausprägung der SAR darstellt (Pieterse & Van Loon, 2004). Über den Mechanismus, der durch die Akkumulation von SA zu einer Veränderung des Redox-Status führt, wird diskutiert, dass möglicherweise nach der SA-abhängigen Aktivierung von Genen die für antioxidative Proteine, wie z. B. Katalase oder Superoxid Dismutase, kodieren, eine Neutralisierung von ROS-Intermediaten sowie eine zunehmende Etablierung reduzierender Bedingungen erfolgt (Dong, 2004).

Die Existenz eines von *NPR1* unabhängigen Signalwegs ist aufgrund der in *npr1*-Mutanten nach Pathogenbefall beobachteten *PR*-Genexpression gezeigt worden (Shah *et al.*, 1999, 2001; Kachroo *et al.*, 2001).

Die Isolation der Mutante *ssi2* (*suppressor of SA-insensitivity2*), die teilweise den *npr1*-Phänotyp supprimiert, sowie die Identifizierung des korrespondierenden Gens, welches für eine Stearyl-ACP-Desaturase kodiert, führte zu der Annahme, dass Lipide in der durch *ssi2*-vermittelten *NPR1*-unabhängigen Resistenz involviert sind (Shah *et al.*, 2001; Kachroo *et al.*, 2001). Unterstützt wird diese Annahme durch die Identifizierung der *sfd*-Mutanten, welche den *ssi2*-Phänotyp supprimieren und daher weder konstitutive *PR*-Genexpression noch verstärkte Pathogenresistenz zeigen (Nandi *et al.*, 2003). SFD1 katalysiert die Synthese von Glyzerin-3-Phosphat in der Glyzerolipid-Biosynthese (Nandi *et al.*, 2004). Da nur die Ausprägung der SAR, nicht jedoch die lokale Pathogenresistenz in *sfd1* beeinträchtigt ist, wird angenommen, dass SFD1 bzw. Lipide möglicherweise in der Signalübermittlung der SAR involviert sind (Nandi *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch Applikation von SA die *PR1*-Genexpression in der *sfd1*-Einzelmutante nicht induziert wird, was darauf hindeutet, dass Lipid-Abkömmlinge als Signalkomponenten sowohl in der *NPR1*-abhängigen als auch in der *NPR1*-unabhängigen SA-Signaltransduktion beteiligt sind (Shah, 2003).

Ein *NPR1*-unabhängiger und SA-abhängiger Resistenzmechanismus ist ebenso in den *Arabidopsis*-Mutanten *ssi1*, *cpr5* und *cpr6* (*constitutive expressor of PR-gene 5 und 6*) beobachtet worden (Shah *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2000). Die Mutante *ssi1* zeigt neben erhöhter Pathogenresistenz und konstitutiver *PR1*-Genexpression auch eine konstitutive Expression des

JA-abhängigen Gens *PDF1.2*. Interessanterweise zeigten genetische Studien, dass für die *PDF1.2*-Expression neben der JA- und ET-Signaltransduktion auch eine Akkumulation von SA notwendig ist. Ebenso ist demonstriert worden, dass für die *NPR1*-unabhängige *PR1*-Expression eine funktionelle sowohl SA-regulierte als auch JA/ET-regulierte Signaltransduktion notwendig ist (Nandi *et al.*, 2003). Es wird daher angenommen, dass *SSI1* eine gemeinsame Komponente der durch SA und JA/ET vermittelten Signaltransduktion ist und möglicherweise ein Modulator im *cross-talk* dieser Signalwege darstellt (Shah *et al.*, 1999; Nandi *et al.*, 2003).

Die Analyse der Mutanten *cpr5* und *cpr6* deutet, in Analogie zu *ssi1*, darauf hin, dass die Ausprägung der *NPR1*-unabhängigen Resistenz durch Mutationen, die zu Insensitivität gegenüber JA und ET führen, supprimiert werden kann (Clarke *et al.*, 2000). Durch Untersuchungen von Yoshida *et al.* (2002) wurde gezeigt, dass es sich bei *cpr5* um ein Allel der Mutation *hys1* (*hypersenescence1*) handelt, welche zu einem frühen Altern der Blätter führt. Die Identifizierung von *HYS1/CPR5* liefert daher einen Hinweis auf eine gemeinsame Komponente in dem Prozess der Blattseneszenz und der Pathogenabwehr.

1.5 Jasmonsäure- und Ethylen-abhängige Abwehrreaktionen

Die Existenz pflanzlicher Pathogenresistenzen, welche offensichtlich unabhängig von einer SA-Akkumulation in den untersuchten Pflanzen waren, deuteten auf die Notwendigkeit von effizienten SA-unabhängigen Abwehrmechanismen (Thomma *et al.*, 1998; 1999). So wurden in der Vergangenheit eine Reihe von *Arabidopsis*-Mutanten isoliert, welche in der JA/ET-Biosynthese oder JA/ET-Signalperzeption gestört waren und zugleich eine erhöhte Anfälligkeit gegen unterschiedliche nekrotrophe Pathogene zeigten. Mutationen in der JA-Biosynthese, wie in der Dreifachmutante *fad3 fad7 fad8* (*fatty acid desaturase3/7/8*) oder in der JA-Perzeption, wie *coi1-1* (*coronatine insensitive1*) und *jar1-1* (*jasmonic acid resistant1*) führten zu einer erhöhten Anfälligkeit gegen *A. brassicicola*, *B. cinerea* und gegen unterschiedliche *Pythium*-Spezies (Thomma *et al.*, 1998; Penninckx *et al.*, 1998; 1999; Staswick *et al.*, 1998; Norman-Setterblad *et al.*, 2000; Devoto *et al.*, 2005). Die Ethylen-insensitive Mutante *ein2-1* (*ethylene insensitive2*) ist anfälliger gegen *B. cinerea* und *E. carotovora* (Thomma *et al.*, 1999a; Norman-Setterblad *et al.*, 2000).

Grundsätzlich zeigen JA- und ET-abhängige Abwehr parallele Muster, wie z. B. hinsichtlich der Expression von *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN1.2*), *THI2.1* (*THIONIN2.1*), *HEL* (*HEVEIN LIKE PROTEIN*) oder *CHIB* (*CHITINASEB*) (Norman-Setterblad *et al.*, 2000; Penninckx *et al.*, 1998). Ebenso ist die Notwendigkeit von sowohl JA- als auch ET-abhängiger Signaltransduktion in der Ausprägung der bereits erwähnten ISR beschrieben worden (Pieterse & Van Loon, 1999).

Neuere Studien der JA-Signaltransduktion deuten im Zusammenhang mit *COI1* darauf hin, dass ein E3-Ubiquitin-Ligasekomplex unter Beteiligung von *COI1* (*SCF^{COI1}*) an dem 26S-Proteasom-abhängigen Proteinabbau putativer Regulatoren des JA-Signalweges involviert ist (Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2003; Devoto & Turner, 2005). Sequenzanalysen zeigten,

dass das F-Box-Motiv in COI1 die Substrat-spezifische Komponente im SCF^{COI1}-Komplex darstellt (Xie *et al.*, 1998, Cheong & Choi, 2003).

Ebenso sind unterschiedliche Mutanten isoliert worden, in denen die konstitutiv aktivierte JA-Signaltransduktion mit einer erhöhten Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene korreliert. So ist die Resistenz der Mutante *cev1-1* (*constitutive expression of VSP1*) gegen verschiedene *Erysiphe*-Spezies erhöht (Ellis & Turner, 2001). In Analogie dazu zeigt eine transgene *Arabidopsis*-Linie, die das Gen *JMT* (*JA CARBOXYL METHYLTRANSFERASE*) überexprimiert, eine konstitutive *PDF1.2*-Expression sowie eine erhöhte Resistenz gegen das nekrotrophe Pathogen *B. cinerea* (Seo *et al.*, 2001). Über die den Resistenzmechanismen zugrunde liegenden Faktoren ist bisher jedoch wenig bekannt geworden. Hinweise, welche für eine möglicherweise durch Freisetzung von Zellwandbestandteilen und Oligosacchariden konstitutiv aktivierte JA-abhängige Abwehr sprechen liefert die Mutante *cev1-1*, für die ein Defekt in der Zellulosesynthase (*CELLULOSE SYNTHASE3*) CESA3 beschrieben wurde (Ellis *et al.*, 2002).

ET-abhängige Abwehrreaktionen scheinen eine divergente Funktion in der Pathogenabwehr zu haben, da neben der bereits erwähnten erhöhten Pathogenanfälligkeit der Mutante *ein2-1* ebenso verringerte Symptome nach Infektion mit virulenten Stämmen von *P. syringae* und *X. campestris* beobachtet wurden (Bent *et al.*, 1992).

Während der ET-Signaltransduktion aktiviert EIN2 als positiver Regulator den Transkriptionsfaktor EIN3, welcher zur transkriptionellen Aktivierung ET-induzierbarer Gene, wie z. B. des Transkriptionsfaktors *ERF1* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR1*) führt. Die Tatsache, dass *ERF1* durch JA koreguliert wird und sowohl ET als auch JA zur *ERF1*-Genexpression notwendig sind, deutet auf die synergistische Nutzung von Signaltransduktionskomponenten in JA- und ET-abhängigen Signalwegen (Lorenzo *et al.*, 2003; Guo & Ecker, 2004; Stepanova & Alonso, 2005). In Analysen mit *ERF1*-überexprimierenden *Arabidopsis*-Linien wurde gezeigt, dass *ERF1* die Expression von zwei Gruppen JA-induzierbarer Gene differenziell reguliert. Während die Expression von Genen, die in der Pathogenabwehr involviert sind durch *ERF1* positiv reguliert wird, scheint die Genexpression der nach Verwundung induzierten Gene durch *ERF1* supprimiert zu werden (Lorenzo *et al.*, 2003). Durch die Identifizierung des bHLHZIP (*basic helix-loop-helix-leucine zipper*)-Transkriptionsfaktors AtMYC2 wurde die Beteiligung einer weiteren Komponente in der JA-vermittelten Signaltransduktion gezeigt, welche jedoch ein zu *ERF1* antagonistischen Effekt in der JA-abhängigen Genexpression hat (Lorenzo *et al.*, 2004). *ERF1* und AtMYC2 stellen daher Komponenten der differentiellen Regulation JA/ET-abhängiger Gene dar, die in Abhängigkeit vom auslösenden Stimulus, d. h. Verwundung oder Pathogenstress eine jeweils effiziente Abwehrreaktion in der Pflanze auslösen.

1.6 „Cross-talk“ der unterschiedlichen Signaltransduktionswege

Die Untersuchung zahlreicher Pflanze-Pathogen-Interaktionen, unter Nutzung bekannter Signaltransduktionsmutanten in *Arabidopsis*, liefern zunehmend Hinweise, dass die bekannten SA, JA- und ET-abhängigen Signalwege weniger unabhängig als vielmehr in einem komplexen Netzwerk durch positive und negative Modulatoren reguliert werden, was letztendlich zu einer effizienten Abwehr der Virulenzstrategie des eindringenden Pathogens führt. Ein Beispiel für die biologische Signifikanz dieses Modells stellt die überwiegend durch SA-abhängige Signalwege bestimmte Abwehr gegen avirulente *P. syringae* pv *tomato* (DC3000) dar. Im Gegensatz zum Wildtyp ist in infizierten *Arabidopsis nahG*-Linien die SA-Akkumulation und SA-Signaltransduktion unterdrückt, während die JA-Akkumulation und JA-Signaltransduktion hochreguliert ist (Spoel *et al.*, 2003). Diese Beobachtung ist ein Hinweis dafür, dass die nach *P. syringae* (DC3000)-Infektion induzierte weniger effiziente JA-abhängige Abwehr durch SA-Akkumulation unterdrückt wird. Dieser Effekt wird im *npr1*-Hintergrund abgeschwächt, was auf eine Funktion von NPR1 als negativen Regulator des JA-Signals im „cross-talk“ beider Signalwege hindeutet (Spoel *et al.*, 2003). NPR1 scheint entgegen seiner erwähnten Kern-lokalisierten Funktion während der SAR nun während der Suppression des JA-Signalwegs im Zytosol lokalisiert zu sein. Es wird vermutet, dass zytosolisches NPR1 möglicherweise durch Interaktion mit dem SCF^{COI1}-Komplex Einfluss auf den Abbau putativ negativer Regulatoren der JA-Signaltransduktion nimmt (Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Pieterse & Val Loon, 2004).

Andere Hinweise legen einen antagonistischen Effekt von JA in der SA-abhängigen Abwehr nahe. Genetische Studien der JA-Signaltransduktionsmutante *mpk4* und der Mutante *ssi2* belegen eine negative Regulation der SA-abhängigen Pathogenabwehr durch Aktivierung der JA-vermittelten Signaltransduktion (Kachroo *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2000). So wurde gezeigt, dass der Verlust der JA-regulierten Signaltransduktion in den Mutanten *mpk4* und *ssi2* eine konstitutive SA-abhängige Abwehr sowie die erhöhte Resistenz gegen biotrophe Pathogene zur Folge hat. Ein weiterer experimenteller Hinweis für diese Hypothese stellt die verstärkte SA-abhängige Abwehr nach *P. syringae*-Infektion der Coronatin-insensitiven Mutante *coi1* dar (Feys *et al.*, 1994; Kloek *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass die Virulenzfunktion des bakteriellen Phytotoxins Coronatin darin besteht, durch Unterdrückung der SA-abhängigen Abwehr in anfälligen Wirtspflanzen die JA-abhängige Signaltransduktion zu aktivieren. Die JA-vermittelten Abwehrreaktionen sind jedoch nicht in der Lage eine Besiedlung der Pflanze durch das Pathogen zu verhindern (Reymond & Farmer, 1998; Nomura *et al.*, 2005). In Analogie zu *Arabidopsis* ist in Tomate ebenso eine Inhibierung der SA-vermittelten Abwehr durch Aktivierung der JA-abhängigen Signaltransduktion beschrieben worden (Zhao *et al.*, 2003).

Neuere Untersuchungen deuten auch auf eine Funktion des Transkriptionsfaktors WRKY70 im Netzwerk der SA- und JA/ET-regulierten Signaltransduktion (Li *et al.*, 2004). Die durch Pathogeninfektion veränderte zelluläre SA- bzw. JA-Konzentration führt zu einer differentiellen

WRKY70-Expression, wobei hohe SA-Konzentrationen eine Aktivierung bzw. hohe JA-Konzentrationen eine Suppression der WRKY70-Genexpression bewirken (Li *et al.*, 2004).

1.7 Nichtwirtsresistenz

Die Immunität einer gesamten Pflanzen-Spezies gegen die meisten potentiell phytopathogenen Mikroorganismen wird als Nichtwirtsresistenz bezeichnet. Diese Form der Resistenz beschreibt die Unfähigkeit einer gesamten Pathogen-Spezies eine bestimmte Pflanzen-Spezies zu kolonisieren. Die Nichtwirtsresistenz bildet die in der Natur vorherrschende Form der Resistenzausprägung, welche u. a. dazu führt, dass die Besiedlung einer Pflanze durch ein Pathogen in ihrer natürlichen Umgebung zumeist die Ausnahme darstellt (Heath, 2000). Charakteristisch für die Nichtwirtsresistenz ist ihre relativ hohe genetische Stabilität, welche darin Ausdruck findet, dass selten Veränderungen im Wirtsspektrum von Phytopathogenen beobachtet werden (Heath, 2000; Kamoun, 2001). Es wird auch angenommen, dass im Gegensatz zur relativ leicht durch Mutationen zu überwindende *R*-Gen-vermittelten Resistenz, die durch Multigenizität gekennzeichnete Nichtwirtsresistenz eine beständigere Resistenz darstellt (Heath, 1996; 2000). Im Vergleich zu den gut untersuchten Mechanismen der *R*-Gen-vermittelten Wirtsresistenz sind die molekularen Mechanismen der Nichtwirtsresistenz noch weitestgehend unbekannt. Dennoch wurde durch die Identifizierung neuer Komponenten ein Beitrag zum Verstehen der molekularen Grundlagen der Nichtwirtsresistenz geleistet (Jones & Takemoto, 2004; Abramovitch & Martin, 2004; Nürnberger & Lipka, 2005). Analysen der Genexpression während der Ausprägung von sowohl *R*-Gen-spezifischer Wirtsresistenz als auch der Nichtwirtsresistenz lieferten Hinweise für signifikante Ähnlichkeiten der Genexpressionsmuster, deuteten aber auch auf Gene mit einer differentiellen Expression in Abhängigkeit von der Pathogen-Interaktion (Tao *et al.*, 2003; Huitema *et al.*, 2003). Unterschiedliche experimentelle Befunde demonstrieren auch die Beteiligung von bereits für *R*-Gen-vermittelte Resistenzmechanismen beschriebene Faktoren.

So belegten Untersuchungen von *nahG*-Linien in *Arabidopsis*, dass SA eine Rolle in der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen den Rostpilz *Uromyces vignae* spielt (Mellersh & Heath, 2003). An dieser Stelle ist jedoch auch zu erwähnen, dass der Verlust der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis nahG*-Linien gegen *P. syringae* pv *phaseolicola* neueren Untersuchungen zufolge nicht durch den Verlust der SA-Akkumulation sondern durch SA-Abbauprodukte, wie Catechol verursacht wird (Lu *et al.*, 2002; Van Wees & Glazebrook, 2003).

„Gene-silencing“-Studien in *N. benthamiana* verdeutlichten auch die Beteiligung des Ubiquitin-Ligase-assoziierten Proteins SGT1 in der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. syringae* und liefern Hinweise auf eine mögliche generelle Funktion von SGT1 in der Pathogenresistenz hin (Peart *et al.*, 2002).

Desweiteren scheint HSP90, dessen Funktion in der R-Proteininstabilität bereits erwähnt wurde, eine Funktion in der Nichtwirtsresistenz von *Nicotiana benthamiana* gegen *Pseudomonas cichorii* zu haben (Kanzaki *et al.*, 2003).

Durch pharmakologische Inhibierung der Aktin-Polymerisierung wurde ebenso eine Funktion des Zytoskeletts in der Nichtwirtsresistenz in Gerste gezeigt (Kobayahshi *et al.*, 1997). Die kombinierte Inhibierung von Aktin-Funktion und EDS1-Aktivität führte zum Verlust der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen Weizenmehltau (Yun *et al.*, 2003).

Untersuchungen von Bais *et al.* (2005) demonstrierten eine Funktion für die von der Wurzel abgesonderten antimikrobiellen Verbindungen in der Nichtwirtsresistenz von *Arabidopsis* gegen *P. syringae*. Es wurde gezeigt, dass virulente *P. syringae* pv *tomato* DC3000 in der Lage sind neben oberirdischen Pflanzenteilen auch Wurzeln zu infizieren. Es wird davon ausgegangen, dass diese Fähigkeit virulenter Pathogene in Verbindung mit der Entwicklung von Mechanismen zur Tolerierung und/oder Inaktivierung von antimikrobiellen Wurzelexudaten steht. Nichtwirtspathogene scheinen dagegen nicht dazu befähigt zu sein und werden daher durch diese Barriere effizient an der Besiedlung der Pflanze gehindert.

Die Supprimierung der Expression von *Arabidopsis-NHO1* (NONHOST RESISTANCE1) durch *P. syringae* pv *tomato* DC3000 verdeutlicht ebenso, dass virulente *P. syringae*-Stämme aktiv Mechanismen der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* unterdrücken können. Die Beteiligung von NHO1 an der basalen Abwehr gegen *P. syringae* zeigt desweiteren, dass die Notwendigkeit einer zumindest partiellen Überlappung von Mechanismen, welche zur R-Gen-vermittelten Resistenz sowie zur Nichtwirtsresistenz führen, besteht (Lu *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003; Thordal-Christensen, 2003; Mysore & Ryu, 2004).

Genetische Analysen der Pathogenresistenz in *Arabidopsis* belegen aber auch die Existenz von Mechanismen, die spezifisch für die Nichtwirtsresistenz sind und daher keinen Einfluss auf die Wirtsresistenz haben. Beispielsweise ist hier *PEN1* (*PENETRATION1*; 1.7.1) zu erwähnen, welches an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen Gerstemehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) beteiligt ist, aber scheinbar keinen Einfluss auf die R-Gen-vermittelte Resistenz hat (Collins *et al.*, 2003).

Die Identifizierung von unterschiedlichen Komponenten und Mechanismen, die in der Nichtwirtsresistenz involviert sind, verdeutlicht die Beteiligung von diversen Prozessen an der Ausprägung der Resistenz gegen Nichtwirtspathogene und bestätigt das von Heath (2000) vorgeschlagene Modell einer auf multiplen Faktoren und unterschiedlichen Ebenen basierten Nichtwirtsresistenz.

Eine Klassifizierung der Nichtwirtsresistenz nach qualitativen Kriterien wurde kürzlich von Mysore & Ryu (2004) vorgeschlagen. Demnach stellen die Nichtwirts-Interaktionen mit phytopathogenen Bakterien, Pilzen und Oomyzeten, welche durch das Fehlen sichtbarer Symptome, wie HR gekennzeichnet sind, den Typ I dar. Die Nichtwirts-Interaktionen, welche mit einer sichtbaren HR-

Ausprägung assoziiert sind, bilden den Typ II. Es wird davon ausgegangen, dass in erster Linie präformierte pflanzliche Barrieren in Interaktionen des Typs I ein Eindringen der meisten Pathogene verhindern kann, welcher daher wahrscheinlich den verbreitetsten Typ der Nichtwirtsresistenz darstellt (Mysore & Ryu, 2004). Jedoch kann es auch in einer zweiten Ebene der Abwehr zur Aktivierung von Abwehrmechanismen, wie z. B. *PR*-Genexpression kommen, welche durch Erkennung genereller Elicitoren (PAMPs) ausgelöst werden und ohne sichtbare Symptome verlaufen können (Lu *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2003; Mysore & Ryu 2004; Nürnberger & Lipka; 2005). Ist das Pathogen in der Lage, die präformierte und induzierte Abwehr zu überwinden, können die von Pilzen und Oomyzeten sekretierten Proteine bzw. die durch das TTSS bakterieller Pathogene injizierten AVR-Proteine von der Pflanze erkannt werden und zur Auslösung der HR führen (Mysore & Ryu 2004). Beispielsweise löst das extrazelluläre Protein INF1, ein Elicitin des Oomyzeten *P. infestans*, eine HR im Nichtwirt *N. benthamiana* sowie in den meisten anderen *Nicotiana*-Spezies aus (Kamoun *et al.*, 1998; Huitema *et al.*, 2005). Ebenso wurde gezeigt, dass funktionelles *Hrp*-TTSS (*Hypersensitive response and pathogenicity*-TTSS) für phytopathogene Bakterien notwendig ist, um eine HR in verschiedenen Nichtwirtspflanzen auszulösen (Alfano & Collmer, 2004).

Studien der Nichtwirtsresistenz gegen Oomyzeten der Gattung *Phytophthora* deuten darauf hin, dass wahrscheinlich multiple Ebenen von „Gen-für-Gen“-Interaktionen die molekulare Grundlage der Nichtwirtsresistenz bilden (Kamoun, 2001). In dem dabei vorgeschlagenen Modell wird weniger davon ausgegangen, dass *R*-Gen-Allele sich kurzfristig durch Adaption an einzelne Pathogene entwickelt haben als dass eine lange koevolutionäre Entwicklung von Resistenz-Allelen und Pathogenpopulationen zu *R*-Gen-Loci geführt haben, welche in ihrer Summe ein breites Resistenzspektrum vermitteln (Kamoun, 2001).

1.7.1 Komponenten der Nichtwirtsresistenz gegen *Blumeria graminis*

Durch unabhängige Mutanten-Durchmusterungen in *Arabidopsis* konnten mehrere *pen* (*penetration*)-Mutanten isoliert werden, die in der Nichtwirtsresistenz gegen Gerstemehltau beeinträchtigt sind. Bisher wurden drei unabhängige Mutanten-Loci (*pen1* - *pen3*) mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp bzw. mit einer erhöhten Penetrations-Häufigkeit nach *B. graminis*-Infektion isoliert. Es wird angenommen, dass *PEN1*, *PEN2* und *PEN3* die Hauptelemente der sogenannten Penetrationsresistenz gegen biotrophe Mehltaupilze darstellen. Die Identifizierung der mit den *pen*-Mutationen korrespondierenden Gene führte zu Faktoren, die in Mechanismen involviert sind, deren Beteiligung an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* bisher nicht bekannt war.

Durch die Identifizierung von *PEN1* wurde erstmals eine Beteiligung von Vesikelfusionsereignissen an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *B. graminis* f. sp. *hordei* gezeigt (Collins *et al.*, 2003). *PEN1* kodiert für das plasmamembranlokalierte *Arabidopsis*-Syntaxin (At)SYP121

(Sanderfoot *et al.*, 2000). Syntaxine gehören zur Familie der SNARE (Synaptosom-assozierte Protein-Rezeptor-Proteine, welche in Membranfusionsprozessen beteiligt sind. PEN1 bildet als t (*target-associated*)-SNARE-Protein einen Komplex mit einem ebenfalls membranständigen SNA (Synaptosom-assozierten-Protein, welcher als Rezeptor für v (*vesicle-associated*)-SNAREs fungiert und die Fusion von Vesikel- und Zielfembran ermöglicht (Xue & Zhang, 2002; Collins *et al.*, 2003; Pratelli *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, dass PEN1 Pathogen-induziert in den Zellwandaufklagerungen unterhalb der *B. graminis*-Penetrationsstellen lokalisiert ist und daher wahrscheinlich durch Polarisierung von Sekretionsereignissen eine Funktion in der Zellperipherie-assozierten Abwehrreaktion hat (Assaad *et al.*, 2004).

Des Weiteren wurde eine funktionelle Homologie zu dem bereits erwähnten ROR2 aus Gerste gefunden, welches zur Ausprägung der *mlo*-vermittelten basalen Penetrationsresistenz in Gerste notwendig ist. Die homologe Funktion beider Syntaxine liefert daher einen Hinweis für eine gemeinsame Komponente der Nichtwirtsresistenz sowie der basalen Penetrationsresistenz in *Arabidopsis* und Gerste (Collins *et al.*, 2003).

Eine Mutation in *PEN2* hingegen führt neben einer erhöhten Anfälligkeit für Gerstemehltau auch zu einer Beeinträchtigung der Resistenz gegen weitere biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Pathogene (Lipka *et al.*, 2005; diese Arbeit). *PEN2* ist eine Familie1- β -Glykosyl-Hydrolase, welche die Spaltung glykosidischer Bindungen zwischen Glukoseresten und einem Substrat katalysiert. Ein spezifisches Merkmal von *PEN2* stellt die C-terminale putativ membranassoziierte Verlängerung dar, welche für die *PEN2*-Funktion in der Pathogenabwehr essentiell ist (Lipka *et al.*, 2005). Des Weiteren deuten genetische Studien unterschiedlicher Signaltransduktionskomponenten auf eine weitere, vom EDS1-PAD4-SAG101-Komplex abhängige Ebene in der Nichtwirtsresistenz gegen biotrophe Mehltaupilze hin (Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005).

Die Mutante *pen3* zeigt neben der beeinträchtigten Nichtwirtsresistenz gegen *B. graminis* auch einen veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach Infektion mit dem Erbsenmehltau *Erysiphe pisi* sowie nach *P. infestans*-Infektion (Stein *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu scheint die Mutation *pen3* zu Resistenz gegen den virulenten *Arabidopsis*-Mehltau *Erysiphe cichoracearum* zu führen (Stein *et al.*, 2006). Die Identifizierung des in *pen3* mutierten Locus zeigte, dass *PEN3* für das ABC (ATP-binding cassette)-Transporterprotein PDR8 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8) kodiert (Stein *et al.*, 2006). ABC-Transporter katalysieren unterschiedliche zelluläre Transportvorgänge, z. B. von Schwermetallen, Lipiden und toxischen Komponenten unter ATP/GTP-Hydrolyse (Martinoia *et al.*, 2002). Kürzlich wurde der ABC-Transporter CER5 (ECERIFERUM5) aus *Arabidopsis* isoliert, welcher im epidermalen Lipid-Transport von langkettigen Fettsäurederivaten (Wachsen) zur Kutikula involviert ist (Pighin *et al.*, 2004). Ein möglicher veränderter Phänotyp der *cer5*-Mutante nach Pathogeninfektion ist bisher jedoch noch nicht beschrieben worden.

1.7.2 Das Nichtwirtspathosystem *Arabidopsis thaliana* – *Phytophthora infestans*

Als geeignetes experimentelles System für Studien der Resistzenzen gegen *Phytophthora*-Pathogene hat sich zunehmend die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* entwickelt (Huitema *et al.*, 2004). Bisher sind zwei *Phytophthora*-Spezies bekannt, *P. brassicae* und *P. cinnamomi*, welche in der Lage sind, *Arabidopsis* erfolgreich zu besiedeln (Roetschi *et al.*, 2001; Si-Ammour *et al.*, 2003; Robinson & Cahill, 2003). Andere *Phytophthora*-Spezies, wie z. B. *P. infestans* können *Arabidopsis* nicht kolonisieren oder Krankheit in *Arabidopsis* auslösen und stellen daher Nichtwirtspathogene dar (Huitema *et al.*, 2003; Takemoto *et al.*, 2003). Das Oomyzeten-Phytopathogen *P. infestans* ist als Erreger der Kraut- und Knollenfäule der Solanaceen Kartoffel und Tomate beschrieben worden und ist trotz der morphologischen Ähnlichkeit phylogenetisch nicht mit Pilzen sondern mit Braun- und Kieselalgen verwandt (Fry & Godwin, 1997; Baldauf *et al.*, 2000). *P. infestans* wird den hemibiotrophen Pathogenen zugeordnet, d. h. zu Beginn der Infektion bildet er Ernährungsorgane (Haustorien-ähnliche Strukturen) in lebenden Wirtszellen um sich mit pflanzlichen Nährstoffen zu versorgen (Perfect & Green, 2001; Mendgen & Hahn, 2002). In der späteren nekrotrophen Phase der Infektion kommt es zu einer Ausbreitung der *P. infestans*-Hyphen über den Bereich der Primärinfektion hinaus und infolgedessen zum Absterben des infizierten Wirtsgewebes.

Grundlagen der Zytologie sowie der molekularen Mechanismen in der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* sind bisher hauptsächlich durch Kamoun *et al.* beschrieben worden. Demnach ist diese Nichtwirts-Interaktion durch eine HR-assoziierte Abwehrreaktion sowie durch Aktivierung des JA-abhängigen Signaltransduktionswegs gekennzeichnet (Huitema *et al.*, 2003). So deuten Genexpressionsanalysen des Pathosystems *A. thaliana* - *P. infestans* auf eine früh induzierte Expression des JA-abhängigen Markergens *PDF1.2* hin. Ebenso wurde eine Induzierung SA-abhängiger *PR*-Gene in späteren Phasen der Infektion beobachtet, was möglicherweise ein Hinweis für eine untergeordnete Funktion der SA-vermittelten Abwehr in der frühen Interaktion mit *P. infestans* ist (Huitema *et al.*, 2003).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Etablierung und Charakterisierung des Nichtwirtspathosystems *Arabidopsis thaliana* – *Phytophthora infestans* und zum anderen die Identifizierung von Faktoren, welche eine Funktion in der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz dieses Pathosystems haben.

Ausgehend von der *A. thaliana*-Mutante *pen2*, welche einen veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach Infektion mit *B. graminis* f. sp. *hordei* zeigt, sollten die zellulären Grundlagen in der Interaktion mit *P. infestans* sowie die dabei beteiligten pflanzlichen Abwehrreaktionen untersucht werden. Um weitere an der Resistenzausprägung in dieser Nichtwirts-Interaktion beteiligte Komponenten zu isolieren, erfolgte eine chemische Mutagenese von *pen2*-Samen. In einer folgenden Mutanten-Durchmusterung sollten sowohl Linien mit einer Verstärkung als auch Linien mit einer Abschwächung des *pen2*-abhängigen Phänotyps nach *P. infestans*-Infektion isoliert und charakterisiert werden. Erste Kartierungsexperimente sollten Aufschluss über die Position der Mutanten-Loci im *A. thaliana*-Genom geben. Die Analyse des Phänotyps unterschiedlicher Signaltransduktionsmutanten im *pen2*-Hintergrund stellte einen weiteren Ansatz zur Analyse des Nichtwirtspathosystems dar.

B Material und Methoden

1 Material

1.1 Laborchemikalien, Enzyme, Radioisotope und Oligonukleotide

Die verwendeten Feinchemikalien hatten analytischen Reinheitsgrad und wurden, falls nicht gesondert vermerkt, von den Firmen DIFCO LAB. (Detroit, USA), MERCK (Darmstadt), ROTH (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg), SIGMA-ALDRICH (Steinheim) und BIOZYM (Hess. Oldendorf) bezogen. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, von INVITROGEN (Karlsruhe), FERMENTAS GmbH (St. Leon-Rot), ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS (Mannheim) geliefert. Die Radiochemikalie α -[32P]-dATP wurde von VALEANT PHARMACEUTICALS INTERNATIONAL (Costa Mesa, USA) bezogen. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch MWG-BIOTECH (Ebersberg).

1.2 Organismen und Plasmid-Vektoren

1.2.1 Pflanzen

Die in der Arbeit verwendeten unterschiedlichen Ökotypen, Mutanten und transgenen Linien von *Arabidopsis thaliana* (L.) sind in der Tab. B-1 zusammengefasst.

1.2.2 Phytopathogene Organismen, Bakterien und Plasmid-Vektoren

Die Infektion der Pflanzen erfolgte mit den Phytopathogenen *Phytophthora infestans* CRA208, *Alternaria brassicicola* MUCL 20297 oder *Botrytis cinerea* MUCL 30158 (Tab. B-2). Der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α diente als Wirtsbakterienstamm für Transformationsexperimente.

1.2.3 Oligonukleotide

Die zur Kartierung der Sekundärmutation bzw. zur Genotypisierung verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. B-3 und B-4 dargestellt.

Tab. B-1: Ökotypen, Mutanten und transgene Linien von *Arabidopsis thaliana*

<i>Arabidopsis thaliana</i>	gen. Hintergrund	Referenz / Herkunft
Ökotyp		
Columbia	Col-0	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)
Landsberg erecta	Ler	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)
Mutante		
<i>gl1-1</i> (ATH243900)	Col-3	Hülskamp <i>et al.</i> , 1994; Koornneef <i>et al.</i> , 1982
<i>pen2-1</i> (At2g44490)	Col-3 <i>gl1-1</i>	Lipka <i>et al.</i> , 2005
<i>pen1-1</i> (At3g11820)	Col-0	Collins <i>et al.</i> , 2003
<i>pmr4-1</i> (At4g03550)	Col-0	Vogel & Somerville, 2000; Nishimura <i>et al.</i> , 2003
<i>edr1-1</i> (At1g08720)	Col-0	Frye & Innes, 1998; Frye <i>et al.</i> , 2001
<i>pad4-1</i> (At3g52430)	Col-0	Glazebrook <i>et al.</i> , 1996; Jirage <i>et al.</i> , 1999
Doppelmutante		
<i>pen2-1 pen1-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Col-0	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 rar1-10</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Ler	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 sgt1b-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Ler	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 eds1-2</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Ler	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 pad4-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Col-0	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 ndr1-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Col-0	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 npr1-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Col-0	Dittgen, 2005
Dreifachmutante		
<i>pen2-1 rar1-10 sgt1b-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Ler	Dittgen, 2005
transgene Linie		
<i>pen2-1 NahG¹</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Col-0	Dittgen, 2005

¹⁾ *NahG*-Transgen aus *Pseudomonas syringae* (You *et al.*, 1991; Delaney *et al.*, 1994)

Tab. B-2: Phytopathogene Organismen, Bakterien und Plasmid-Vektoren

Oomyzet	Merkmal	Referenz/Herkunft
<i>Phytophthora infestans</i> CRA208	GFP-Transgen, G418 ^r	F. Mauch; Fribourg, CH (Si-Ammour <i>et al.</i> , 2003)
Pilz		
<i>Alternaria brassicicola</i> MUCL 20297	GUS-Transgen	Myzothèque l'Université catholique de Louvain (MUCL); (Louvain, B) (Thomma <i>et al.</i> , 1998)
<i>Botrytis cinerea</i> MUCL 30158		Myzothèque l'Université catholique de Louvain (MUCL); (Louvain, B)
Bakterienstamm		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44 lacZΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
Plasmid-Vektor		
pCR2.1	f1 ori, col E1 ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r , Kan ^r , T7- Promotor	INVITROGEN (Groningen, NL)

Tab. B-3: Molekulare Marker/ Oligonukleotide (Genkartierung)

Bezeichnung	Typ	Sequenz in (5'-3')	Referenz/TAIR ¹ -Accession
AEAT1	SSLP	CGAACAGCCAACATTAATTCCC GCCACTGCGTGAATGATATG	Bell & Ecker, 1994 (At1g05010)
NGA248	SSLP	TCTGTATCTCGGTGAATTCTCC TACCGAACCAAAACACAAAGG	Bell & Ecker, 1994 (At1g28280)
NGA280	SSLP	GGCTCCATAAAAAGTCACC CTGATCTCACGGACAATAGTGC	Bell & Ecker, 1994 (At1g55840)
ATPASE	SSLP	GTTCACAGAGAGACTCATAAACCA CTGGGAACGGTTGATTGAGC	Bell & Ecker, 1994 Genetic marker: 1945474
PLS6	SSLP	ATAGTGGGTGATCTTGAATGTA ACTTGTCTCGTCGCACTGTT	TAIR Accession: Person 4602 Genetic marker: 2005380
BIO2	SSLP	TTAACAGAAACCCAAAGCTTC TGACCTCCTCTTCCATGGAG	Bell & Ecker, 1994 (At2g43360)
NGA172	SSLP	CATCCGAATGCCATTGTC AGCTGCTCCTTATAGCGTCC	Bell & Ecker, 1994 (At3g03340)
NGA162	SSLP	CTCTGTCACTCTTCCCTCTGG CATGCAATTGCATCTGAGG	Bell & Ecker, 1994 (At3g13960)
NT204	SSLP	TGGAAGCTCTAGAAACGATCG ACCACCTAAACCGAGAATTGG	Bell & Ecker, 1994 Genetic marker: 1945510
CIW11	SSLP	CCCCGAGTTGAGGTATT GAAGAAATTCTAAAGCATTTC	TAIR Accession: Person 6556 Genetic marker: 2005403
GAPAB	SSLP	TCCTGAGAATTCACTGAAACCC CACCATGGCTTCGGTTACTT	Bell & Ecker, 1994 (At3g26650)
T6H20 ²	SSLP	CGGCTGAAACTTGGAGGGAC AGGAAGAACGTGTGATTGTG	TAIR Accession: Locus 2102832 (At3g46870)
F1P2-TGF	SSLP	TTTGTCTGAAGATGTGGAGAGAGAG CAAAACCCCCTTCATTATTGTT	TAIR Accession: Person 5394 Genetic marker: 2005393
SORBO34 ³	SSLP	GGAGAACCGCTTGTCAGA TGCTTCTTCTTCTTCTTCTCG	TAIR Accession: Locus 2082866 (At3g49160)
CIW4	SSLP	GTTCATTAAACTGCGTGTGT TACGGTCAGATTGAGTGATTTC	TAIR Accession: Person 6556 Genetic marker: 2005404
F24M12TGF	SSLP	GTTCTCTGCATTCCACACATACTCT CTTGGGTATTCTGAAGAGCATAAAAT	TAIR Accession: Person 5394 Genetic marker: 2005395
NGA6	SSLP	ATGGAGAACGTTACACTGATC TGGATTCTCCTCTCTTCAC	Bell & Ecker, 1994 (At3g62220)
NGA8	SSLP	TGGCTTCGTTATAAACATCC GAGGGCAAATCTTATTTCGG	Bell & Ecker, 1994 (At4g08830)
CIW7	SSLP	AATTGGAGATTAGCTGGAAT CCATGTTGATGATAAGCACAA	TAIR Accession: Person 6556 Genetic marker: 2005420
NGA1139	SSLP	TTTTCCCTGTGTTGCATTCC TAGCCGGATGAGTTGGTACC	Bell & Ecker, 1994 (At4g34390)
NGA225	SSLP	TCTCCCCACTAGTTTGTGCC GAAATCCAAATCCCAGAGAGG	Bell & Ecker, 1994 Genetic marker: 1945530
NGA139	SSLP	GGTTTCGTTCACTATCCAGG AGAGCTACCAAGATCCGATGG	Bell & Ecker, 1994 Genetic marker: 1945524
CIW9	SSLP	CAGACGTATCAAATGACAAATG GACTACTGCTAAACTATTGG	TAIR Accession: Person 6556 (At5g42600)
CIW10	SSLP	CCACATTTCCTCTTCTATA CAACATTAGCAAATCAACTT	TAIR Accession: Person 6556 (At5g60960)

¹⁾ TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; <http://www.arabidopsis.org/>)²⁾ abgeleitet vom Sequenzpolymorphismus CER460925 / BAC-Accession AL096859³⁾ abgeleitet vom Sequenzpolymorphismus 470173 / BAC-Accession AL132956

Tab. B-4: Oligonukleotide (Genotypisierung)

Genotypisierung			
Bezeichnung	Typ	Sequenz (5'-3')	Referenz
PEN2OUTER	CAPS	TTTGGAACTGCTTCATCTTCTTATCAGG CCTGTACAAGAAATCAATCACAGATCTTCA	Lipka <i>et al.</i> , 2005 Dittgen, 2005

1.3 Medien und Kultivierungen

Als Lösungsmittel für alle Medien wurde 1fach destilliertes Wasser verwendet, welches an einer Anionenaustauschersäle (MILLI-Q_{PLUS}; MILLIPORE-WATERS, Eschborn) aufbereitet wurde (im folgenden mit tridest. H₂O bezeichnet).

1.3.1 Medien und Kultivierung von Bakterien

Zur Kultivierung des verwendeten *E. coli*-Stamms wurde LB (Luria Bertani)-Medium (1% [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 0,5 % [w/v] Natriumchlorid; pH 7,0) bzw. LB-Platten (LB-Medium mit 0,8 % [w/v] Agar) unter Zusatz von 50 µg / ml Ampicillin verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Inkubation der *E. coli*-Kultur erfolgte über Nacht bei 37°C, wobei die Flüssigkultur geschüttelt wurde. Um Blau-Weiß-Selektion zu ermöglichen, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 0,004 % [w/v] X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid) zugesetzt.

1.3.2 Lagerung der Bakterien

Für eine Langzeitlagerung der Bakterien wurden von dem verwendeten *E. coli*-Stamm und transformierten *E. coli*-Stämmen Glyzerinkulturen angelegt. Dafür wurden 850 µl einer Flüssigkultur mit 150 µl sterilem 87 % [v/v] Glyzerin versetzt, anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

1.3.3 Herstellung und Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung sowie die Transformation kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Inoue *et al.*, 1990.

1.3.4 Medien und Kultivierung von phytopathogenen Organismen

Als Lösungsmittel für alle Medien wurde 1fach destilliertes Wasser verwendet, welches an einer Anionenaustauschersäle (MILLI-Q_{PLUS}; MILLIPORE-WATERS, Eschborn) aufbereitet wurde (im folgenden mit tridest. H₂O bezeichnet).

1.3.4.1 *Phytophthora infestans*

Die Kultivierung des *P. infestans* Isolats CRA208 erfolgte auf Hafer-Bohne-Medium (3,4 % [w/v] Bohnenmehl, 1,7 % [w/v] Hafermehl, 0,85 % [w/v] Saccharose, 1,5 % [w/v] Agar) bei 18°C im Dunkeln. Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 5 µg / ml Geneticin (G418) zugesetzt. Zur Isolation der Zoosporensuspension wurde das Myzel nach 10 - 12 Tagen mit 10 ml tridest. H₂O überschichtet und etwa 3 h bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde anschließend kräftig geschüttelt und durch ein Nylonnetz filtriert. Die Bestimmung der Sporenkonzentration erfolgte in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Je nach Verwendung wurde die Sporenkonzentration mit tridest. H₂O auf 5 x 10³ – 5 x 10⁵ Zoosporen / ml eingestellt.

1.3.4.1.1 Lagerung von *Phytophthora infestans*

Zum Anlegen einer Glyzerinkultur des *P. infestans*-Isolats wurde eine Sporangiensuspension einer 10 - 12 Tage alten Kultur verwendet. Dazu wurde das Myzel mit sterilem tridest. H₂O überschichtet, der Überstand kräftig geschüttelt und sofort durch ein Nylonnetz filtriert. Anschließend wurde 100 µl Überstand mit 100 µl sterilem 50 % [v/v] Glyzerin versetzt und schrittweise abgekühlt (30 min 4°C, 1 h -20°C und -80°C über Nacht). Die Langzeitlagerung der Glyzerinkulturen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Alternativ dazu wurden Agarstücke mit Myzel von einer 10 - 12 Tage alten Kultur ausgestochen, mit 500 µl sterilem 50 % [v/v] Glyzerin versetzt und ebenso schrittweise abgekühlt bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert.

1.3.4.2 *Alternaria brassicicola*

Die Kultivierung des *A. brassicicola*-Isolats MUCL 20297 erfolgte auf 0,5 x *Potato Dextrose Agar*-Medium (DUCHEFA, Haarlem; NL) bei 12 h Lichtphase / 12 h Dunkelphase für 9 Tage. Zur Isolation der Zoosporensuspension wurde das Myzel mit tridest. H₂O überschichtet, der Überstand durch ein Nylonnetz filtriert und die Sporenkonzentration in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Konzentration der Sporensuspension wurde auf 5 x 10⁵ / ml eingestellt.

1.3.4.2.1 Lagerung von *Alternaria brassicicola*

Zur Langzeitlagerung des *A. brassicicola*-Isolats wurde die nach dem Überschichten des Myzels mit tridest. H₂O isolierte Sporensuspension bei -20°C gelagert.

1.3.4.3 *Botrytis cinerea*

Die Kultivierung des *B. cinerea*-Isolats MUCL 30158 erfolgte auf 0,5 x *Potato Dextrose Agar*-Medium (DUCHEFA, Haarlem; NL) bei 12 h Lichtphase / 12 h Dunkelphase für 14 Tage. Zur

Isolation der Konidiosporen wurden Agarstücke mit Myzel ausgestochen und 1 h in 2 % [w/v] Malzextrakt geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand durch ein Nylonnetz filtriert und die Sporenkonzentration in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Konzentration der Sporensuspension wurde auf 5×10^5 / ml eingestellt.

1.3.4.3.1 Lagerung von *Botrytis cinerea*

Die Lagerung des *B. cinerea*-Isolats erfolgte auf 0,5 x Potato Dextrose Agar-Medium bei 12 h Lichtphase / 12 h Dunkelphase für etwa 3 Monate.

1.3.5 Substrat und Anzucht von Pflanzen

Die Anzucht aller *A. thaliana*-Ökotypen und Mutanten erfolgte in einer Phytokammer unter kontrollierten Bedingungen (8 h Lichtphase [200 μ E] bei 22°C und 16 h Dunkelphase bei 20°C / 60 % relative Luftfeuchtigkeit. Die Aussaat der Samen erfolgte in einem Gemisch von gedämpfter Einheitserde und Vermiculit (3:1). Die Anzuchtdauer richtete sich nach der Verwendung und Größe der Pflanzen und betrug 4 - 5 Wochen.

1.3.6 Pathogeninfektion von Pflanzen

Für Infektionsexperimente wurden die 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen in einer Phytokammer unter kontrollierten Bedingungen (16 h Lichtphase [200 μ E] bei 20°C und 8 h Dunkelphase bei 18°C / 100 % relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die Pathogeninfektion der Pflanzen erfolgte, wenn nicht gesondert vermerkt, durch Tropfeninokulation der Oberseite voll entwickelter Rosettenblätter mit einer Sporensuspension des entsprechenden Phytopathogens.

2 Methoden

2.1 Standardmethoden

Alle im molekularbiologischen Methodenteil angegebenen Geräte und hitzestabile Lösungen wurden bei 121°C und einem Druck von 1 bar 20 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Nicht autoklavierte Geräte wurden mit 70 %igem Ethanol abgewischt oder abgeflammt. Wenn nicht gesondert vermerkt, wurde als Lösungsmittel tridest. H₂O verwendet. Zentrifugationsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt. Es wurden die Geräte 5415 C sowie 5403 der Firma EPPENDORF (Hamburg) verwendet. Standardmäßige molekularbiologische Arbeitsmethoden wurden nach Ausubel *et al.*, 1997 durchgeführt.

2.2 Nukleinsäureanalytik

2.2.1 Isolierung von DNA

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

2.2.1.1.1 Mini-Präparation

Das Prinzip dieser Methode basiert auf der alkalischen Lyse von Zellen in Gegenwart von SDS nach (Birnboim & Doly, 1979).

Es wurden 2 ml einer Übernachtkultur durch Zentrifugation pelletiert (12 000 x g, RT, 1 min). Das Zellpellet wurde vollständig in 100 µl Lysispuffer (50 mM Glukose, 25 mM Tris pH 8,0 (HCl), 10 mM EDTA; pH 8,0) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (0,2 N NaOH, 1 % [w/v] SDS) und vorsichtigem Mischen erfolgte die Lyse der Zellen. Nach einer weiteren fünfminütigen Inkubation des Lysats auf Eis wurden 150 µl Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure) zur Neutralisation und zur Präzipitation von Proteinen und chromosomaler DNA hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Das Plasmid, welches in renaturierter Form im Überstand vorlag, wurde von den präzipitierten Bestandteilen des Ansatzes mittels Zentrifugation (12 000 x g, 4°C, 10 min) abgetrennt. Aus dem gewonnenen Überstand wurden die Nukleinsäuren mit 0,6 Vol. Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und anschließend zentrifugiert (12 000 x g, 4°C, 15 min). Das Plasmid-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl sterilem tridest. H₂O aufgenommen.

2.2.1.1.2 Midi-Präparation

Um größere Mengen qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA für Klonierungsexperimente zu gewinnen, wurde der „QIAfilter™ Plasmid-Midi-Kit“ (QIAGEN, Hilden) unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Protokolls benutzt. Die Methode beruht auf Trennung der Plasmid-DNA von anderen Zellbestandteilen durch Anionenaustauschersäulen.

2.2.1.2 Präparation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

2.2.1.2.1 Mini-Präparation

Die Isolation genomischen DNA für die PCR erfolgte durch die CTAB-Mini-Präparation nach Rogers & Bendich, 1988. Dazu wurden 2 - 3 Blätter im vorgekühlten Mörser oder im Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Das Stickstoffpulver wurde in 200 µl CTAB-Extraktionspuffer (100 mM Tris pH 8,0 (HCl), 20 mM EDTA pH 8,0, 1,4 M NaCl, 2 % [w/v] CTAB; 1 % [w/v] Polyvinylpyrrolidin) aufgenommen, geschüttelt und anschließend bei 65°C 20 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde vorsichtig geschüttelt. Zur Trennung des

Phasengemisches erfolgte eine Zentrifugation des Ansatzes (12 000 x g, 4°C, 15 min). Aus der abgenommenen, oberen wässrigen Phase wurden nun die Nukleinsäuren mit 3 Vol. 96 %igem Ethanol nach 20 min Inkubation bei -20°C ausgefällt. Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl tridest. H₂O aufgenommen.

2.2.2 Isolierung von RNA

Alle für den Umgang mit RNA verwendeten Geräte wurden vor Gebrauch mit 0,1 % [v/v] DEPC behandelt und anschließend autoklaviert oder mit 10 % [v/v] H₂O₂ abgewischt. Lösungen wurden ebenfalls mit 0,1 % [v/v] DEPC versetzt und autoklaviert oder DEPC-behandeltes autoklaviertes tridest. H₂O wurde autoklavierten Puffern zugesetzt.

2.2.2.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation der Gesamt-RNA wurde nach der TRIZOL®-Methode (Chomczynski & Sacchi, 1987) durchgeführt. Dazu wurde etwa 0,1 g Blattmaterial im vorgekühlten Mörser oder im Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Das Stickstoffpulver wurde in 1 ml RNA-Extraktionspuffer (0,8 M Guanidinthiozyanat, 0,4 M Ammoniumthiozyanat, 0,1 M Natriumacetat pH 5,0, 5 % [v/v] Glyzerin, 38 % [v/v] in Wasser gesättigtes Phenol) aufgenommen und etwa 1 min kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde nochmals 1 min kräftig geschüttelt. Zur Denaturierung der Proteine wurde 200 µl Chloroform zugesetzt. Anschließend wurde 30 sec kräftig geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Zur Trennung des Phasengemisches wurde der Ansatz zentrifugiert (12 000 x g, 4°C, 15 min). Aus der abgenommenen, oberen wässrigen Phase wurden nun die Nukleinsäuren mit 0,8 Vol. Isopropanol nach 10 min Inkubation bei RT ausgefällt und der Ansatz anschließend zentrifugiert (12 000 x g, 4°C, 10 min). Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl sterilem tridest. H₂O aufgenommen.

2.2.3 Gelelektrophorese von DNA und RNA

2.2.3.1 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese wurde für die préparative und analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet. Die Präparation des Gels sowie die Elektrophorese erfolgten in TAE-Laufpuffer (40 mM Tris (HCl), 20 mM Natriumacetat; 2 mM EDTA pH 8,0). Die Agarosekonzentration lag je nach Größe der zu analysierenden Fragmente bei 0,8-1,5 % [w/v]. Zur Analyse der SSLP-Marker-PCR erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in 3 %iger [w/v] *low melting*-Agarose unter Verwendung von TBE-Laufpuffer (89 mM Tris (HCl), 89 mM Borsäure, 2

mM EDTA pH 8,0). Die DNA-Proben wurden mit rund 0,1 Vol. Probenpuffer (0,1 % [w/v] Bromphenolblau, 50 % [v/v], Glyzerin, 0,1 % [w/v] Xylenzyanol, 0,1 M EDTA) versetzt und bei einer Spannung von 70-100 V in horizontalen Elektrophoresekammern (HORIZON® 1114; LIFE TECHNOLOGIES™ GIBCO BRL, Eggenstein) aufgetrennt. Als Größenmarker wurde λ -DNA, die mit der Restriktionsendonuklease PstI geschnitten wurde, eingesetzt.

Die Anfärbung der DNA-Fragmente in den TAE-Agarosegelen erfolgte durch die Inkubation (10-20 min) des Gels in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (1 μ g / ml). Durch die Zugabe von 0,03 % [v/v] Ethidiumbromid zur Gellösung erfolgte die Anfärbung der DNA-Fragmente in den TBE-Agarosegelen. Zur Dokumentation wurden die Gele mittels eines Transilluminators betrachtet bzw. mit einer Kamera fotografiert.

2.2.3.2 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht das DNA-Fragment erwarteter Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Reinigung erfolgte mit dem „QIAEXII Gel-Extraction-Kit“ (QIAGEN, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

2.2.3.3 Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen im 1 %igem [w/v] Agarosegel unter Verwendung von MEN-Puffer (200 mM MOPS pH 7,0 (NaOH), 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA) als Laufpuffer. Dazu wurden die Agarose im Laufpuffer geschmolzen und nach dem Abkühlen mit 6 % [v/v] Formaldehyd versetzt. Die Gellösung wurde anschließend sofort in eine horizontale Elektrophoresekammer (HORIZON® 11-14; LIFE TECHNOLOGIES™ GIBCO BRL, Eggenstein) gefüllt. 20 μ g Gesamt-RNA wurden mit tridest. H_2O auf ein RNA-Probenvolumen von 10 μ l eingestellt und mit 15 μ l RNA-Probenpuffer (50 % [v/v] Formamid, 10 % [v/v] 10x MEN-Puffer, 6 % [v/v] Formaldehyd, 6 % [v/v] Glyzerin, 0,04 % [v/v] Bromphenolblau) versetzt. Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei 65 °C zur Denaturierung der RNA inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Nach Zusatz von 1 μ l Ethidiumbromid (1 μ g / μ l) wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und die RNA etwa 1,5 h bei einer Spannung von 80 V aufgetrennt.

2.2.4 Nachweis spezifischer RNA-Moleküle

2.2.4.1 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern-Blot)

Die elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde mittels eines Kapillar-Blots auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Dazu wurde das zur Auftrennung der RNA verwendete Agarosegel auf einem Nylonfilter, welcher sich auf einem Stapel Zellstofflagen befand, plaziert. Durch eine geeignete Konstruktion wurde mittels Kapillarwirkung der sich in einem Vorratsgefäß befindende Transferpuffer (20 x SSC; 3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0) durch die Lagen Zellstoff gesogen um dabei die RNA aus dem Gel auf die Membran zu transferieren. Nach einer Transferzeit von ca. 16 h wurde die sich auf der Nylonmembran befindende Nukleinsäure durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker®; STRATAGENE, Heidelberg) kovalent fixiert.

2.2.4.2 Radioaktive Hybridisierung

Die zur Hybridisierung vorgesehenen Filter wurden durch 1 stündige Inkubation in 10-15 ml Hybridisierungslösung (0,2 % [w/v] Polyvinylpyrrolidin, 0,2 % [w/v] Ficoll 400 (PHARMACIA, Uppsala, Schweden), 0,2 % [w/v] BSA Fraktion V, 48 % [v/v] Lösung N (1,8 M Natriumchlorid; 100 mM Natriumdihydrogenphosphat, 10 mM EDTA, 0,2 % [w/v] SDS; pH 7,0), 48 % [v/v] Formamid, 100 µg / ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA) bei 42°C vorhybridisiert. Dazu wurden die Filter und die Hybridisierungslösung in Glasröhren gegeben und im Hybridisierungssinkubator (Modell 7601; GFL, Burgwedel) rotierend bewegt. Anschließend wurde die frisch hitzedenaturierte und auf Eis abgekühlte, radioaktiv markierte DNA-Sonde (siehe 2.2.5.1) dazugegeben. Die Hybridisierung erfolgte analog zu den oben angegebenen Bedingungen über Nacht. Die Filter wurden nach Entfernen der Hybridisierungslösung dreimal 20 min in Waschlösung I (3x SSC; 0,1 % [w/v] SDS) bei 60 °C und einmal 2 min in Waschlösung II (3x SSC) bei RT im Hybridisierungssinkubator gewaschen. Anschließend wurden die Filter luftgetrocknet und in Folie eingeschlagen. Die Lagerung erfolgte in strahlungsdichten Kassetten bei RT.

Die zu detektierenden Filter wurden mit einem „Phospho-Screen“ (MOLECULAR DYNAMICS, Krefeld) bei RT über Nacht exponiert und anschließend am „Phospho-Imager“ (STORM 860; MOLECULAR DYNAMICS) gescannt. Die Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte durch das Programm „ImageQuaNT“ des gleichen Herstellers.

2.2.5 Enzymatische Modifikation von DNA

DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

2.2.5.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Zufallsprimer-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1984) unter Verwendung des „Megaprime-DNA Labeling Kit“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg). Es wurden 5 µl DNA (ca. 25-50 ng) und 5 µl α -[³²P]-dATP (3000 Curie/mmol) eingesetzt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über „ProbeQuantTM G-50 Micro Columns“ des gleichen Herstellers abgetrennt.

2.2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von Nukleotidsequenzen in den SSLP- bzw. CAPS-Marker-Analysen eingesetzt. Als DNA-Matrize diente die in der Minipräparation (siehe 2.2.1.2.1) aus *A. thaliana* isolierte genomische DNA. Die PCR wurde nach Herstellerangaben mit *Taq*-DNA-Polymerase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS oder INVITROGEN) in Thermozykler (PERKIN ELMER, Wellesley; USA) unter Verwendung der folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 1 min Vorinkubation bei 94°C; 40 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Primeranlagerung bei 50 - 55°C und 30 sec Extension bei 72°C; 2 min Endamplifikation bei 72°C. Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 1 µl DNA-Matrize, 0,5 µl 5'-Oligonukleotid (100 µM), 0,5 µl 3'-Oligonukleotid (100 µM), 2 µl 10 x *Taq*-Reaktionspuffer, 0,6 – 1 µl MgCl₂ (50 mM), 2 µl dNTP-Mix (2 mM), 2 – 5 U *Taq*-DNA-Polymerase, ad 20 µl tridest. H₂O)

2.2.5.3 Genotypisierung

Um Aufschluss über den Genotyp der unterschiedlichen mutanten *A. thaliana*-Linien hinsichtlich einer Homo- bzw. Heterozygotie von *pen2* zu erhalten, erfolgte eine CAPS-Marker-basierte Genotypisierung. Dazu wurde DNA der entsprechenden Pflanzen isoliert (siehe 2.2.2.1) und unter Nutzung von *pen2*-spezifischen Oligonukleotiden eine PCR (siehe 2.2.5.2) durchgeführt. Anschließend wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mit der Restriktionsendonuklease *Bsp*PI 2 Stunden bei 55°C verdaut und die DNA-Fragmente in 3 %iger [w/v] *low melting*-Agarose unter Verwendung von TBE-Laufpuffer aufgetrennt. Da die Restriktionsschnittstelle von *Bsp*PI nur im PEN2-Wildtypallel vorhanden ist, wurden je nach Genotyp die in der Tab. B-5 dargestellten Fragmentgrößen erwartet.

Tab. B-5: Genotypisierung / Fragmentgrößen nach *BspPI*-Verdau

Genotyp	Fragmentgrößen nach <i>BspPI</i> -Verdau
<i>PEN2 / PEN2</i> (homozygot Wildtyp)	179 bp, 169 bp
<i>PEN2 / pen2</i> (heterozygot)	348 bp, 179 bp, 169 bp
<i>pen2 / pen2</i> (homozygot Mutante)	348 bp

2.2.5.4 Grobkartierung der Sekundärmutation

Zur Grobkartierung der Sekundärmutation, d. h. zur Bestimmung der Position der Sekundärmutation relativ zu bereits bekannten Markern erfolgte die Segregationsanalyse von Sequenzpolymorphismen (SSLP-Marker) in der F2-Nachkommenschaft (Kartierungspopulation) einer Kreuzung der Mutante 222 (Col-3g/1pen2-Hintergrund) und des *A. thaliana*-Ökotyps Landsberg erecta (Ler-Hintergrund). Aufgrund der sehr ähnlichen genetischen Konstitution der Columbia-Accession 0 (Col-0) und der Columbia-Accession 3 (Col-3), wurden die zwischen dem *A. thaliana*-Ökotyp Ler und dem *A. thaliana*-Ökotyp Col-0 existierenden Sequenzpolymorphismen verwendet. Dazu erfolgte die Nutzung der unter <http://www.arabidopsis.org/> bereitgestellten Internetressourcen und Datenbanken. Zur Analyse der Segregation der SSLP-Marker erfolgte die Isolation von F2-Pflanzen aus der Kartierungspopulation mit einer im Vergleich zu *pen2* verstärkten HR nach *P. infestans*-Infektion (1×10^5 / ml), d. h. von Mutanten in denen die Sekundärmutation putativ homozygot vorlag. Die zu untersuchenden Sequenzbereiche wurden durch spezifische Oligonukleotide (siehe Tab. B-3) mit Hilfe der PCR (siehe 2.2.5.2) amplifiziert und anschließend in Agarosegelen (siehe 2.2.3.1) analysiert. Durch Verwendung kodominanter SSLP-Marker war es dabei möglich, neben den homozygoten Konstitutionen auch die heterozygote Konstitution zu erkennen. Es wurde davon ausgegangen, dass eine Kopplung der Sekundärmutation und einem bereits kartierten Marker zu einer Abweichung der erwarteten Segregation für frei rekombinierbare Marker führt, da die Rekombinationsfrequenz zwischen benachbarten Loci abnimmt, je näher diese zusammenliegen. Besteht zwischen diesen Loci eine Kopplung, kommt es zu einer Verschiebung der Segregation in Richtung Columbia, da der Genotyp in der Nähe der im Columbia-Hintergrund erzeugten Sekundärmutation Columbia ist.

2.2.5.5 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

2.2.5.5.1 Automatisierte Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte mittels eines automatischen Sequenzierers (LiCor, Modell 4000L bzw. LONGREADIR 4200, MWG-Biotech, Ebersberg). Für die Sequenzierreaktionen wurde der „SequiTherm EXCEL™ Long-Read™ Sequencing Kit“ (BIOZYM,

Hess. Oldendorf) verwendet, wobei die verwendeten Primer „IRD700“ bzw. „IRD800“ (MWG-BIOTECH, Ebersberg) 5'-fluoreszenzmarkiert waren.

2.2.5.5.2 Computergestützte Sequenzanalyse

DNA-Sequenzdaten wurden mit Einträgen in Datenbanken unter Verwendung von Programmen, die den BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) unterstützen, verglichen. Die verwendeten Programme werden vom *National Centre for Biotechnological Information* unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST> zur Verfügung gestellt.

2.3 Mikroskopische Analysen

2.3.1 Lichtmikroskopische Analyse

Alle lichtmikroskopischen Analysen von infiziertem Blattmaterial erfolgten mit dem Fluoreszenzmikroskop ZEISS Axioskop II (ZEISS, Göttingen). Zur Übersichtsanalyse der Autofluoreszenz bzw. zur Durchmusterung des Autofluoreszenz-Phänotyps in der M2-Nachkommenschaft wurde das Fluoreszenz-Stereomikroskop LEICA MZ FLIII (LEICA, Wetzlar) mit GFP-Filtersatz verwendet.

2.3.1.1 Trypan-Blau-Färbung infizierter Blätter

Zum Nachweis des hypersensitiven Zelltods bzw. von Pathogenstrukturen in infiziertem Blattgewebe erfolgte die Färbung mit dem Farbstoff Trypan-Blau (modifiziert nach Wilson & Coffey, 1980). Dazu wurden inkulizierte Rosettenblätter in einer siedenden Trypan-Blau-Färbelösung (1 Vol. Lactophenol-Trypan-Blau (10 ml Milchsäure, 10 g Phenol, 10 ml Glycerin, 10 ml tridest. H₂O, 0,1 % [w/v] Trypan-Blau), 2 Vol. 96 % [v/v] Ethanol) etwa 1 min inkubiert und anschließend in tridest. H₂O gewaschen. Zum Entfärben der Blätter erfolgte eine 2 – 5tägige Inkubation in Chloralhydrat (2,5 g / ml) bei RT, wobei die Entfärbelösung mindestens einmal erneuert wurde. Nach dem Entfärben wurden die Blätter in tridest. H₂O gewaschen und zur Lagerung in 50 % (v/v) Glycerin aufgenommen oder zur Mikroskopie in 50 % (v/v) Glycerin eingebettet. Die mikroskopische Analyse der gefärbten Blätter erfolgte im Hellfeld unter Verwendung einer DIC-Optik (Differential Interference Contrast).

2.3.1.2 DAB-Färbung infizierter Blätter

Zur Untersuchung der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies erfolgte der Nachweis von H₂O₂ in infizierten Blattgewebe durch Färbung mit dem Farbstoff DAB (3,3'-Diaminobenzidin), modifiziert nach Thordal-Christensen *et al.*, 1997. Dazu wurden inkulizierte Rosettenblätter in einer frisch hergestellten DAB-Färbelösung (0,2 % [w/v] 3,3'-Diaminobenzidin; pH 3,8 (HCl)) für 2 h bei RT

inkubiert und anschließend mit tridest. H₂O gewaschen. Die Chlorophyllextraktion erfolgte durch kurzes Aufkochen der Blätter in 96 %igem [v/v] Ethanol. Zum Entfärbten des Blattmaterials erfolgte eine 1 – 2tägige Inkubation in Chloral-Hydrat (2,5 g / ml) bei RT, wobei die Entfärbelösung mindestens einmal erneuert wurde. Nach dem Entfärbten wurden die Blätter in tridest. H₂O gewaschen und zur Lagerung in 50 % [v/v] Glyzerin aufgenommen oder zur Mikroskopie in 50 % [v/v] Glyzerin eingebettet. Die mikroskopische Analyse der gefärbten Blätter erfolgte im Hellfeld unter Verwendung einer DIC-Optik.

2.3.1.3 Anilin-Blau-Färbung infizierter Blätter

Um Kallose in den infizierten Blättern nachzuweisen erfolgte die Färbung mit dem Farbstoff Anilin-Blau nach einem modifizierten Protokoll von Adam & Somerville, 1996. Dazu wurde durch kurzes Aufkochen der Blätter in 96 % [v/v] Ethanol das Chlorophyll extrahiert. Das Blattmaterial wurde anschließend in einer frisch hergestellten Anilin-Blau-Färbelösung (150 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 0,01 % [w/v] Anilin-Blau; pH 9,5 (KOH)) für 30–60 min bei RT inkubiert und anschließend mit tridest. H₂O gewaschen. Zur Lagerung wurden die Blätter in 50 % [v/v] Glyzerin aufgenommen oder zur Mikroskopie in 50 % [v/v] Glyzerin eingebettet. Die mikroskopische Analyse der gefärbten Blätter erfolgte unter Fluoreszenz-Anregung (365 nm).

2.3.1.4 Kombinierte Trypan-Blau- und Anilin-Blau-Färbung infizierter Blätter

Um die Akkumulation von Kallose und den hypersensitiven Zelltod in infizierten Blättern parallel zu untersuchen wurde eine kombinierte Färbung mit Trypan-Blau und Anillin-Blau durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst eine Trypan-Blau-Färbung 2.3.1.1 ohne jedoch die gefärbten Blätter in Chloral-Hydrat zu entfärbten. Das Trypan-Blau-gefärbte Blattmaterial wurde nun in einer frisch hergestellten Anilin-Blau-Färbelösung für 30–60 min bei RT inkubiert und anschließend mit tridest. H₂O gewaschen. Zur Lagerung wurden die Blätter in 50 % [v/v] Glyzerin aufgenommen oder zur Mikroskopie in 50 % [v/v] Glyzerin eingebettet. Die mikroskopische Analyse der gefärbten Blätter erfolgte im Hellfeld unter Verwendung einer DIC-Optik und unter Fluoreszenz-Anregung (365 nm).

2.3.1.5 Untersuchung der Autofluoreszenz

Die mikroskopische Untersuchung der Autofluoreszenz infizierter Blätter erfolgte in dem bereits mit Trypan-Blau oder DAB gefärbten Blattmaterial unter Fluoreszenz-Anregung (365 nm).

2.3.2 Elektronenmikroskopische Analyse

Die elektronenmikroskopische Analyse wurde durchgeführt von M. Birschwilks (IPB Halle). Dazu wurden die nekrotischen Blattbereiche 3 Tage nach Inkulation einer *P. infestans*-

Zoosporenkonzentration (5×10^5 / ml) präpariert und in 3 %igem [v/v] Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (18,2 % [v/v] Lösung A (67 mM Kaliumdihydrogenphosphat), 81,8 % [v/v] Lösung B (84 mM Dinatriumhydrogenphosphat [2 H₂O]) vorfixiert. Die Fixierung erfolgte in 1 %igem [w/v] Osmiumtetroxid in Paladepuffer (2,94 % [w/v] Veronal-Natrium, 1,94 % [w/v] Natriumacetat [3 H₂O]). Das Blattgewebe wurde anschließend in einer Aceton-Reihe entwässert und in Spurrs Epoxydharz ERL (*Epoxy Resin Low Viscosity*) eingebettet (Spurr, 1969). Nach der Infiltration wurden die Proben in Einbettungsgefäße überführt und 2 Tage bei 60°C polymerisiert. Die gesamte Prozedur erfolgte in einem Einbettungsautomaten (LYNXTMel, LEICA).

Für die Anfertigung der Ultradünnsschnitte (50 – 70 nm) wurde ein Ultramikrotom (ULTRACUT S, LEICA) verwendet. Die erhaltenen Ultradünnsschnitte wurden mit Chloroform gestreckt und mit Cedukol-beschichteten Kupferträgernetzchen (200 mesh) aufgenommen.

Die Kontrastierung der Präparate erfolgte wie in Reynolds (1963) beschrieben. Die Auswertung der Ultradünnsschnitte erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 912 OMEGA; LEO ELEKTRONENMIKROSKOPIE, Oberkochen).

2.4 Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten

2.4.1 EMS-Remutagenese von *pen2-1*-Samen

Die EMS-Remutagenese wurde in Zusammenarbeit mit V. Lipka (MPIZ, Köln) durchgeführt. Zur Vorbehandlung wurden das Saatgut nacheinander für 4 Tage bei 4°C und 1 Tag bei 25°C in einer Feuchtekammer inkubiert. Die Remutagenese des *pen2-1*-Saatguts erfolgte durch eine ca. 10stündige Inkubation von etwa 50 000 *pen2-1*-Samen in einer 0,3 %igen [v/v] EMS-Lösung. Reste der EMS-Lösung wurden anschließend durch mehrfaches Waschen mit tridest. H₂O entfernt. Alle EMS-kontaminierten Gegenstände und Materialien wurden zunächst in einer 4 %igen [w/v] Natriumhydroxid-Dekontaminierungslösung aufbewahrt, welche nach 24 Stunden mit Chlorwasserstoffsäure neutralisiert wurde. Um eine gleichmäßige Aussaat des remutagenisierten *pen2-1*-Saatguts zu ermöglichen, wurden die Samen in einer 0,1 % [w/v] Agaroselösung aufgenommen und in definierten Volumina auf dem Anzuchtssubstrat verteilt.

2.4.2 Bestimmung der Penetrations-Häufigkeit

Die Bonitur der Resistenz unterschiedlicher *A. thaliana*-Genotypen gegen *P. infestans* erfolgte durch Bestimmung der Penetrations-Häufigkeit, d. h. der Anzahl infizierter und mit hypersensitivem Zelltod reagierender epidermaler Zellen je Blatt. Zum Nachweis hypersensitiv reagierender, d. h. toter Zellen erfolgte eine Trypan-Blau-Färbung des infizierten Blattmaterials. Dazu wurden voll entwickelte Rosettenblätter mit 10 µl einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^3 oder 2×10^4 / ml) in der Blattmitte inokuliert und 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit in einer

Phytokammer unter kontrollierten Bedingungen (siehe 1.3.6) inkubiert und anschließend mit Trypan-Blau gefärbt. Ausgewertet wurden 8 - 15 infizierte Blätter je Genotyp.

2.4.3 Quantifizierung des hypersensitiven Zelltods, der H₂O₂-Akkumulation und der Autofluoreszenz

Die Quantifizierung des hypersensitiven Zelltods sowie der H₂O₂-Akkumulation erfolgte durch computergestützte Bestimmung des Trypan-Blau- bzw. des DAB-Index in entsprechenden infizierten und gefärbten Blättern. Dazu wurden die Blätter fotografiert und die Intensität der gefärbten Bereiche durch Analyse der Pixel mittels des Programms SCION IMAGE 4.0.2 (<http://www.scioncorp.com>) quantifiziert. Zur Quantifizierung der Autofluoreszenz wurden infizierte Blätter am Fluoreszenz-Stereomikroskop fotografiert und die Intensität der fluoreszierenden Bereiche durch Analyse der Pixel ermittelt.

2.4.4 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Zur Kreuzung der unterschiedlichen *A. thaliana*-Linien wurden die Pflanzen am Binokular unter Verwendung einer Präzisionspinzette (DUMONT No. 5) präpariert. Als Pollenempfänger wurden Pflanzen ausgewählt, welche eine entsprechend große Zahl von Blüten aufwiesen die noch ungeöffnet waren, d. h. die Spitzen der Petalen (Kronblätter) waren bereits als weißer Punkt zu erkennen. Nachdem alle Blütenteile, bis auf das Karpel (Fruchtblatt) entfernt wurden, erfolgte die Bestäubung mit Pollen einer bereits voll geöffnete Blüte des Pollenspenders. Alle übrigen Blütenstände des Pollenempfängers wurden ebenfalls entfernt. Nach der Kreuzung wurden die Pflanzen einige Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und unter Langtagbedingungen im Gewächshaus zur Samenreife gebracht.

2.4.5 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Analyse der Daten zur Penetrations-Häufigkeit von *P. infestans* sowie sämtliche Daten zur Quantifizierung des hypersensitiven Zelltods, der H₂O₂-Akkumulation und der Autofluoreszenz nach *P. infestans*-Infektion erfolgte durch Einweg-ANOVA mit einem post-hoc Tukey Test mit Hilfe des Programms GRAPHPAD INSTAT Version 3.05 (<http://www.graphpad.com>), wobei $P \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde. Zur Prüfung der Kreuzungsergebnisse, d. h. zur Ermittlung der Wahrscheinlichkeit mit der ein experimentell ermittelter Wert dem erwarteten Mittelwert einer normierten Zufallsverteilung entspricht, wurde der χ^2 -Test verwendet, wobei $P \geq 0,05$ als statistisch signifikant galt.

C Ergebnisse

1 Charakterisierung des Nichtwirts-Pathosystems *Arabidopsis thaliana-Phytophthora infestans*

1.1 Nekrose-Phänotyp nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Die Etablierung des im folgenden beschriebenen Nichtwirts-Pathosystems *Arabidopsis thaliana-Phytophthora infestans* erfolgte durch vergleichende Analyse der Pflanze-Pathogen-Interaktion sowie der pflanzlichen Abwehrreaktionen nach *P. infestans*-Infektion in unterschiedlichen *A. thaliana*-Genotypen.

Die zur Untersuchung verwendete *A. thaliana*-Mutante *pen2-1* (PENETRATION2, im folgenden mit *pen2* bezeichnet) und die *A. thaliana*-Doppelmutante *pen2 pen1-1* wurden freundlicherweise von V. Lipka und P. Schulze-Lefert (MPIZ Köln) zur Verfügung gestellt. Die *A. thaliana*-Mutante *pen1-1* (PENETRATION1, im folgenden mit *pen1* bezeichnet), wurde freundlicherweise von H. Thordal-Christensen (Risø National Laboratory; Roskilde, DK) zur Verfügung gestellt. Das verwendete *P. infestans*-Isolat CRA208 wurde freundlicherweise von F. Mauch (Université de Fribourg, CH) zur Verfügung gestellt. Dieses *P. infestans*-Isolat exprimiert konstitutiv ein GFP-Konstrukt unter Kontrolle des Promotors des *Ham34*-Gens aus dem Oomyzeten *Bremia lactucae* und ist durch eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geneticin (G418) gekennzeichnet (Si-Ammour *et al.*, 2003). Als Kontrollen für die verschiedenen Genotypen wurden Pflanzen der *A. thaliana*-Mutante *gl1-1* (GLABROUS1, Hülskamp *et al.*, 1994; Koornneef *et al.*, 1982; im folgenden mit *gl1* bezeichnet) sowie des *A. thaliana* Ökotyps Col-0 untersucht.

Die *P. infestans*-Inokulation von Blättern der Mutante *gl1* und des *A. thaliana*-Ökotyps Col-0 zeigt, dass 3 Tage nach der Pathogeninfektion keine sichtbaren nekrotischen Reaktionen zu beobachten sind (Abb. C-1). Im Gegensatz dazu sind erste sichtbare Nekrotisierungen auf den Blättern der Mutante *pen2* und der Doppelmutante *pen2 pen1* bereits 1 - 2 Tage nach *P. infestans*-Infektion zu beobachten (Daten nicht gezeigt). 3 Tage nach der *P. infestans*-Inokulation waren auf Blättern von *pen2* und *pen2 pen1* deutliche Nekrosen in den inokulierten Bereichen zu beobachten. (Abb. C-1). Die Stärke der Nekrosen war in beiden Genotypen in mehreren Experimenten nicht signifikant unterschiedlich (Daten nicht gezeigt). Die Inokulation von Blättern der Mutante *pen1* führte jedoch zu keinen oder nur schwachen Nekrosen (Abb. C-1). Die Mutation in *PEN1* scheint somit keinen verstärkenden oder abschwächenden Effekt auf den durch *pen2* verursachten Nekrose-Phänotyp nach *P. infestans*-Infektion zu haben.

Nach einer Inkubation von 7 Tagen wurden keine weiteren Veränderungen der Nekrosen sowie keine Krankheitssymptome oder Sporulation auf Blättern aller untersuchten Genotypen beobachtet. Die in Abb. C-1 gezeigten Nekrose-Phänotypen wurden in mindestens einem weiteren unabhängigen Experiment in vergleichbarer Ausprägung reproduziert. Innerhalb eines Experiments und eines Genotyps waren die beobachteten Nekrosen, bedingt durch die vorhandene experimentelle und biologische Variabilität, teilweise unterschiedlich stark ausgeprägt (Abb. C-1). Aus diesem Grund wurde in dieser und allen weiteren Analysen, in denen Pflanzen mit Pathogenen infiziert wurden, eine entsprechend große Anzahl Pflanzen eines jeden Genotyps in mehreren, unabhängigen Experimenten ausgewertet.

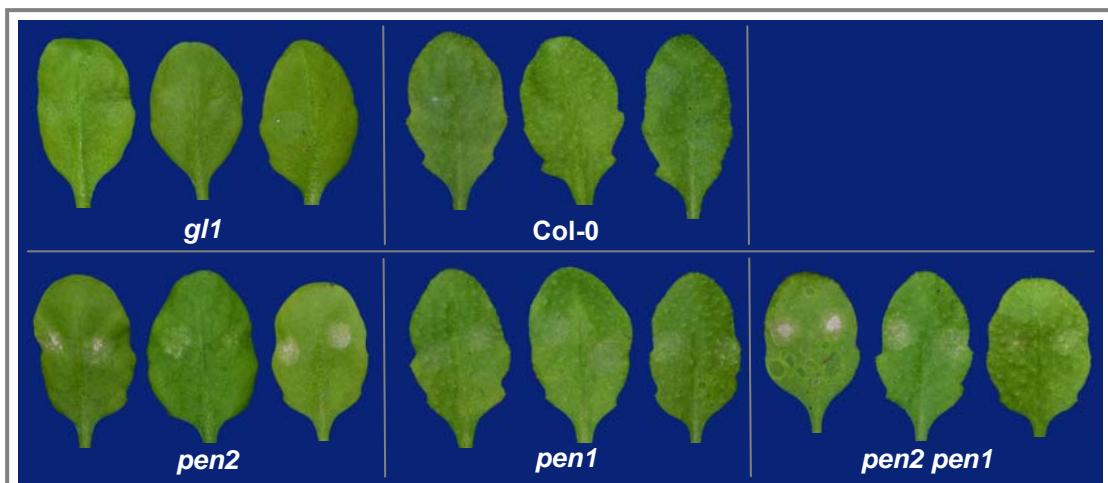


Abb. C-1: Nekrose-Phänotyp nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden jeweils mit 10 µl einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^5 / ml) links und rechts der Mittelrippe inokuliert und 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Blätter.

1.2 Autofluoreszenz-Phänotyp nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Um eine mögliche Korrelation der Akkumulation autofluoreszierender Verbindungen mit dem in Abb. C-1 gezeigten Nekrose-Phänotyp zu untersuchen, wurden mit *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml) inokulierte Blätter unter dem Fluoreszenz-Stereomikroskop analysiert. In Abb. C-2 ist der Autofluoreszenz-Phänotyp einer repräsentativen Auswahl von inokulierten Blättern der Genotypen *pen2*, *pen1*, *pen2 pen1*, *gl1* und *Col-0* dargestellt.

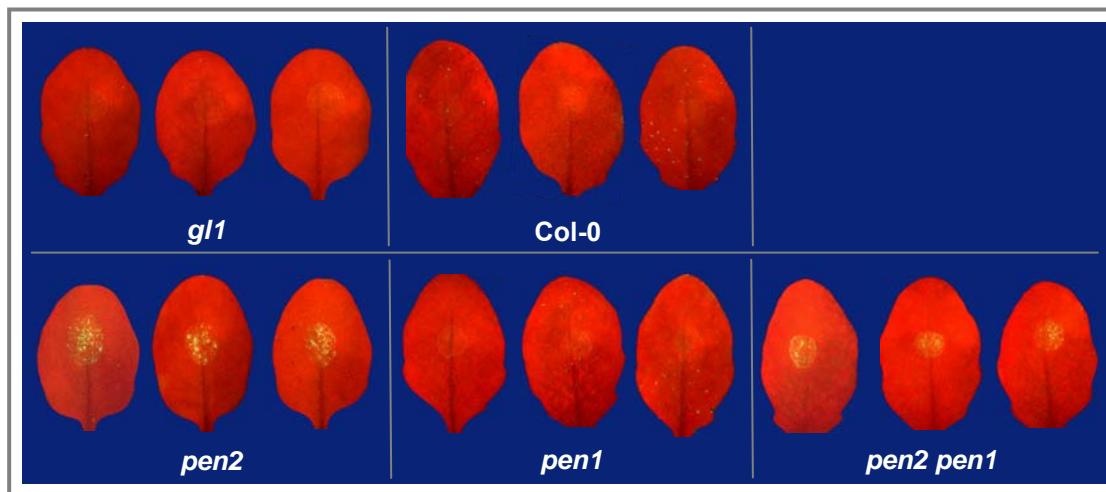


Abb. C-2: Autofluoreszenz-Phänotyp nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden jeweils mit 10 μ l einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml) inkuliert, 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenz-Stereomikroskop analysiert. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Blätter.

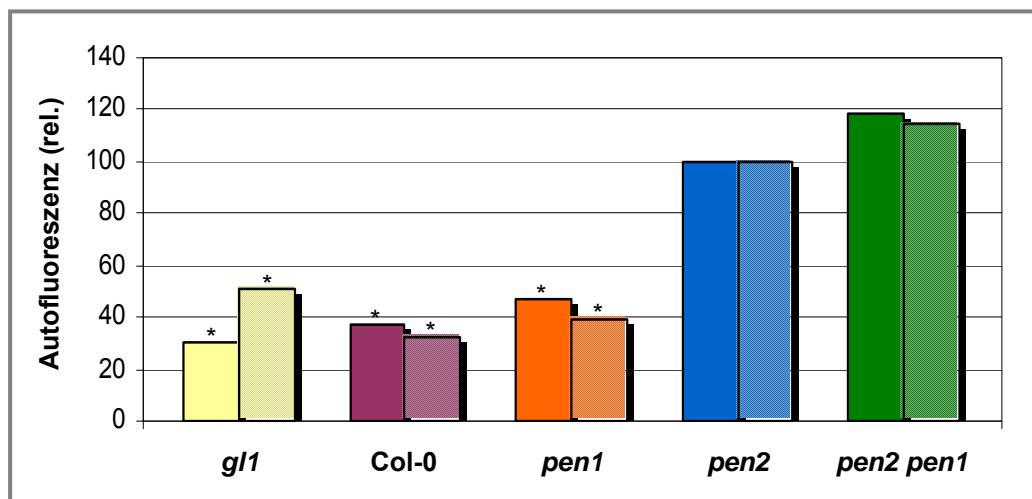


Abb. C-3: Quantifizierung des Autofluoreszenz-Phänotyps nach *P. infestans*-Inokulation. Dargestellt ist die quantitative Analyse der relativen Pixel-Zahl als Index der Autofluoreszenz in unterschiedlichen Genotypen nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 5 - 8 inkulierten Blättern je Genotyp (Nicht schraffierte bzw. schraffierte Balken entsprechen jeweils den Daten eines Experiments). Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied der Daten im Vergleich zu pen2 (Einweg-ANOVA, $P \leq 0,001$).

pen2 und pen2 pen1 reagieren 3 Tage nach *P. infestans*-Inokulation mit einer vergleichbaren, starken Autofluoreszenz in den nekrotischen Bereichen (Abb. C-2). Im Gegensatz dazu zeigen inkulierte Blätter von pen1 sowie der Kontrollen g1 und Col-0 nur schwache oder keine Autofluoreszenz (Abb. C-2). Die Quantifizierung der nach *P. infestans*-Inokulation beobachteten Autofluoreszenz erfolgte durch computergestützte Ermittlung des Pixel-Index in den infizierten Bereichen inkulierter Blätter (Abb. C-3). Die Intensität der Autofluoreszenz nach *P. infestans*-Inokulation ist dabei in pen2 und pen2 pen1 nicht signifikant unterschiedlich, jedoch etwa zweifach

höher als in den entsprechenden, inokulierten Kontrollen *gl1* und *Col-0*. Die Analyse der Autofluoreszenz zeigt, dass der Nekrose-Phänotyp (Abb. C-1) mit der Akkumulation autofluoreszierender Verbindungen in den unterschiedlichen *A. thaliana*-Genotypen korreliert.

1.3 Hypersensitiver Zelltod nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Die Analyse des hypersensitiven Zelltods in den unterschiedlichen *A. thaliana*-Genotypen nach Inokulation mit *P. infestans* wurde nach Trypan-Blau-Färbung der infizierten Blätter durchgeführt (modifiziert nach Wilson & Coffey, 1980). Der Farbstoff Trypan-Blau färbt selektiv Pathogenstrukturen im Pflanzengewebe und ist durch eine Membran-Impermeabilität für vitale Zellen gekennzeichnet. Durch spezifische Blaufärbung von toten Zellen ist daher ein lichtmikroskopischer Nachweis hypersensitiv reagierender Zellen in infizierten Blättern möglich. Die Quantifizierung des nach *P. infestans*-Inokulation beobachteten hypersensitiven Zelltods erfolgte durch computergestützte Ermittlung des Pixel-Index in infizierten, Trypan-Blau-gefärbten Blättern (Abb. C-5). In Abb. C-4 ist eine repräsentative Auswahl infizierter Blätter nach Trypan-Blau-Färbung dargestellt. Die inokulierten Bereiche in *pen2* und *pen2 pen1* zeigen dabei eine im Vergleich zu *gl1* und *Col-0* starke Blaufärbung bzw. erhöhte Zelltod-Häufigkeit (Abb. C-4 und C-5). Der hypersensitive Zelltod in den inokulierten Bereichen von *pen1* und der Kontrolle *Col-0* ist hingegen vergleichbar (Abb. C-4 und C-5). Die Mutation in *PEN1* führt daher zu keiner Verstärkung des hypersensitiven Zelltods im Wildtyp *Col-0* nach *P. infestans*-Infektion. Weiterhin zeigen die Daten, dass *PEN1* keinen Effekt auf die erhöhte Zelltod-Häufigkeit in *pen2* nach *P. infestans*-Inokulation zu haben scheint.

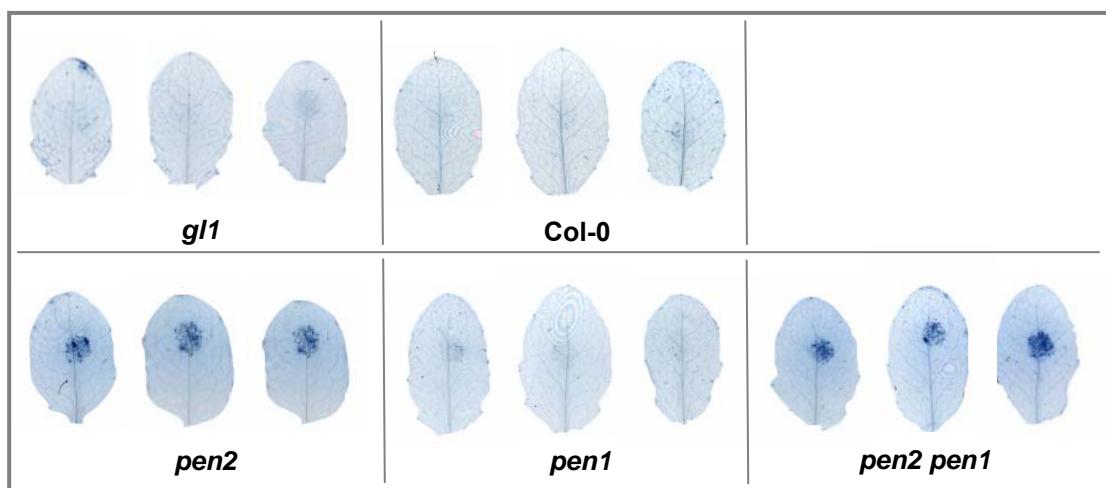


Abb. C-4: Hypersensitiver Zelltod nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden jeweils mit 10 µl einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml) inokuliert, 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend mit Trypan-Blau gefärbt. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Blätter.

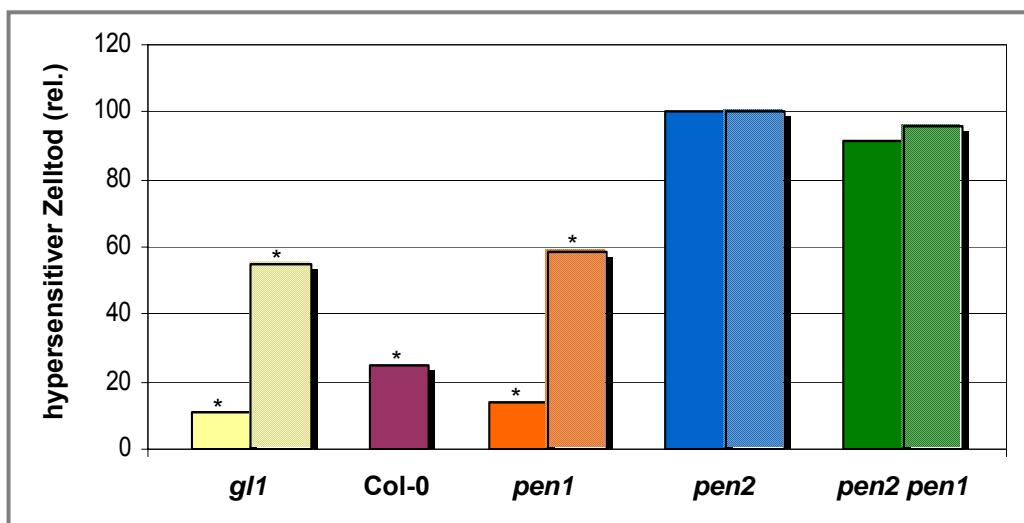


Abb. C-5: Quantifizierung des hypersensitiven Zelltods nach *P. infestans*-Inokulation. Dargestellt ist die quantitative Analyse der relativen Trypan-Blau-Intensität als Index des hypersensitiven Zelltods in unterschiedlichen Genotypen nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (Experiment 1 (Nicht schraffierte Balken): 1×10^5 / ml; Experiment 2 (schraffierte Balken): 2×10^4 / ml). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 10 - 15 inokulierten Blättern je Genotyp (mit Ausnahme von Col-0 mit einem Experiment). Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied der Daten im Vergleich zu *pen2* (Einweg-ANOVA, $P \leq 0,001$).

1.4 Zytologische Analyse des Nichtwirts-Pathosystems *Arabidopsis thaliana*– *Phytophthora infestans*

Die zytologische Untersuchung der Interaktion *A. thaliana*-*P. infestans* erfolgte durch lichtmikroskopische Analysen von infiziertem Blattmaterial nach Färbung mit Trypan-Blau, DAB (modifiziert nach Thordal-Christensen *et al.*, 1997) oder Anilin-Blau (Adam & Somerville, 1996). Der Farbstoff DAB bildet braune Präzipitate mit H_2O_2 und kann für den Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verwendet werden. Um die nach Verwundung, biotischem und abiotischem Stress induzierte Akkumulation des (1→3)- β -D-Glukans Kallose (Stone & Clarke, 1992) nachzuweisen, wurden infizierte Blätter mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Anilin-Blau gefärbt. Die Untersuchung von zellulären Feinstrukturen erfolgte durch elektronenmikroskopische Analyse des Pathosystems. Die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden von M. Birschwilks (IPB Halle) durchgeführt.

1.4.1 Trypan-Blau-Färbung: Analyse von Pathogenwachstum und hypersensitivem Zelltod in *pen2* und *gl1* nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Infiziertes Blattmaterial von *pen2* und *gl1* wurde 2 Tage nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (2×10^4 / ml) mit Trypan-Blau gefärbt. In Abb. C-6 sind repräsentative Penetrationsereignisse in *pen2* und *gl1* dargestellt.

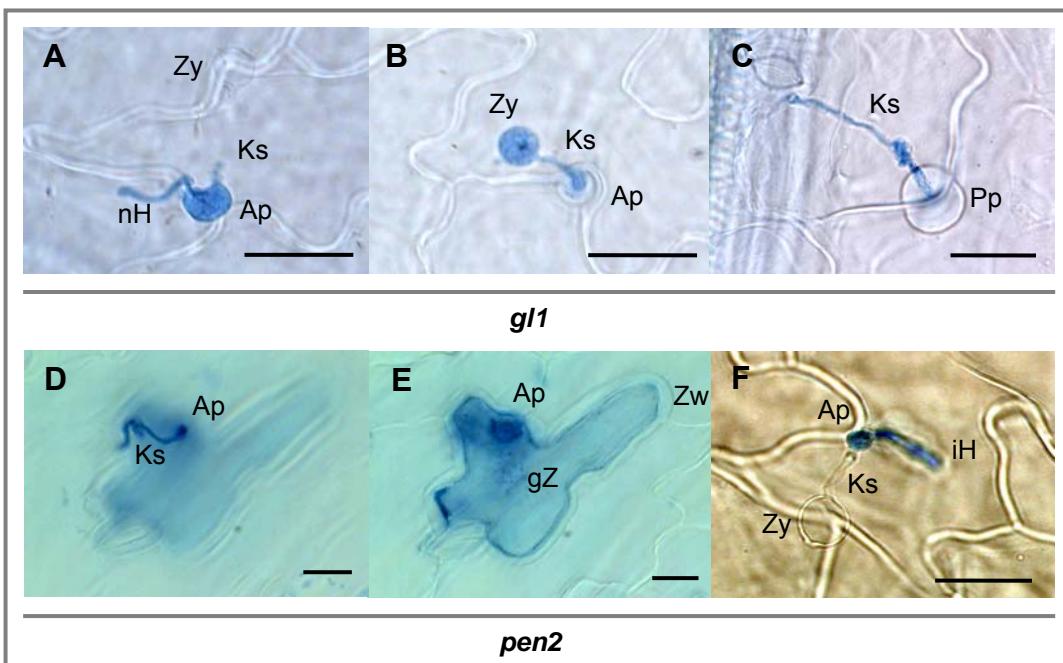


Abb. C-6: Zytologische Analyse von infiziertem Blattmaterial nach Trypan-Blau-Färbung. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 – 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden mit jeweils 10 μ l einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (2×10^4 / ml) inkuliert, 2 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend mit Trypan-Blau gefärbt.

A-C: Penetrationsversuche in Epidermiszellen von *gl1* (DIC-Mikroskopie)

D-E: Penetration einer Epidermiszelle in *pen2* in zwei Ebenen fokussiert (DIC-Mikroskopie)

F: Penetration einer Epidermiszelle in *pen2* (DIC-Mikroskopie)

Ap, Appressorium-ähnliche Struktur; gZ, granuläres Zytoplasma; iH, invasive Hyphe; Ks, Keimschlauch; Pp, Papille / Zellwandaufklagerung; nH, nichtinvasive Hyphe; Zw, Zellwand; Zy, Zyste (Maßstab: 25 μ m)

Die Keimung der Zoosporen erfolgt durch Zystierung und Ausbildung eines Keimschlauches auf der pflanzlichen Epidermis. Der Penetrationsversuch erfolgt durch Ausbildung einer Appressorium-ähnlichen Struktur, die sich meistens an den antiklinalen Zellwänden zweier Epidermiszellen befindet (Abb. C-6). In *gl1* ist in den häufigsten Fällen kein Penetrationserfolg zu beobachten und es kommt zur Abstoppung des Penetrationsversuches. In seltenen Fällen reagieren penetrierte Epidermiszellen in *gl1* mit hypersensitivem Zelltod (Daten nicht gezeigt). Die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in der Interaktion *A. thaliana* – *P. infestans* scheint demnach unabhängig von einer hypersensitiven Reaktion zu sein.

An einigen Infektionstellen in *gl1* (Abb. C-6 / B, C) und *pen2* (Daten nicht gezeigt) ist eine, durch konzentrische Zellwandaufklagerungen der beiden angrenzenden Epidermiszellen gebildete, Ringstruktur um die Penetrationsstelle sichtbar. In *gl1* ist nach der versuchten Penetration häufig die Ausbildung einer oberflächlichen, nichtinvasiven Hyphe zu beobachten (Abb. C-6 / A).

Die Penetration in *pen2* ist im Gegensatz zu *gl1* erfolgreich und es kommt zu einer Entwicklung von invasiven Hyphen in der penetrierten Epidermiszelle (Abb. C-6 / F). Diese intrazellulären Infektionsstrukturen zeigen jedoch keine weiteren Differenzierungen, wie z. B. die Ausbildung von funktionellen Haustorien. In der Regel reagieren die penetrierten Epidermiszellen in *pen2* mit hypersensitivem Zelltod (Abb. C-6 / D). Begleitet wird die hypersensitive Reaktion der penetrierten

Zelle von einer Verdickung der Zellwand und einer granulären Struktur des Zytosplasmas (Abb. C-6 / E). In selteneren Fällen ist auch ein hypersensitiver Zelltod von angrenzenden Mesophyllzellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt). 6 Tage nach *P. infestans*-Inokulation wurde in Blättern von *pen2* und *gl1* kein weiteres Pathogenwachstum oder Sporulation beobachtet.

1.4.2 Analyse der Autofluoreszenz in *pen2* und *gl1* nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Die Akkumulation autofluoreszierender phenolischer Verbindungen nach Pathogenbefall wurde als eine bedeutende Form der Pathogenabwehr sowohl in Nichtwirts- als auch in Wirts-Interaktionen beschrieben (Vleeshouwers *et al.*, 2000). Zur Untersuchung der Autofluoreszenz nach *P. infestans*-Inokulation, wurden infizierte Blätter von *gl1* und *pen2* unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sowie unter dem Fluoreszenz-Stereomikroskop untersucht (Abb. C-7).

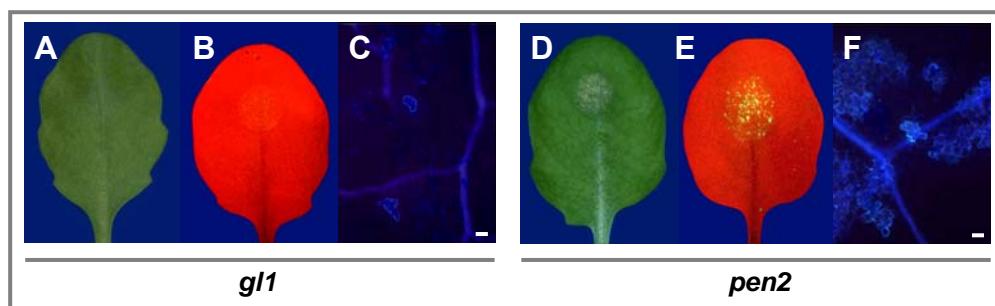


Abb. C-7: Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyp / Einzelzell-HR nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden jeweils mit 10 µl einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml) inkuliert, 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenz-Stereomikroskop (Mitte) analysiert. Die Untersuchung der infizierten Blätter am Fluoreszenz-Mikroskop erfolgte nach Chlorophyll-Extraktion und Chloral-Hydrat-Behandlung (rechts). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Blatt bzw. eine repräsentative Infektionstelle von *gl1* (A-C) und *pen2* (D-F).
A, D: Nekrose-Phänotyp in infizierten Blättern von *gl1* und *pen2*
B, E: Autofluoreszenz in infizierten Blättern von *gl1* und *pen2* (Fluoreszenz-Stereomikroskopie)
C, F: Autofluoreszenz in infizierten Epidermiszellen von *gl1* und *pen2* (Fluoreszenz-Mikroskopie)
(Maßstab: 50 µm)

Unter Anregung mit UV-Licht wurde eine im Vergleich zu *gl1* starke Autofluoreszenz in den inkulierten Bereichen von *pen2* beobachtet (Abb. C-7 / E-F). Die mikroskopische Analyse zeigt, dass einzelne epidermale Zellen in *gl1* nach *P. infestans*-Inokulation hypersensitiv reagieren und autofluoreszierende Verbindungen in der Zellwand und im Zytosplasma akkumulieren (Abb. C-7 / C). Der größte Teil der infizierten Zellen in *gl1* zeigt jedoch keine oder schwache Autofluoreszenz nach *P. infestans*-Inokulation. Des Weiteren wurde beobachtet, dass in einigen Zellen von *gl1* an den Orten der Zellwandaufklagerungen eine im Vergleich zu *pen2* geringe Menge autofluoreszierender Verbindungen akkumuliert (Abb. C-8 / A, C).

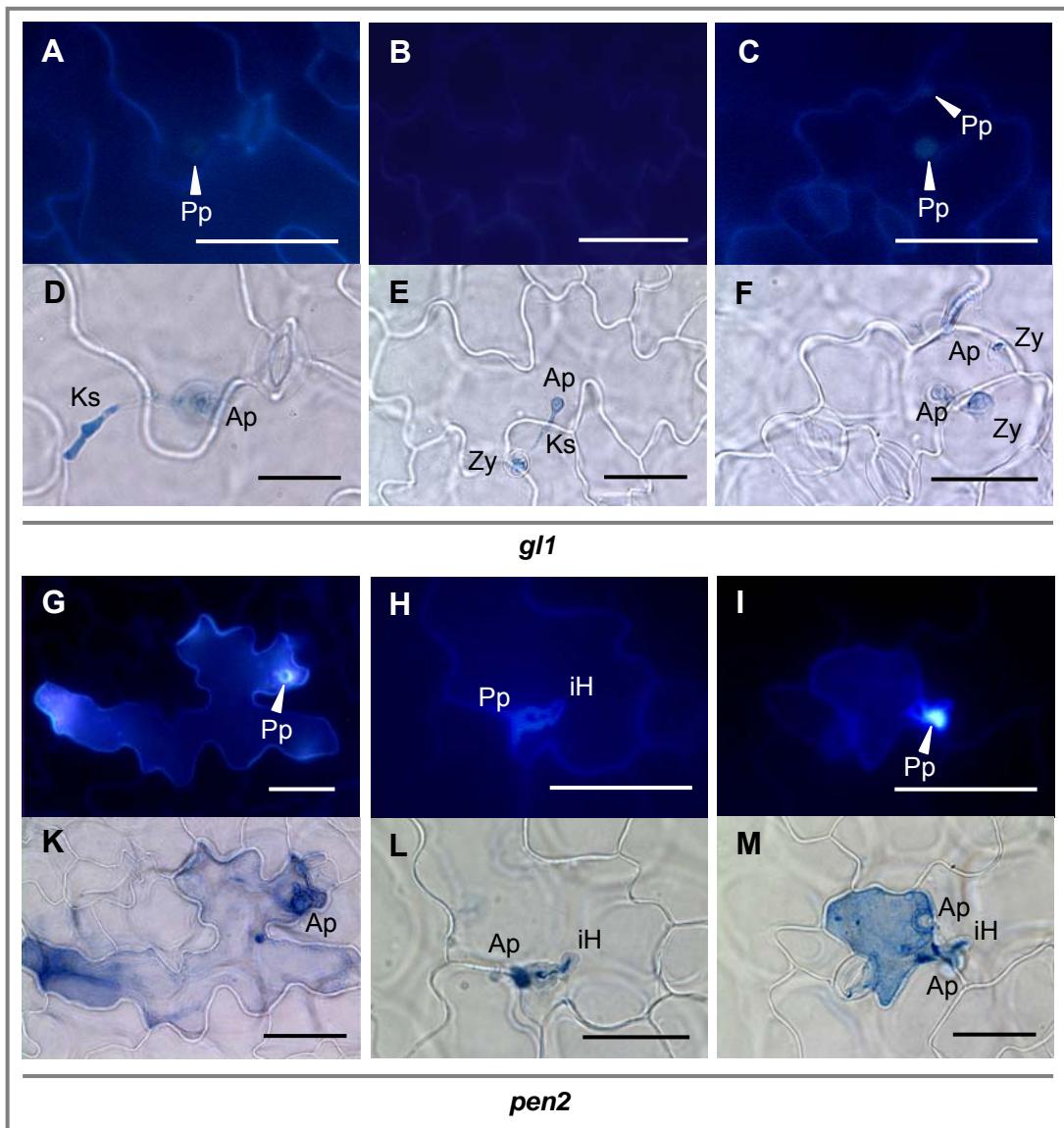


Abb. C-8: Zytologische Analyse von infiziertem Blattmaterial sowie Lokalisation der Autofluoreszenz und Analyse des hypersensitiven Zelltods nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosetten-Blätter von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden jeweils mit 10 µl einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (2×10^4 / ml) inkuliert, 2 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend mit Trypan-Blau gefärbt.

A-C: Autofluoreszenz in infizierten Epidermiszellen von *g1* (Fluoreszenz-Mikroskopie)

D-F: gleiche Infektionsstellen wie A-C (Trypan-Blau-Färbung, Hellfeld-Mikroskopie)

G-I: Autofluoreszenz in infizierten Epidermiszellen von *pen2* (Fluoreszenz-Mikroskopie)

K-M: gleiche Infektionsstellen wie G-I (Trypan-Blau-Färbung, Hellfeld-Mikroskopie)

Ap, Appressorium-ähnliche Struktur; iH, invasive Hyphe; Ks, Keimschlauch; Pp, Papille / Zellwandaufklagerung; Zy, Zyste (Maßstab: 50 µm; D, 25 µm)

In *pen2* reagieren deutlich mehr Epidermiszellen und teilweise Mesophyllzellen mit einer HR bzw. Autofluoreszenz (Abb. C-7 / F). Durch vergleichende Analyse von Trypan-Blau-Färbung und Autofluoreszenz wurde in penetrierten Zellen von *pen2* eine Kolokalisation von hypersensitivem Zelltod und Autofluoreszenz gezeigt (Abb. C-8 / G, K und I, M). Die Lokalisation der Autofluoreszenz lässt darauf schließen, dass in *pen2* neben dem Zytoplasma und der Zellwand auch an den unmittelbaren Penetrationsstellen sowie an den intrazellulären Infektionsstrukturen

autofluoreszierende Verbindungen akkumulieren (Abb. C-8 / H). Dabei erscheint die stärkste Autofluoreszenz in der Einkapselung der invasiven Hyphen und als konzentrische Zellwandauflagerung um die Penetrationsstelle (Abb. C-8 / G-I).

1.4.3 DAB-Färbung: Untersuchung der H_2O_2 -Akkumulation in *pen2* und *g1* nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Der *oxidative burst*, d. h. die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (H_2O_2 , O_2^-) nach Pathogenbefall stellt eine frühe, häufig beobachtete, pflanzliche Abwehrreaktion in der Pflanze-Pathogen-Interaktion dar (Mellersh *et al.*, 2002; Bolwell *et al.*, 2002). Für die Akkumulation von H_2O_2 während der pathogen-induzierten, hypersensitiven Reaktion wurde neben einer antimikrobiellen Funktion auch eine Funktion in der oxidativen Quervernetzung der Zellwand und in der Signaltransduktion beschrieben (Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Lamb & Dixon, 1997). Um eine mögliche Korrelation von H_2O_2 -Akkumulation und der nach *P. infestans*-Infektion induzierten hypersensitiven Reaktion in *pen2* und *g1* zu untersuchen, wurde infiziertes Blattmaterial mit DAB gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch untersucht. In Abb. C-9 ist die lichtmikroskopische Übersicht eines inokulierten Bereichs von *g1* (A) und *pen2* (B) sowie eine Auswahl repräsentativer Penetrationereignisse in beiden Genotypen nach DAB-Färbung dargestellt (C-H). Inokulierte Blätter von *g1* zeigen nach DAB-Färbung nur an wenigen Interaktionsorten eine Braun-Färbung bzw. H_2O_2 -Akkumulation (Abb. C-9 / A). Die mikroskopische Analyse zeigt, dass H_2O_2 in den von *P. infestans* induzierten Papillen-Strukturen akkumuliert (Abb. C-9 / C, D). Im Gegensatz dazu wurde im Blattgewebe von *pen2* nach *P. infestans*-Inokulation eine deutlich stärkere Akkumulation von H_2O_2 beobachtet (Abb. C-9 / B). Das gebildete H_2O_2 ist dabei hauptsächlich in der Zellwand oder im Zytosol der penetrierten Epidermiszelle lokalisiert (Abb. C-9 / B). In selteneren Fällen ist auch in angrenzenden Mesophyllzellen eine H_2O_2 -Akkumulation zu beobachten (Abb. C-9 / E). Die lichtmikroskopische Analyse in *pen2* zeigt neben der H_2O_2 -Akkumulation in den Papillen-Strukturen, eine Akkumulation in den Einkapselungen der invasiven Hyphen (Abb. C-9 / G). Die vergleichende Analyse von Autofluoreszenz und H_2O_2 -Akkumulation nach *P. infestans*-Infektion deutet darauf hin, dass in *g1* und *pen2* sowohl autofluoreszierende Verbindungen als auch H_2O_2 an den Pflanze-Pathogen-Interaktionsorten akkumulieren. Jedoch scheint, im Gegensatz zu der H_2O_2 -Akkumulation in *g1*, die Reaktion in *pen2* deutlich verstärkt sowie zellübergreifend zu sein (Abb. C-9 / A-B).

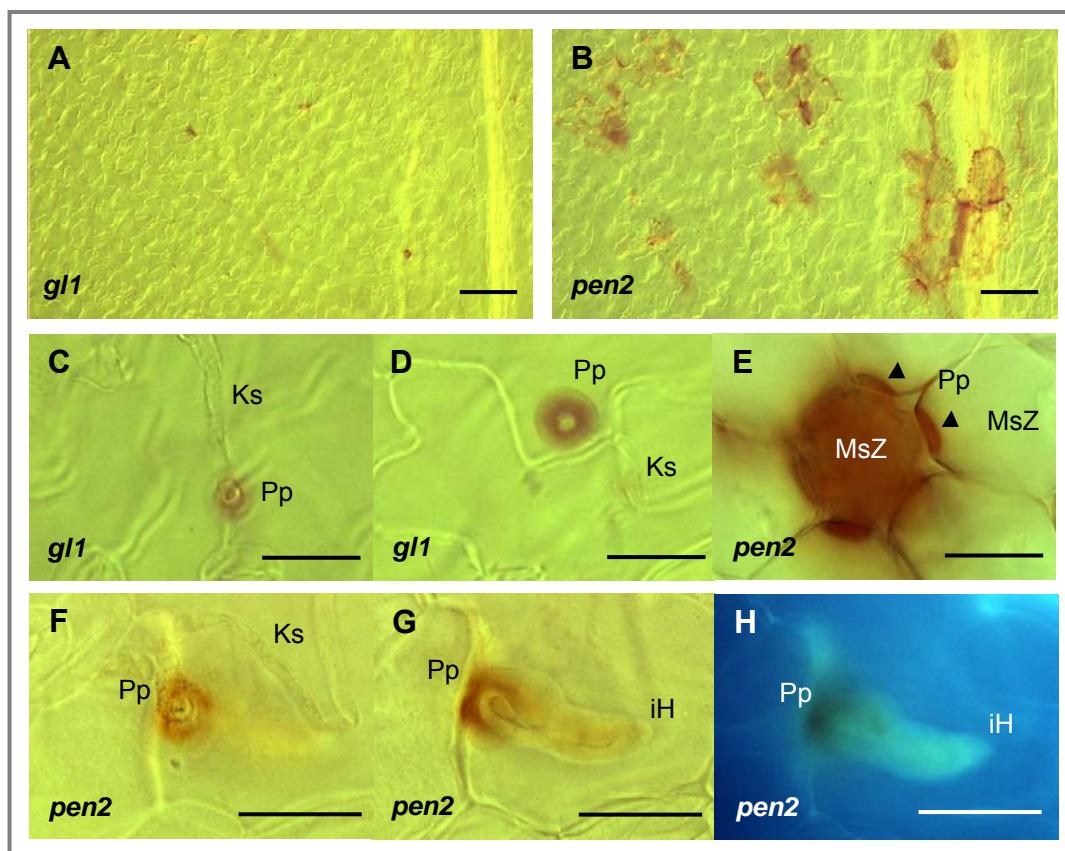


Abb. C-9: Zytologische Analyse von infiziertem Blattmaterial nach DAB-Färbung und Lokalisation der H_2O_2 -Akkumulation nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden jeweils mit 10 μ l einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (2×10^4 / ml) inokuliert, 2 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend mit DAB gefärbt.

- A: Übersichtsaufnahme von infiziertem Blattgewebe in *gl1* (DIC-Mikroskopie)
- B: Übersichtsaufnahme von infiziertem Blattgewebe in *pen2* (DIC-Mikroskopie)
- C-D: infizierte Epidermiszellen in *gl1* (DIC-Mikroskopie)
- E: infizierte Mesophyllzelle in *pen2* (DIC-Mikroskopie)
- F-G: Penetration einer Epidermiszelle in *pen2* in 2 Ebenen fokussiert (DIC-Mikroskopie)
- H: gleiches Penetrationsereignis wie in F und G (Fluoreszenz-Mikroskopie)

iH, invasive Hyphe; Ks, Keimschlauch; MsZ, Mesophyllzelle; Pp, Papille / Zellwandaufflagerung (Maßstab: A-B, 100 μ m; C-H, 20 μ m)

1.4.4 Anilin-Blau-Färbung: Untersuchung der Kallose-Akkumulation in *pen2* und *gl1* nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Modifikationen der pflanzlichen Zellwand nach Pathogenbefall, insbesondere Zellwandauflagerungen an den Infektionstellen, sind an der Ausbildung physischer Barrieren beteiligt, um das Eindringen potentieller Pathogene zu verhindern (Aist & Bushnell, 1991). Die Zellwandauflagerungen oder Papillen erscheinen dabei in Form von Platten oder Stöpseln in unmittelbarer Nähe zum eindringenden Pathogen (Donofrio & Delaney, 2001). Bei der Zusammensetzung der Papillen-Strukturen hat neben anderen Verbindungen das (1→3)- β -D-Glukan Kallose eine wichtige Bedeutung (Smart *et al.*, 1986).

Um eine mögliche Beteiligung von Kallose an den nach *P. infestans*-Inokulation in *gl1* und *pen2* induzierten Zellwandauflagerungen zu untersuchen, wurde infiziertes Blattmaterial mit Anilin-Blau gefärbt und mikroskopisch analysiert. Die Darstellungen in Abb. C-10 / G, H verdeutlichen, dass die Akkumulation der Kallose nach *P. infestans*-Inokulation in *gl1* in der Zellwandauflagerung unter einer Infektionsstelle lokalisiert ist. In wenigen Fällen wurde auch Kallose an der übrigen Zellwand infizierter Zellen gefunden (Daten nicht gezeigt). Es ist auch zu erkennen, dass die durch *P. infestans* induzierte Kallose-Akkumulation spezifisch als Auflagerung der Zellwand am Penetrationsort erscheint (Abb. C-10 / G-H).

Die zytologische Analyse in *pen2* zeigt, dass es im Vergleich zu *gl1* zu einer deutlich stärkeren Kallose-Akkumulation nach *P. infestans*-Inokulation kommt (Abb. C-10 / I). Die Übersichtsaufnahme in Abb. C-10 / B macht deutlich, dass die Zahl reagierender Zellen in *pen2* höher ist. Die mikroskopische Analyse der Anilin-Blau-Fluoreszenz in *pen2* zeigt eine starke Kallose-Akkumulation in Form von Zellwandauflagerungen in penetrierten Epidermiszellen sowie in den Einkapselungen der intrazellulären Infektionsstrukturen (Abb. C-10 / I, K). An einigen Infektionsstellen in *pen2* wurde auch in den unterhalb der penetrierten Epidermiszelle angrenzenden Mesophyllzellen Fluoreszenz bzw. die damit verbundene Kallose-Akkumulation beobachtet (Abb. C-10 / I).

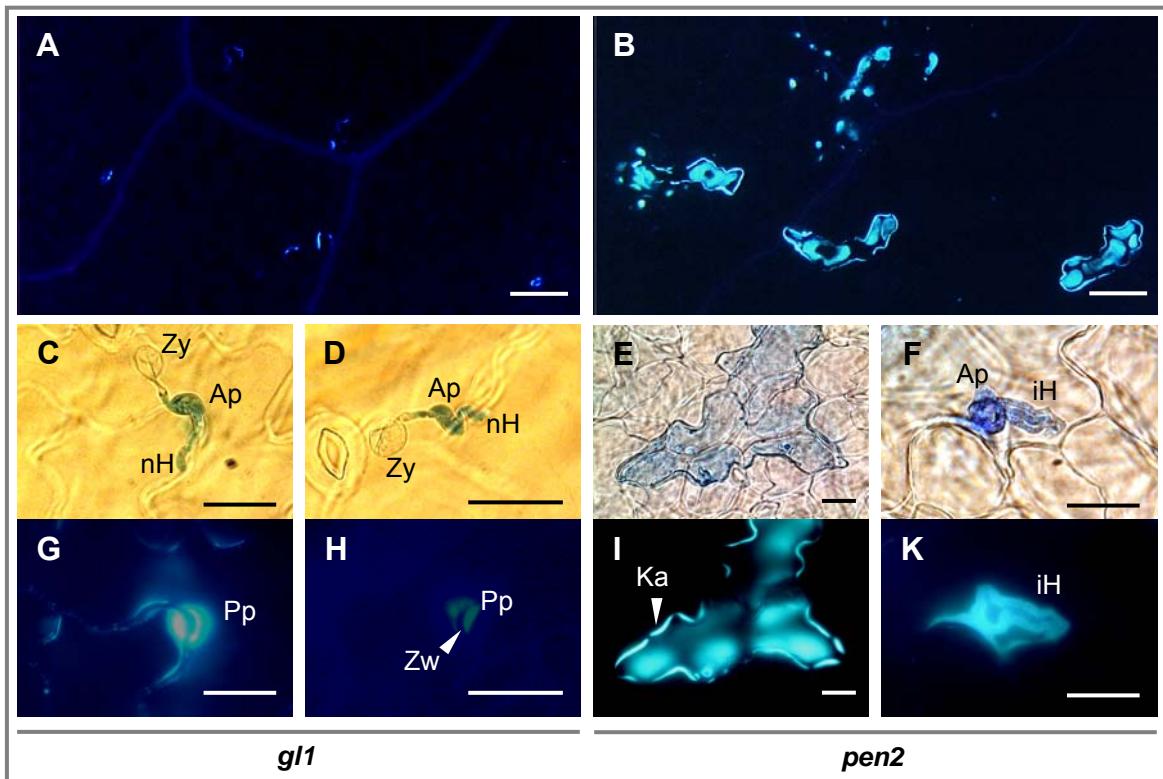


Abb. C-10: Zytologische Analyse von infiziertem Blattmaterial nach Anilin-Blau-Färbung und Lokalisation der Kallose-Akkumulation und Analyse des hypersensitiven Zelltods nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden jeweils mit 10 µl einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (2×10^4 / ml) inkuliert, 2 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend mit Anilin-Blau und Trypan-Blau gefärbt.

- A: Übersichtsaufnahme von infiziertem Blattgewebe in *g1* (Fluoreszenz-Mikroskopie)
- B: Übersichtsaufnahme von infiziertem Blattgewebe in *pen2* (Fluoreszenz-Mikroskopie)
- C-D: Penetrationsversuch in Epidermiszellen von *g1* (DIC-Mikroskopie)
- E-F: Penetration von Epidermiszellen in *pen2* (DIC-Mikroskopie)
- G-H: gleiche Infektionsstellen wie in C-D (Fluoreszenz-Mikroskopie)
- I-K: gleiche Infektionsstellen wie in E-F (Fluoreszenz-Mikroskopie)

Ap, Appressorium-ähnliche Struktur; iH, invasive Hyphe; Ka, Kalloseauflagerung, nH, nichtinvasive Hyphe; Pp, Papille / Zellwandaufflagerung; Zw, Zellwand; Zy, Zyste (Maßstab: A-B, 100 µm; C-K, 25 µm)

1.4.5 Elektronenmikroskopische Analyse: Untersuchung von zellulären Feinstrukturen in *pen2* und *g1* nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Nach der auf unterschiedlicher Anfärbung von infiziertem Blattgewebe basierenden lichtmikroskopischen Untersuchung der Interaktion, sollte die elektronenmikroskopische Analyse Aufschluss über die zellulären Feinstrukturen in der Interaktion *A. thaliana* – *P. infestans* geben. Um eine optimale Auswertung der elektronenmikroskopischen Analysen zu ermöglichen, wurden Blätter von *pen2* und *g1* mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension hoher Dichte (5×10^5 / ml) inkuliert und nach einer Inkubation von 3 Tagen geerntet. Die Fixierung, Einbettung und Anfertigung der Ultradünnenschnitte der Präparate sowie die elektronenmikroskopische Analyse wurde von M. Birschwilks (IPB Halle) durchgeführt.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von *P. infestans*-infizierten Blättern von *gl1* zeigt, dass es nach Ausbildung einer Appressorium-ähnlichen Struktur und versuchter Penetration der Epidermiszelle zum Abstoppen des eindringenden Pathogens kommt (Abb C-11 / A-C). Die infizierten Epidermiszellen in *gl1* reagieren mit einer, zum großen Teil aus Kallose bestehenden Zellwandaufklagerung unterhalb des Orts der versuchten Penetration. Es ist anzunehmen, dass diese Zellwandaufklagerungen oder Papillen als apoplastische Strukturen zwischen Zellwand und Plasmamembran lokalisiert sind. An einigen untersuchten Infektionsstellen in *gl1* wurde eine Akkumulation von Mitochondrien und Vesikel-ähnlichen Strukturen direkt unter dem Penetrationsort beobachtet (Abb C-11 / A).

Im Gegensatz zu *gl1* ist die Penetration von Epidermiszellen in *pen2*, trotz einer unter dem Penetrationsort erfolgten Zellwandaufklagerung, in den meisten Fällen erfolgreich (Abb. C-11). Nach einer lokalen Lysis der pflanzlichen Zellwand ist in *pen2* die Ausbildung von invasiven Hyphen, welche in die Epidermiszelle penetrieren, zu beobachten (Abb. C-11 / D-F). Ob ein direkter Kontakt der intrazellulären Infektionsstrukturen zum pflanzlichen Zytosol besteht, ohne eine Abgrenzung durch die Plasmamembran, wurde durch die elektronenmikroskopische Analyse nicht zweifelsfrei geklärt.

In einigen Experimenten sind durch die elektronenmikroskopische Untersuchung des infizierten Blattgewebes von *pen2* auch Hyphenstrukturen im Mesophyll beobachtet worden (M. Birschwilks, IPB-Halle; persönliche Mitteilung). Da ein Vordringen von *P. infestans*-Hyphen über Epidermiszellen hinaus bis zu den Mesophyllzellen unter Verwendung niedriger *P. infestans*-Sporenkonzentrationen lichtmikroskopisch nicht zweifelsfrei belegt wurde, bleibt zu prüfen, ob möglicherweise nur bei Inokulationen mit hohen *P. infestans*-Sporenkonzentrationen und der dadurch bedingten massiven Nekrotisierung des Gewebes ein weiteres Vordringen der Hyphen möglich ist.

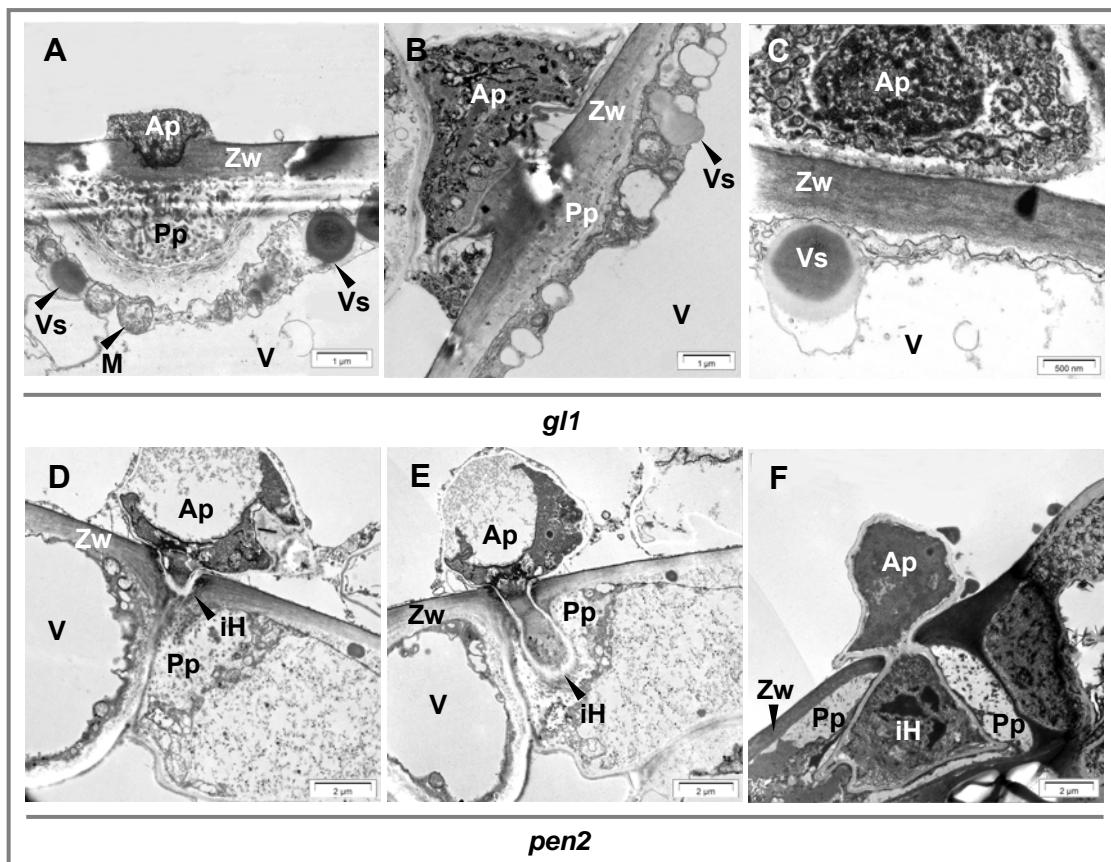


Abb. C-11: Elektronenmikroskopische Analyse von infiziertem Blattmaterial. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden mit jeweils 10 µl einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^5 / ml) inkuliert und 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Fixierung, Einbettung und Anfertigung von Semi-bzw. Ultradünnsschnitten des infizierten Blattmaterials erfolgte die elektronenmikroskopische Analyse der Präparate.

- A-C:** Penetrationsversuche in Epidermiszellen von *gl1* (Transmissions-Elektronen-Mikroskopie)
- D-E:** Penetration einer Epidermiszelle in *pen2* in zwei Ebenen fokussiert (Transmissions-Elektronen-Mikroskopie)
- F:** Penetration einer Epidermiszelle in *pen2* (Transmissions-Elektronen-Mikroskopie)

Ap, Appressorium-ähnliche Struktur; iH, invasive Hyphe; M, Mitochondrium; Pp, Papille / Zellwandauflagerung; V, Vakuole; Vs, Vesikel-ähnliche Struktur; Zw, Zellwand

1.4.6 Zytologische Analyse von Col-0, *pen1* und *pen2 pen1* nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Die zytologische Analyse der Interaktion mit *P. infestans* in der Mutante *pen1* und der Doppelmutante *pen2 pen1* zeigte keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der entwickelten Pathogenstrukturen bzw. der pflanzlichen Abwehrreaktionen zwischen *gl1*, Col-0 und *pen1* sowie zwischen *pen2* und *pen2 pen1* (Daten nicht gezeigt).

Diese Beobachtung steht in Korrelation zu den unter 1.1 und 1.3 (C Ergebnisse) beschriebenen makroskopisch sichtbaren Phänotypen nach *P. infestans*-Infektion in den untersuchten *A. thaliana*-Genotypen. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass *PEN1* keinen Einfluss sowohl

auf die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz im Wildtyp Col-0 als auch auf den in *pen2* beobachteten veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp hat.

1.5 Untersuchung der Penetrations-Häufigkeit nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Die Beurteilung des Resistenzstatus im Pathosystem *A. thaliana*–*P. infestans* erfolgte durch Bonitur der Penetrations-Häufigkeit nach Pathogeninfektion. Dazu wurde die Zahl infizierter und mit hypersensitivem Zelltod reagierender, epidermaler Zellen pro Blatt ermittelt. Nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (2×10^4 / ml) wurden Blätter der unterschiedlicher *A. thaliana*-Genotypen mit Trypan-Blau gefärbt und die entsprechenden Interaktionsstellen lichtmikroskopisch ausgezählt. In Abb. C-12 ist die Bestimmung der Penetrations-Häufigkeit aus 2 unabhängigen Experimenten graphisch dargestellt. Die relative Penetrations-Häufigkeit in den Genotypen *g1* und Col-0 erreicht dabei 2 bis 10 % der in *pen2* und *pen2 pen1* ermittelten Penetrations-Häufigkeit. In *pen1* wurde keine signifikant erhöhte Penetrations-Häufigkeit im Vergleich zum Wildtyp Col-0 beobachtet (Abb. C-12). Die in *pen2* und *pen2 pen1* ermittelten Penetrations-Häufigkeiten waren vergleichbar (Abb. C-12).

Die Untersuchung der Penetrations-Häufigkeit deutet darauf hin, dass *PEN1* keinen signifikanten Effekt auf die Penetration sowohl im Col-0- als auch im *pen2*-Hintergrund zu haben scheint.

Die Auswertung der Daten dieser und folgender Experimente zur Bestimmung der Penetrations-Häufigkeit deutet dabei auf eine, teilweise hohe, Variabilität der ermittelten Anzahl penetrierter Epidermiszellen eines Genotyps in unterschiedlichen Experimenten. Neben der experimentellen Abweichung ist hier vor allem die schwankende Keimungsrate des *P. infestans*-Isolates als mögliche Ursache anzunehmen. Es kann ebenso nicht ausgeschlossen werden, dass die schwankende Motilität der *P. infestans*-Zoosporen einen Effekt auf die Penetrations-Häufigkeit hat (Daten nicht gezeigt).

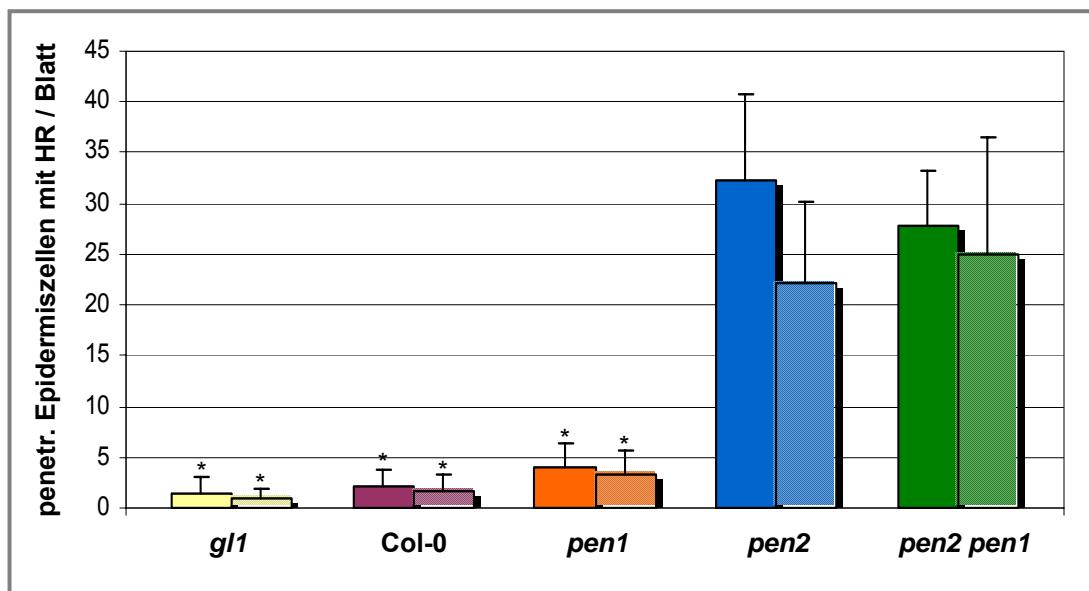


Abb. C-12: Penetrations-Häufigkeit nach *P. infestans*-Inokulation. Dargestellt ist die Penetrations-Häufigkeit (penetr. Epidermiszellen mit HR / Blatt) in unterschiedlichen *A. thaliana*-Genotypen 3 Tage nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (2×10^4 / ml). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 12 - 16 inoculierten Blättern je Genotyp (Nicht schraffierte bzw. schraffierte Balken entsprechen jeweils den Daten eines Experiments). Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied der Daten im Vergleich zu *pen2* (Einweg-ANOVA, $P \leq 0,001$).

1.6 Untersuchung der *PR*-Genexpression nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Die Aktivierung der Expression von *PR*-Genen, als eine Form der aktiven Abwehr nach Pathogeninfektion, ist eine weit verbreitete pflanzliche Abwehrreaktion nach Pathogenbefall (Cutt & Klessig, 1992; Kombrink & Somssich, 1995).

Um eine Korrelation des HR-Phänotyps in *pen2* und *pen2 pen1* mit einer möglichen veränderten *PR*-Genexpression während der *P. infestans*-Infektion zu untersuchen, wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Als ein Marker für die Salizylsäure (SA)-abhängigen Abwehrreaktionen wurde die Expression des *PR*-Gens *PR1* (*PATHOGENESIS RELATED1*) bzw. für die ET- und JA-abhängige Abwehrreaktionen wurde die Expression des *PR*-Gens *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN1.2*) untersucht (Ward *et al.*, 1991; Penninckx *et al.*, 1998). Nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^5 / ml) wurde nach verschiedenen Zeitpunkten Blattmaterial geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und anschließend die Transkriptakkumulation von *PR1* und *PDF1.2* analysiert.

1.6.1 *PR*-Genexpression in *gl1* und *pen2* nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Abb. C-13 zeigt, dass in *gl1* im gesamten untersuchten Zeitraum nahezu keine *PR1*-Transkripte detektierbar waren.

Die Induzierung der *PR1*-Genexpression in *pen2* beginnt zwischen 0 h und 12 h nach *P. infestans*-Inokulation und ist über den Untersuchungszeitraum anhaltend (Abb. C-13). Die jeweils stärkste Akkumulation von *PR1*-Transkripten in *gl1* und *pen2* wurde 48 h oder 72 h nach *P. infestans*-Inokulation beobachtet. Aus Abb. C-13 geht weiterhin hervor, dass die *PDF1.2*-Genexpression in *gl1* und *pen2* innerhalb von 12 h nach *P. infestans*-Inokulation induziert wird. Im Vergleich zur transienten *PDF1.2*-Genexpression in *gl1* ist die *PDF1.2*-Transkriptakkumulation in *pen2* jedoch stärker und über den untersuchten Zeitraum anhaltend. Die Analyse weiterer Northern-Blots zeigt, dass in *gl1* und *pen2* bereits innerhalb von 6 h nach *P. infestans*-Inokulation *PDF1.2*-Transkripte nachweisbar sind, welche aber in *pen2* stärker akkumulieren (Daten nicht gezeigt).

In weiteren unabhängigen Experimenten wurden die in Abb. C-13 gezeigten Genexpressionsmuster in *pen2* und *gl1* nach *P. infestans*-Inokulation weitgehend reproduziert. Eine zeitliche Verschiebung der Induzierung der *PR*-Genexpression innerhalb von 24 h nach *P. infestans*-Inokulation, in Abhängigkeit vom jeweiligen Experiment, wurde in weiteren Kinetiken beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der *PR*-Genexpression in *gl1* und *pen2* deutet darauf hin, dass die Mutation in *PEN2* eine im Vergleich zu *gl1* verstärkte Expression der Abwehrgene *PR1* und *PDF1.2* nach *P. infestans*-Inokulation zur Folge hat.

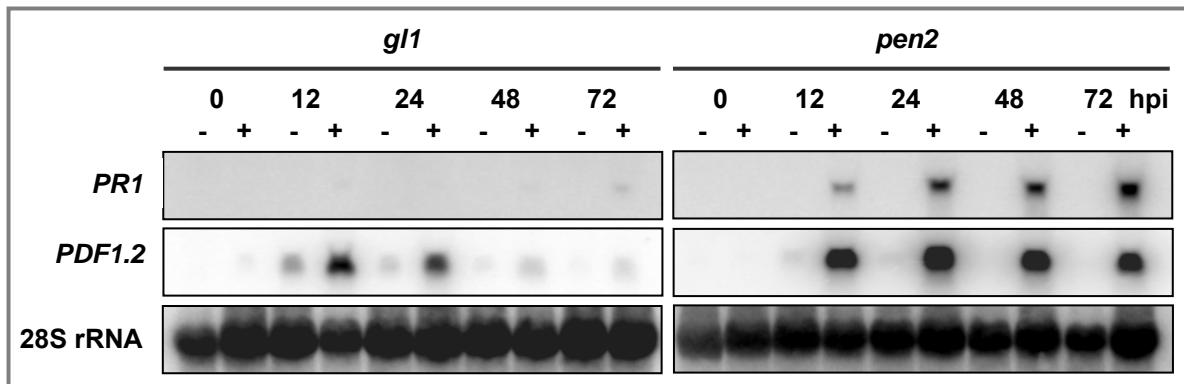


Abb. C-13: Northern-Blot-Analyse der *PR*-Genexpression in *gl1* und *pen2* nach *P. infestans*-Inokulation. Gesamt-RNA wurde aus voll entwickelten Rosettenblättern von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Inokulation (hpi) von H₂O [-] oder einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^5 / ml) [+] isoliert. Je 20 µg RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und anschließend mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde von *PR1* und *PDF1.2* hybridisiert. Zur Kontrolle der Beladung erfolgte eine Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde der 28S rRNA. Die dargestellten Autoradiogramme repräsentieren eine von zwei Kinetiken mit vergleichbarem Ergebnis.

1.6.2 PR-Genexpression unterschiedlicher *Arabidopsis thaliana*-Genotypen nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Die Analyse der PR-Genexpression in *gl1*, Col-0, *pen2*, *pen1* und *pen2 pen1* zeigt, dass die verstärkte HR nach *P. infestans*-Inokulation in *pen2* und *pen2 pen1* mit einer erhöhten Transkriptakkumulation der PR-Gene *PR1* und *PDF1.2* in diesen Mutanten korreliert (Abb. C-14). Der beobachtete zeitliche Verlauf sowie die Stärke der PR-Genexpression variieren dabei in *pen2* und *pen2 pen1* in Abhängigkeit vom Experiment, waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Das Expressionsmuster von *PR1* in *gl1*, Col-0 und *pen1* nach *P. infestans*-Inokulation schwankte in Abhängigkeit vom Experiment, jedoch war die *PR1*-Genexpression im Vergleich zu *pen2* und *pen2 pen1* stets schwächer induziert (Abb. C-14). Die jeweils stärkste *PR1*-Transkriptakkumulation in allen untersuchten Genotypen wurde 48 h oder 72 h nach *P. infestans*-Inokulation beobachtet. Die *PR1*-Expression in infizierten Blättern des Ökotyps Col-0 war in dem in Abb. C-14 gezeigten Experiment nicht nachzuweisen. In einem weiteren Experiment wurde jedoch eine schwache *PR1*-Transkriptakkumulation 72 h nach *P. infestans*-Infektion beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die in Abb. C-14 gezeigte, ungewöhnlich starke Akkumulation von *PR1*-Transkripten in *pen1*, 72 h nach *P. infestans*-Inokulation, wurde in einem weiteren Experiment nicht reproduziert (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung der *PDF1.2*-Transkriptakkumulation nach *P. infestans*-Inokulation zeigte ein jeweils vergleichbares Expressionsmuster in *gl1*, Col-0 und *pen1* bzw. in *pen2* und *pen2 pen1*, welches jedoch in Abhängigkeit vom jeweiligen Experiment variieren konnte (Abb. C-14). Aus Abb. C-14 geht weiterhin hervor, dass innerhalb von 12 h nach *P. infestans*-Inokulation *PDF1.2*-Transkripte in allen Genotypen akkumulieren, jedoch ist im Vergleich zur transienten *PDF1.2*-Transkriptakkumulation in *gl1*, Col-0 und *pen1* die *PDF1.2*-Genexpression in *pen2* und *pen2 pen1* stärker induziert und über den Untersuchungszeitraum anhaltend.

Die Analyse der PR-Genexpression in den untersuchten *A. thaliana*-Genotypen deutet darauf hin, dass *PEN1* keinen Einfluss auf die im Vergleich zu *gl1* verstärkte Induzierung der *PR1*- und *PDF1.2*-Expression in *pen2* nach *P. infestans*-Inokulation hat. Des Weiteren ist gezeigt worden, dass die Mutation in *PEN1* zu keiner veränderten PR-Genexpression im *A. thaliana*-Ökotyp Col-0 nach *P. infestans*-Inokulation führt.

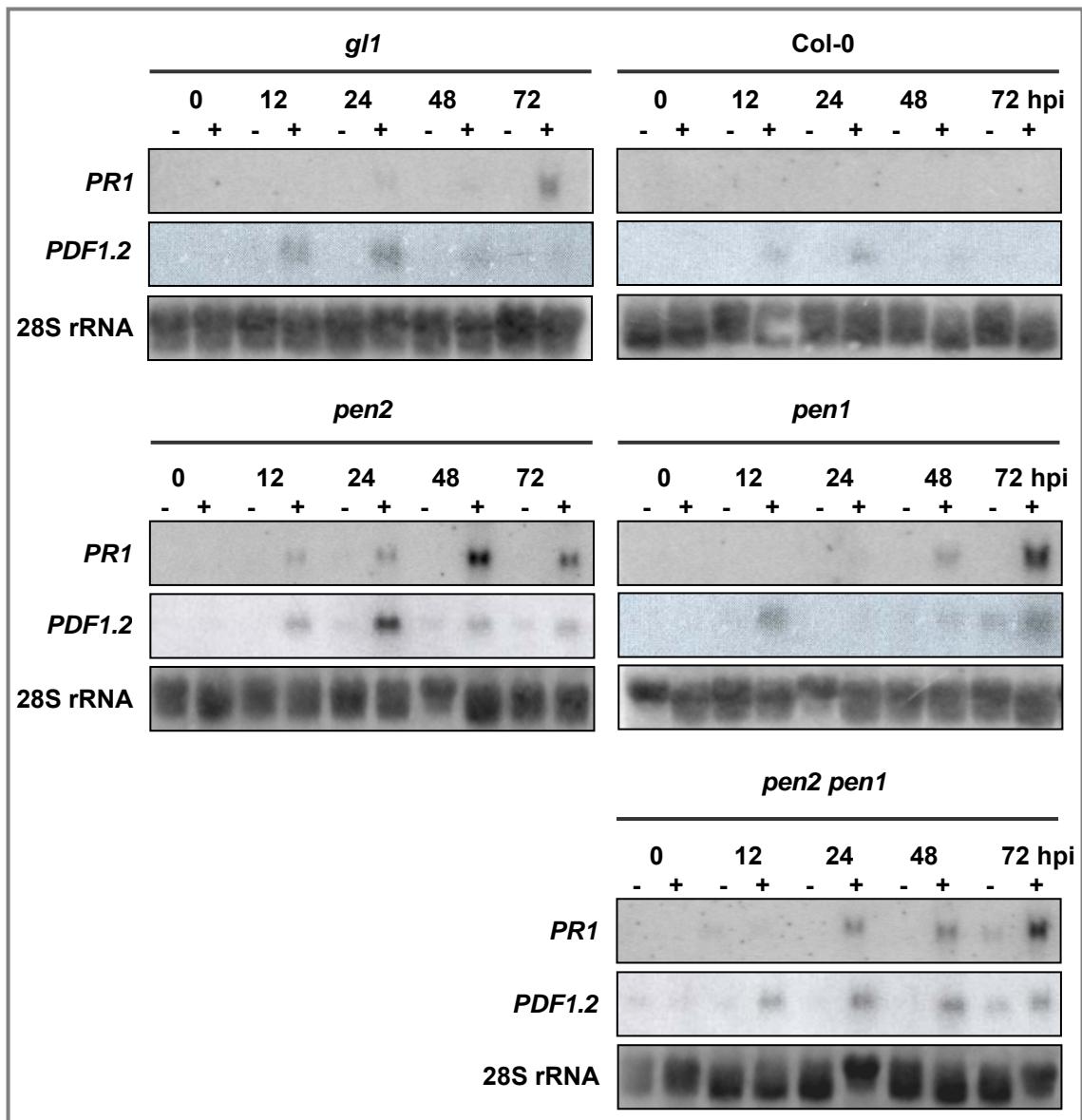


Abb. C-14: Northern-Blot-Analyse der PR-Genexpression in unterschiedlichen *A. thaliana*-Genotypen nach *P. infestans*-Inokulation. Gesamt-RNA wurde aus voll entwickelten Rosettenblättern von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Inokulation (hpi) von H₂O [-] oder einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^5 / ml) [+] isoliert. Je 20 µg RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und anschließend mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde von *PR1* und *PDF1.2* hybridisiert. Zur Kontrolle der Beladung erfolgte eine Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde der 28S rRNA. Die dargestellten Autoradiogramme repräsentieren eine von zwei Kinetiken mit vergleichbarem Ergebnis.

2 Untersuchung der Nichtwirtsresistenz in unterschiedlichen *Arabidopsis thaliana*-Mutanten und transgenen *Arabidopsis thaliana*-Linien

Ein weiterer Ansatz um Gene zu identifizieren, welche an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz im Pathosystem *A. thaliana*–*P. infestans* beteiligt sind, stellte die Analyse unterschiedlicher *A. thaliana*-Mutanten sowie transgener *A. thaliana*-Linien nach *P. infestans*-Inokulation dar. Die untersuchten *A. thaliana*-Linien repräsentieren hauptsächlich Faktoren, welche der Salizylsäure (SA)-abhängigen-Signaltransduktion während der *R*-Gen-vermittelten Resistenz zugeordnet sind. Die Bonitur des HR-Phänotyps erfolgte durch Beurteilung der Nekrosierung nach *P. infestans*-Inokulation. Aufgrund der relativ hohen biologischen Variabilität während der Ausprägung des HR-Phänotyps, erfolgte die Bonitur nach Auswertung mehrerer unabhängiger Experimente in Kooperation mit L. Westphal (IPB Halle). In Tab. C-1 sind die HR-Phänotypen der untersuchten *A. thaliana*-Linien nach *P. infestans*-Inokulation dargestellt.

2.1 HR-Phänotyp unterschiedlicher *Arabidopsis thaliana*-Signaltransduktionsmutanten im *pen2*-Hintergrund nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Zur Analyse der SA-abhängigen Abwehrreaktion im Pathosystem *A. thaliana* – *P. infestans* wurden unterschiedliche SA-Signaltransduktionsmutanten im *pen2*-Hintergrund auf ihren HR-Phänotyp nach *P. infestans*-Inokulation untersucht. Das Saatgut der Mutanten im *pen2*-Hintergrund wurde freundlicherweise von J. Dittgen (MPIZ Köln) zur Verfügung gestellt. Das Saatgut der Einzelmutanten *edr1-1* und *pad4-1* wurde freundlicherweise von V. Lipka (MPIZ Köln) zur Verfügung gestellt.

Die Bonitur der HR-Phänotypen der Mutanten *rar1-10*, *sgt1b-1*, *eds1-2*, *ndr1-1* und *npr1-1* im *pen2*-Hintergrund zeigt, dass keine dieser Doppelmutanten zu einem im Vergleich zu *pen2* veränderten HR-Phänotyp führt (Daten nicht gezeigt; Tab. C-1). Nach *P. infestans*-Inokulation der Einzelmutanten *rar1-10*, *sgt1b-1*, *eds1-2*, *ndr1-1* wurde keine oder eine nur schwache HR beobachtet (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung). Die in einigen Experimenten in infizierten Blättern der untersuchten Einzelmutanten *rar1-10*, *sgt1b-1* und *eds1-2* beobachtete schwache HR unterschied sich jedoch deutlich von der stärkeren HR in *pen2* (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung). Eine mögliche Ursache hierfür könnte der genetische Landsberg *erecta*-Hintergrund in diesen *A. thaliana*-Linien sein. In vorhergehenden Experimenten wurde gezeigt, dass die *P. infestans*-Inokulation von Blättern des *A. thaliana* Ökotyps Landsberg *erecta* zu einer im Vergleich zu *pen2* schwachen HR führt (Daten nicht gezeigt).

Eine Verstärkung des *pen2*-abhängigen HR-Phänotyps wurde in *P. infestans*-infizierten Blättern der Doppelmutante *pen2 edr1-1* beobachtet (Abb. C-15). Die Penetrations-Häufigkeit in *pen2 edr1-1* nach *P. infestans*-Inokulation konnte jedoch aufgrund des starken hypersensitiven Zelltods der Mesophyllzellen nicht ermittelt werden. Die Analyse Trypan-Blau-gefärbter infizierter Blätter der

Doppelmutante *pen2 edr1-1* zeigt eine im Vergleich zu *pen2* signifikant erhöhte Zelltod-Häufigkeit nach *P. infestans*-Infektion (Abb. C-16).

Die Inokulation der Einzelmutante *edr1-1* führte jedoch zu keiner makroskopisch sichtbaren HR (Abb. C-15; C-16). Des Weiteren zeigt die Untersuchung der Penetrations-Häufigkeit in *edr1-1* einen mit *gl1* vergleichbaren Phänotyp (Abb. C-17), so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine Mutation in *EDR1* nur im Hintergrund einer verstärkten Penetration (*pen2*) von *P. infestans* zu einem im Vergleich zu *pen2* verstärkten HR-Phänotyp führt (Abb. C-15; C-16).

Im Gegensatz dazu scheint die Mutation *pad4-1* im *pen2*-Hintergrund zu einer Suppression des *pen2*-abhängigen Nekrose- und Zelltod-Phänotyps nach *P. infestans*-Inokulation zu führen (Abb. C-15; C-16). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass der durch Inokulation höherer *P. infestans*-Sporenkonzentrationen induzierte hypersensitive Zelltod im Mesophyll infizierter Blätter von *pen2* in der Doppelmutante *pen2 pad4-1* supprimiert ist. Interessanterweise wurde in der Analyse der Penetrations-Häufigkeit nach *P. infestans*-Inokulation eine mit *pen2* vergleichbare Anzahl penetrierter und hypersensitiv reagierender Epidermiszellen in der Doppelmutante *pen2 pad4-1* gezeigt (Abb. C-17). Die möglicherweise, trotz der *pen2*-ähnlichen HR der Epidermiszellen, unterdrückte HR des Mesophylls infizierter Blätter von *pen2 pad4-1* könnte daher für die Suppression des Nekrose- und Zelltod-Phänotyps verantwortlich sein. Nach Inokulation der Einzelmutante *pad4-1* ist keine makroskopisch sichtbare HR beobachtet worden (Abb. C-15). In Korrelation dazu zeigt die Untersuchung der Penetrations-Häufigkeit in *pad4-1* nach *P. infestans*-Infektion eine mit *gl1* vergleichbare Anzahl penetrierter und hypersensitiv reagierender Epidermiszellen (Abb. C-17).

Das Ergebnis der Untersuchung unterschiedlicher Komponenten der SA-abhängigen Signaltransduktion in der Interaktion *A. thaliana* – *P. infestans* deutet auf eine mögliche *pen2*-abhängige Funktion von *EDR1* in der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* hin. Es kann daher angenommen werden, dass für die Ausprägung des verstärkten Mesophyll-Zelltods in *pen2 edr1-1* die Unterdrückung der Penetrationsresistenz (*pen2*) notwendig ist. Im Gegensatz dazu kommt es durch *pad4-1* im *pen2*-Hintergrund zu einer Abschwächung der HR im Mesophyll der infizierten Blätter. Demnach könnte *PAD4* eine Funktion als positiver Regulator der HR in *A. thaliana* nach *P. infestans*-Infektion haben.

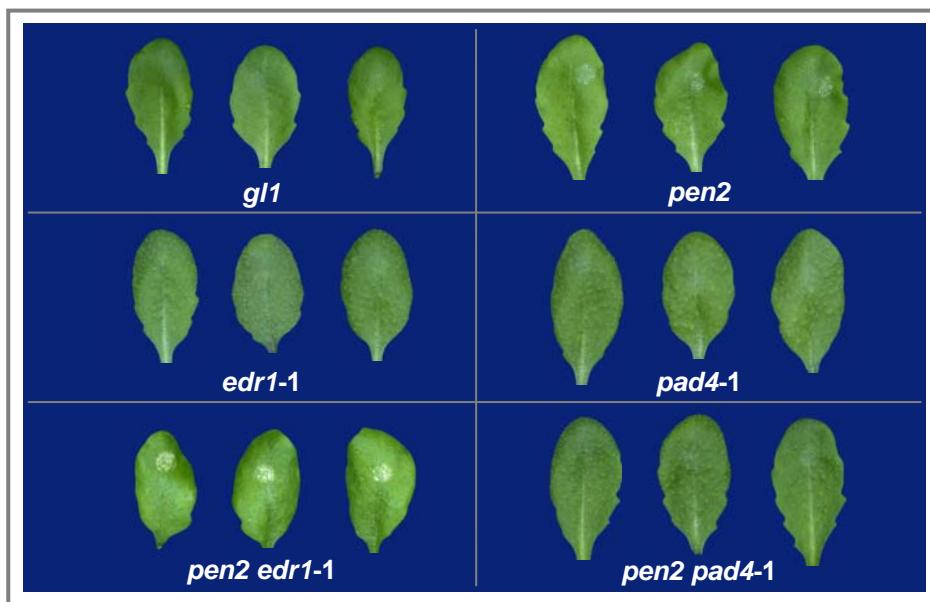


Abb. C-15: HR-Phänotyp in unterschiedlichen *A. thaliana* SA-Signaltransduktionsmutanten nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden mit 10 μ l einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml) inkuliert und 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Blätter.

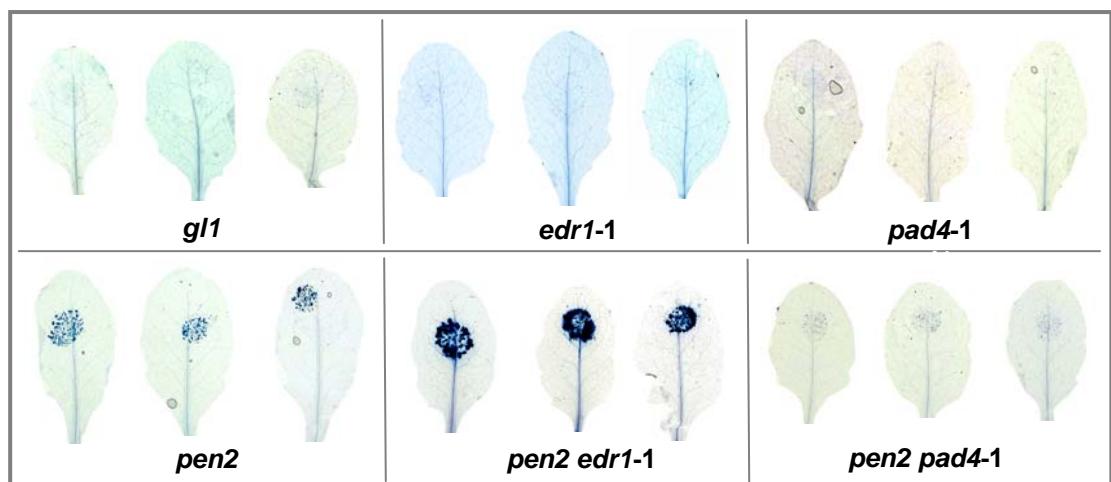


Abb. C-16: Hypersensitiver Zelltod in unterschiedlichen *A. thaliana* SA-Signaltransduktionsmutanten nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Mutanten wurden jeweils mit 10 μ l einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml) inkuliert, 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend mit Trypan-Blau gefärbt. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Blätter.

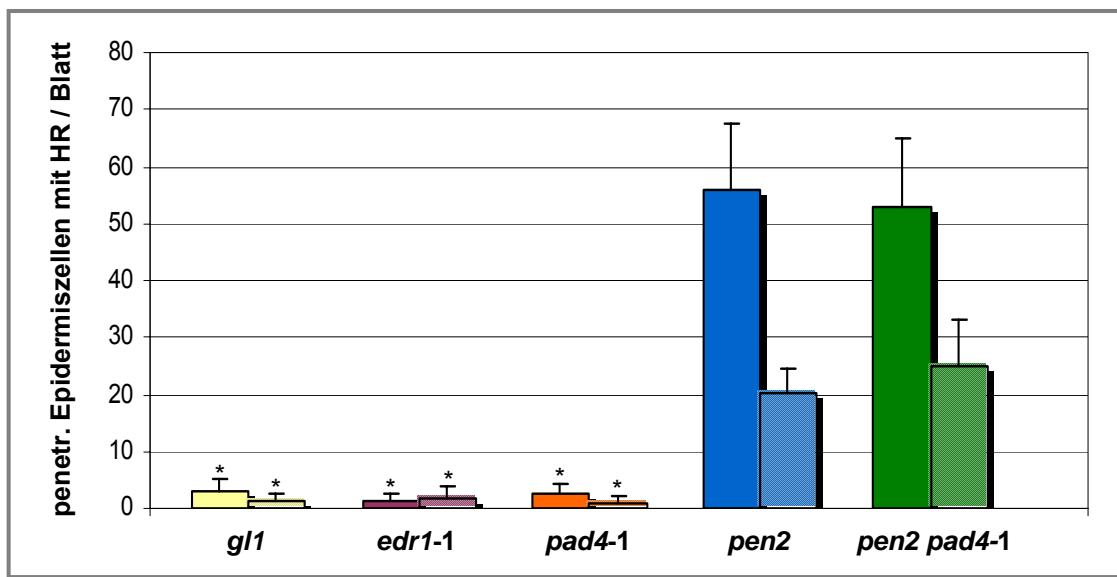


Abb. C-17: Penetrations-Häufigkeit in unterschiedlichen *A. thaliana*-SA-Signaltransduktionsmutanten nach *P. infestans*-Inokulation. Dargestellt ist die Penetrations-Häufigkeit (penetr. Epidermiszellen mit HR / Blatt) in unterschiedlichen SA-Signaltransduktionsmutanten im Vergleich zu *pen2* 3 Tage nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (2×10^4 / ml). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 5 - 11 inokulierten Blättern je Genotyp (Nicht schraffierte bzw. schraffierte Balken entsprechen jeweils den Daten eines Experiments). Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied der Daten im Vergleich zu *pen2* (Einweg-ANOVA, $P \leq 0,001$).

Tab. C-1 Übersicht der HR-Phänotypen in unterschiedlichen *A. thaliana*-Einzel- und Doppelmutanten bzw. transgenen *A. thaliana*-Linien nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml). Zur Bonitur des HR-Phänotyps wurde die Nekrotisierung nach *P. infestans*-Inokulation in jeweils mindestens zwei unabhängigen Experimenten ausgewertet.

Referenz	genetischer Hintergrund	HR-Phänotyp (makroskopisch)
<i>gl1</i>	Col-3	keine HR
<i>pen2</i>	Col-3 <i>gl1</i>	HR
Mutante		
<i>pmr4-1</i>	Col-0	keine HR
<i>pad4-1</i>	Col-0	keine HR
<i>edr1-1</i>	Col-0	keine HR
Doppelmutante		
<i>pen2 rar1-10</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Ler	HR
<i>pen2 sgt1b-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Ler	HR
<i>pen2 eds1-2</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Ler	HR
<i>pen2 pad4-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Col-0	keine HR
<i>pen2 ndr1-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Col-0	HR
<i>pen2 npr1-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Col-0	HR
<i>pen2 edr1-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Col-0	verstärkte HR
Dreifachmutante		
<i>pen2 rar1-10 sgt1b-1</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Ler	HR
transgene Linie		
<i>pen2 NahG¹</i>	Col-3 <i>gl1</i> / Col-0	HR

¹⁾ *NahG*-Transgen aus *Pseudomonas syringae*

2.2 HR-Phänotyp einer *NahG* exprimierenden *Arabidopsis thaliana*-Linie im *pen2*-Hintergrund nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Um den Einfluss des für die SA-Hydroxylase kodierenden bakteriellen Gens *NahG* auf den HR-Phänotyp der Mutante *pen2* zu untersuchen, erfolgte die Analyse der transgenen *A. thaliana*-Linie *pen2 NahG*. Das Saatgut dieser *A. thaliana*-Linie wurde freundlicherweise durch J. Dittgen (MPIZ, Köln) zur Verfügung gestellt. Nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^5 / ml) wurde auf Blättern von *pen2 NahG* ein *pen2*-ähnlicher HR-Phänotyp beobachtet (Daten nicht gezeigt; Tab. C-1). Nach *P. infestans*-Inokulation einer *NahG*-exprimierenden *A. thaliana*-Linie des Ökotyps Col-0 wurde jedoch keine HR beobachtet (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung). Demnach scheint das SA-Signal keinen Effekt auf den HR-Phänotyp, sowohl in der Mutante *pen2* als auch im *A. thaliana*-Ökotyp Col-0 zu haben. Es kann daher angenommen werden, dass die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz im *A. thaliana*-Ökotyp Col-0 gegen *P. infestans* unabhängig von der Fähigkeit zur Akkumulation von SA ist.

2.3 HR-Phänotyp der *Arabidopsis thaliana*-Mutante *pmr4-1* nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Zur Analyse der Funktion von Kallose in der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* erfolgte die Untersuchung der *A. thaliana*-Mutante *pmr4-1* (*POWDERY MILDEW RESISTANT4*; Vogel & Somerville, 2000). Diese Mutante trägt eine Stop-Mutation in dem für eine Kallose-Synthase (*GLUCAN SYNTHASE-LIKE5*, *GSL5*) kodierenden Gen und ist durch den Verlust der Kallose-Akkumulation nach Verwundung und Pathogeninfektion gekennzeichnet (Vogel & Somerville, 2000; Nishimura *et al.*, 2003). Das Saatgut der Mutante *pmr4-1* wurde freundlicherweise von V. Lipka (MPIZ Köln) zur Verfügung gestellt. Nach *P. infestans*-Inokulation von Blättern der Mutante *pmr4-1* wurden keine sichtbaren nekrotischen Reaktionen beobachtet (Daten nicht gezeigt, Tab C-1). Nach Infektion der *pmr4-1*-Mutante im *pen2*-Hintergrund wurde ein *pen2*-ähnlicher HR-Phänotyp beobachtet (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass zur Ausprägung der Nichtwirtsresistenz im *A. thaliana*-Ökotyp Col-0 gegen *P. infestans* die Akkumulation von Kallose nicht notwendig ist. In Korrelation dazu scheint es auch im Hintergrund einer erhöhten Penetrations-Häufigkeit von *P. infestans* zu keiner weiteren Verstärkung des veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyps in der Doppelmutante *pen2 pmr4-1* zu kommen.

Es ist daher anzunehmen, dass hauptsächlich Kallose-unabhängige Abwehrreaktionen an der Resistenzausprägung in der Interaktion mit *P. infestans* beteiligt sind.

3 Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

3.1 EMS-Remutagenese des *pen2*-Saatguts

Zur Identifizierung von Genen, welche an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* beteiligt sind, wurde ein *A. thaliana*-Mutanten-Durchmusterung durchgeführt. Das Ziel war die Isolation von *A. thaliana*-Mutanten, welche in ihrer Nichtwirtsresistenz gegenüber *P. infestans* verändert sind. Dazu wurde ausgehend von zweifach rückgekreuzten homozygoten *pen2*-Samen eine Remutagenese mit dem chemischen Mutagen Ethylmethansulfonat (EMS) in Zusammenarbeit mit V. Lipka am MPIZ Köln durchgeführt. Die durch EMS induzierten Punktmutationen im *pen2*-Genom sollten dabei einerseits zu Mutanten mit einer veränderten Nichtwirtsresistenz bis hin zur Suszeptibilität gegenüber *P. infestans* führen. Andererseits waren ebenso Mutanten mit einer möglichen Suppression des *pen2*-abhängigen Phänotyps sowie Mutanten, die einen intermediären Phänotyp zeigen, zu erwarten.

3.2 Durchmusterung der M2-Nachkommenschaft der remutagenisierten *pen2*-Population

Nach der EMS-Mutagenese von ca. 50 000 *pen2*-Samen und der Kultivierung der M1-Generation in 200 Anzuchtschalen zu je zwei Gruppen erfolgte die Isolation des entsprechenden M2-Saatguts. Die Zahl der Individuen in der M1-Nachkommenschaft in jeder erhaltenen Gruppe wurde abgeschätzt um eine spätere Quantifizierung der Aussaat der M2-Nachkommenschaft zu ermöglichen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Anzahl der M1-Individuen in jeder Gruppe mindestens 25 bzw. höchstens 50 beträgt.

3.3 Effizienz der Remutagenese des *pen2*-Saatguts

Die Effizienz der EMS-Remutagenese des *pen2*-Saatguts wurde durch J. Dittgen (MPIZ, Köln) ermittelt und erfolgte anhand der Bestimmung der Chlorophyll-Mutanten-Rate in der M2-Nachkommenschaft. Diese betrug durchschnittlich 2,0 % (J. Dittgen, MPIZ Köln; persönliche Mitteilung).

3.4 Primärcharakterisierung putativer *Arabidopsis thaliana*-Mutanten in der M2-Nachkommenschaft

Die Aussaatbedingungen für die M2-Generation wurden so gewählt, dass etwa 10 Pflanzen der M2-Nachkommenschaft jeder M1-Pflanze angezogen wurden. 4 - 5 Rosettenblätter von etwa 4 - 5

Wochen alten M2-Pflanzen wurden mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^5 / ml) inkuliert und anschließend 3 Tage bei 100 % Luftfeuchtigkeit in der Phytokammer inkubiert. Um eine optimalere Verifikation des Autofluoreszenz-Phänotyps zu erreichen, wurde die Sporen-Dichte des Inokulums zu einem späteren Zeitpunkt auf 1×10^5 / ml reduziert. Die Primärcharakterisierung erfolgte durch Analyse der Autofluoreszenz sowie durch Beurteilung der Nekrosen der inkulierten Blätter. Auf diese Weise wurden in Zusammenarbeit mit L. Westphal (IPB Halle) ca. 70 000 M2-Pflanzen, welche etwa 7000 M1-Pflanzen aus über 180 unabhängigen M1-Gruppen repräsentierten, durchmustert werden.

Die Einteilung der beobachteten Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotypen nach *P. infestans*-Inokulation erfolgte in die in Tab. C-2 dargestellten Klassen 1 - 3. Dabei wurden putative Mutanten mit einer Verstärkung des Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyps als Klasse 1, mit einer Suppression dieses Phänotyps als Klasse 2 zusammengefasst. Putative Mutanten, die nach *P. infestans*-Inokulation neben einer Verstärkung des Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyps auch Chlorosen zeigten, wurden als Klasse 3 zusammengefasst. Für 11 isolierte putative Mutanten wurde aufgrund von Chlorosen oder starker Anthozyanbildung keine klare Zuordnung ihres Phänotyps in eine der Klassen 1 - 3 gemacht. In Abb. C-18 sind exemplarisch die Autofluoreszenz-Phänotypen der Klassen 1 und 2 der in der Primärcharakterisierung isolierten putativen Mutanten gezeigt.

Insgesamt wurden durch die Primärcharakterisierung der M2-Nachkommenschaft 327 putative Mutanten aus 96 unabhängigen M1-Gruppen in 3 Klassen (Tab C-2) isoliert.

Tab. C-2: Primärcharakterisierung putativer *A. thaliana*-Mutanten in der M2-Nachkommenschaft der remutagenisierten *pen2*-Population. Dargestellt ist eine Übersicht der nach *P. infestans*-Inokulation der M2-Nachkommenschaft des remutagenisierten *pen2*-Saatguts isolierten putativen Mutanten mit einem im Vergleich zu *pen2* veränderten Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyp.

Primärcharakterisierung (70 000 M2-Pflanzen):				
	Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3	übrige
Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyp	Verstärkung	Suppression	Verstärkung (+ Chlorose)	
putative Mutanten	115	182	19	11
M1-Gruppen	55	36	3	9
Gesamtzahl putativer Mutanten: 327				

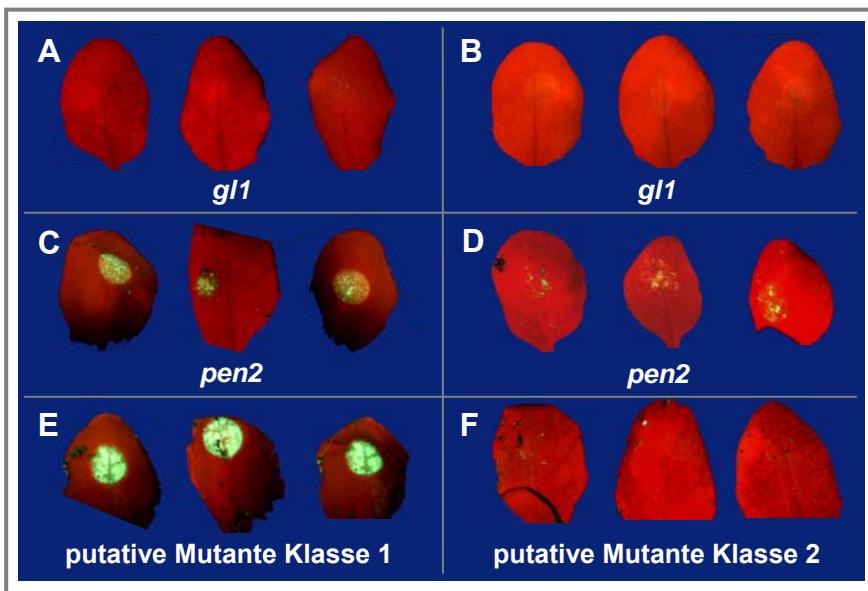


Abb. C-18: Analyse des Autofluoreszenz-Phänotyps putativer *A. thaliana*- Mutanten in der M2-Nachkommenschaft der remutagenisierten *pen2*-Population. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden jeweils mit 10 µl einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (Experiment 1 (A, C, E): 5×10^5 / ml / Experiment 2 (B, D, F): 1×10^5 / ml) inkokuliert, 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenz-Stereomikroskop analysiert. Dargestellt sind repräsentative Blätter aus zwei unabhängigen Durchmusterungen (A, C, E: Experiment 1; B, D, F: Experiment 2).

A-B: Autofluoreszenz-Phänotyp inkulierter Blätter von *g1* (Fluoreszenz-Stereomikroskopie)

C-D: Autofluoreszenz-Phänotyp inkulierter Blätter von *pen2* (Fluoreszenz-Stereomikroskopie)

E: Autofluoreszenz-Phänotyp inkulierter Blätter einer puativen Mutante der Klasse 1 (Fluoreszenz-Stereomikroskopie)

F: Autofluoreszenz-Phänotyp inkulierter Blätter einer puativen Mutante der Klasse 2 (Fluoreszenz-Stereomikroskopie)

3.5 Untersuchung des Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyps putativer *Arabidopsis thaliana*-Mutanten in der M3-Nachkommenschaft

Um die in der Primärcharakterisierung beobachteten Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotypen der 327 isolierten putativen Mutanten zu bestätigen, wurde die M3-Nachkommenschaft von 280 dieser putativen Mutanten untersucht (Tab. C-3). Zur Untersuchung der in der M2-Nachkommenschaft beobachteten Phänotypen erfolgte die Inkulation von 15 – 20 Pflanzen der M3-Generation mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^5 / ml). Die Untersuchung der putativen Mutanten, welche nach Inkulation der geringer konzentrierten Zoosporensuspension (1×10^5 / ml) isoliert wurden, erfolgte nach Inkulation einer ebenso geringer konzentrierten Zoosporensuspension (1×10^5 / ml). Die Untersuchung der M3-Generation der 280 putativen Mutanten zeigte, dass der Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyp von 254 der in der Primärcharakterisierung isolierten putativen Mutanten nicht bestätigt werden konnte (Tab. C-3). Für 5 dieser putativen Mutanten wurde durch eine CAPS-Marker-basierte (cleaved amplified

(*polymorphic sequence*) Genotypisierung gezeigt, dass *pen2* nicht homozygot vorlag (Daten nicht gezeigt). Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei diesen putativen Mutanten wahrscheinlich um eine Verunreinigung im Saatgut der M1-Generation oder bei der Aussaat der M2-Generation handelt. In der Analyse der M3-Nachkommenschaft von 164 putativen Suppressor-Mutanten wurde die in der M2-Nachkommenschaft beobachtete Suppression des *pen2*-Phänotyps nicht bestätigt (Tab. C-3). Als Grund dafür ist anzunehmen, dass diese, zumeist zu Beginn der Primärcharakterisierung isolierten putativen Mutanten aufgrund zu geringer Keimungsrate und Sporenmotilität des verwendeten *P. infestans*-Isolates eine Reduktion der Nekrosen bzw. der Autofluoreszenz zeigten. An dieser Stelle sei auch darauf hinzuweisen, dass die Lagerung und Anzucht von *P. infestans* bzw. die Induzierung der Sporulation keine standardisierte Prozedur ist, was daher möglicherweise zu Schwankungen hinsichtlich der Effizienz des *P. infestans*-Inokulums geführt hat.

Für 13 putative Mutanten der Klasse 1 (elf unabhängige M1-Gruppen) und 13 putative Mutanten der Klasse 3 (zwei M1-Gruppen) wurden die in der Primärcharakterisierung beobachteten Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotypen in der M3-Nachkommenschaft bestätigt (Tab. C-3). Die Untersuchung der M3-Generation der verbleibenden 47 putativen Mutanten aus der Primärcharakterisierung ist aufgrund zu geringer Samenproduktion oder Letalität der entsprechenden M2-Linien nicht durchgeführt worden. Aufgrund der zwischen den putativen Mutanten 200 und 202 (M1-Gruppe 20B) bzw. zwischen den putativen Mutanten 281, 282, 284, 285, 286, 288, 289, 290, 292, 293, 294, 295 (M1-Gruppe 68A) beobachteten Ähnlichkeit des morphologischen Phänotyps und der Tatsache, dass die putativen Mutanten jeweils aus einer gemeinsamen M1-Gruppe stammen (siehe Tab. C-4) ist ein Allelismus zwischen den entsprechenden putativen Mutanten nicht auszuschließen.

Tab. C-3: Analyse des Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyps putativer *A. thaliana*-Mutanten in der M3-Nachkommenschaft der remutagenisierten *pen2*-Population. Dargestellt ist eine Übersicht der Analyse des Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyps in der M3-Nachkommenschaft von 280 isolierten putativen Mutanten.

Analyse der M3-Generation (280 putative Mutanten)				
	Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3	übrige
Anzahl putativer Mutanten	114	182	20	11
Anzahl inokulierter putativer Mutanten	90	164	20	6
Phänotyp nicht bestätigt	77	164	7	6
Phänotyp bestätigt	13	0	13	0
Gesamtzahl bestätigter putativer Mutanten: 26				

Tab. C-4: Übersicht der aus der remutagenisierten *pen2*-Population isolierten und bestätigten putativen *A. thaliana*-Mutanten. Dargestellt sind 13 putative Mutanten mit verstärkter Nekrose sowie 13 putative Mutanten mit verstärkter Nekrose und Chlorose nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension, deren Phänotypen in der M3-Nachkommenschaft bestätigt wurden.

putative Mutanten mit verstärkter Nekrose (Klasse 1)		
putative Mutante	M1-Gruppe	morphologischer Phänotyp
190	14A	zwergwüchsig, anomale Blattform, spontane HR in älteren Blättern, verringerte Fertilität
200	20B	zwerg- und flachwüchsig, dunkelgrün, Anthozyane in Petiolen, inhibiertes Wurzelwachstum
202	20B	zwerg- und flachwüchsig, dunkelgrün, Anthozyane in Petiolen, inhibiertes Wurzelwachstum
222	24A	Wildtyp
242	36A	kleinerer Wuchs, anomale Blattform, spontane HR
266	57B	kleinerer Wuchs, anomale Blattform
279	66B	spontaner Zelltod
298	71B	Wildtyp
299	71B	Wildtyp
301	73A	Wildtyp
303	73B	Wildtyp
304	74A	Wildtyp
318	82B	Wildtyp
putative Mutanten mit verstärkter Nekrose und Chlorose (Klasse 3)		
putative Mutante	M1-Gruppe	morphologischer Phänotyp
272	59B	Chlorose in älteren Blättern
281 - 282	68A	kleinerer Wuchs, Chlorose
284 - 286	68A	kleinerer Wuchs, Chlorose
288 - 290	68A	kleinerer Wuchs, Chlorose
292 - 295	68A	kleinerer Wuchs, Chlorose

3.6 Charakterisierung der putativen *Arabidopsis thaliana*-Mutanten

Die im folgenden dargestellte Charakterisierung der isolierten putativen Mutanten bezieht sich auf die Linien 190, 202, 222, 242, 266, 272 und 303, welche als putative Mutanten mit einem verstärkten Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyp (im folgenden als hypersensitive Reaktion; HR bezeichnet) zeigen. Die Analyse weiterer Linien putativer Mutanten wurde innerhalb dieser Arbeit nicht durchgeführt. Aus zeitlichen Gründen wurden alle Untersuchungen und Kreuzungen dieser putativen Mutanten mit nicht rückgekreuztem Pflanzenmaterial durchgeführt. Für die putativen Mutanten 202 und 222 stand am Ende der Arbeit Samen der ersten Rückkreuzung für weiterführende Analysen zur Verfügung.

3.6.1 HR-Phänotyp putativer *Arabidopsis thaliana*-Mutanten nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Nach Inokulation von Blättern der untersuchten putativen Mutanten mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension wurde eine im Vergleich zu *pen2* verstärkte HR beobachtet. In Abb. C-19 sind die beobachteten HR-Phänotypen der untersuchten putativen Mutanten nach *P. infestans*-Inokulation dargestellt.

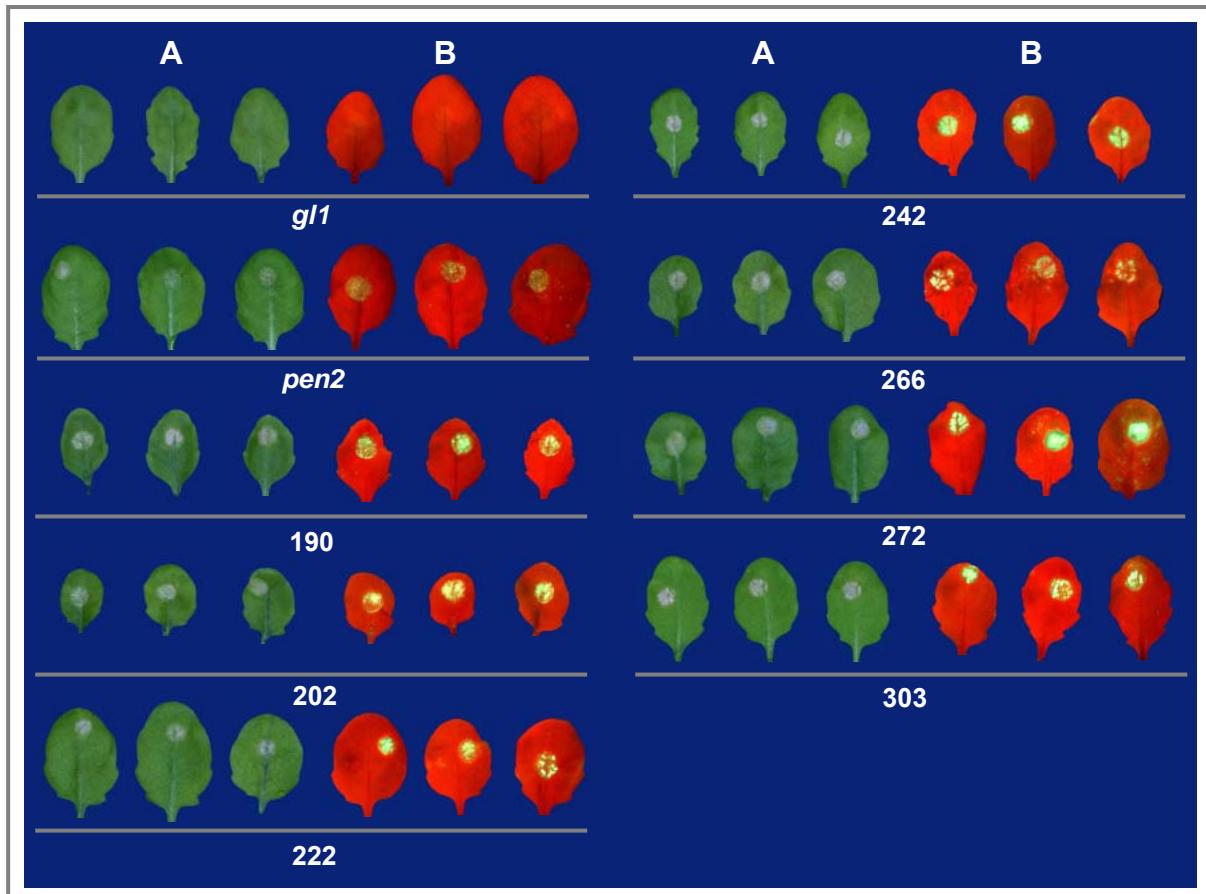


Abb. C-19: Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyp unterschiedlicher putativer *A. thaliana*-Mutanten nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten Pflanzen der putativen Mutanten wurden jeweils mit 10 μ l einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (A: 5×10^5 / ml, B: 1×10^5 / ml) inokuliert und 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Dargestellt sind jeweils 3 repräsentative Blätter.

- A: Nekrose-Phänotyp inokulierter Blätter unterschiedlicher putativer Mutanten
- B: Autofluoreszenz-Phänotyp inokulierter Blätter unterschiedlicher putativer Mutanten (Fluoreszenz-Stereomikroskopie)

Das Ausmaß dieser Verstärkung schwankte innerhalb verschiedener Experimente. Die Nekrosen der putativen Mutanten 202 und 222 schienen im Vergleich zu den Nekrosen der Linien 190, 242, 266, 272 und 303 etwas schwächer ausgeprägt zu sein. Die ersten, makroskopisch sichtbaren, nekrotischen Reaktionen wurden bei den putativen Mutanten 242, 272 und 303 bereits ein Tag, bei den putativen Mutanten 190, 202, 222, 266 und *pen2* ein bis zwei Tage nach der *P. infestans*-

Infektion beobachtet (Daten nicht gezeigt). 3 Tage nach der Inokulation hatten die Nekrosen die maximale Größe erreicht. Nach einer Inkubation von 7 Tagen wurde bei keiner der untersuchten putativen Mutanten Veränderungen der Nekrosen oder Krankheitssymptome bzw. sichtbares Pathogenwachstum oder Sporulation beobachtet.

3.6.2 Untersuchung der Penetrations-Häufigkeit in putativen *Arabidopsis thaliana*-Mutanten nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Um eine mögliche im Vergleich zu *pen2* veränderte Resistenz gegen *P. infestans* in den putativen Mutanten zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung der Penetrations-Häufigkeit nach *P. infestans*-Infektion. Für die putativen Mutanten 190, 242, 266, 272 und 303 wurde aufgrund der hohen Zelltod-Häufigkeit im Mesophyll der infizierten Blätter eine Bestimmung der Penetrations-Häufigkeit nicht durchgeführt. Auch nach der Reduktion der Zoosporen-Dichte auf 5×10^3 / ml konnten die penetrierten und hypersensitiv reagierenden Epidermiszellen in diesen putativen Mutanten nicht zweifelsfrei ausgezählt werden. In Abb. C-20 ist das Ergebnis der Analyse der Penetrations-Häufigkeit in den putativen Mutanten 202 und 222 aus zwei unabhängigen Experimenten graphisch dargestellt. Die Untersuchung zeigt, dass die Penetrations-Häufigkeit in den putativen Mutanten 202 und 222 etwa 1,5- bis annähernd 2-fach im Vergleich zu *pen2* erhöht ist. Es kann daher geschlossen werden, dass die Sekundärmutationen in den putativen Mutanten 202 und 222 zu einer weiteren Erhöhung der Penetrations-Häufigkeit in *pen2* nach *P. infestans*-Infektion führen.

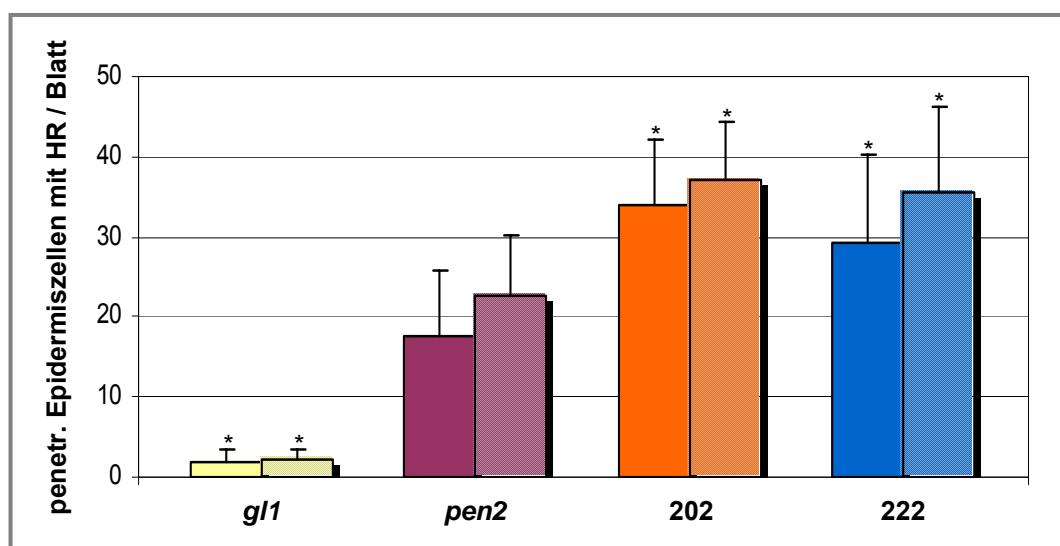


Abb. C-20: Penetrations-Häufigkeit in den putativen *A. thaliana*-Mutanten 202 und 222 nach *P. infestans*-Inokulation. Dargestellt ist die Penetrations-Häufigkeit (penetr. Epidermiszellen mit HR / Blatt) in den putativen Mutanten 202 und 222 im Vergleich zu *pen2* 3 Tage nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (2×10^4 / ml). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 11 - 17 inokulierten Blättern je untersuchter *A. thaliana*-Linie (Nicht schraffierte bzw. schraffierte Balken entsprechen jeweils den Daten eines Experiments). Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied der Daten im Vergleich zu *pen2* (Einweg-ANOVA, $P \leq 0,05$).

3.6.3 Hypersensitiver Zelltod in putativen *Arabidopsis thaliana*-Mutanten nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Um die unter 3.6.2 beschriebene erhöhte Zelltod-Häufigkeit in den putativen Mutanten nach *P. infestans*-Infektion zu untersuchen, erfolgte die Analyse infizierter und mit Trypan-Blau gefärbter Blätter. In Abb. C-21 ist eine repräsentative Auswahl infizierter und gefärbter Blätter dargestellt. Zur Quantifizierung des hypersensitiven Zelltods nach *P. infestans*-Infektion wurden die Trypan-Blau-Intensitäten in den inkulierten Bereichen durch Ermittlung des Pixel-Index bestimmt (Abb. C-22).

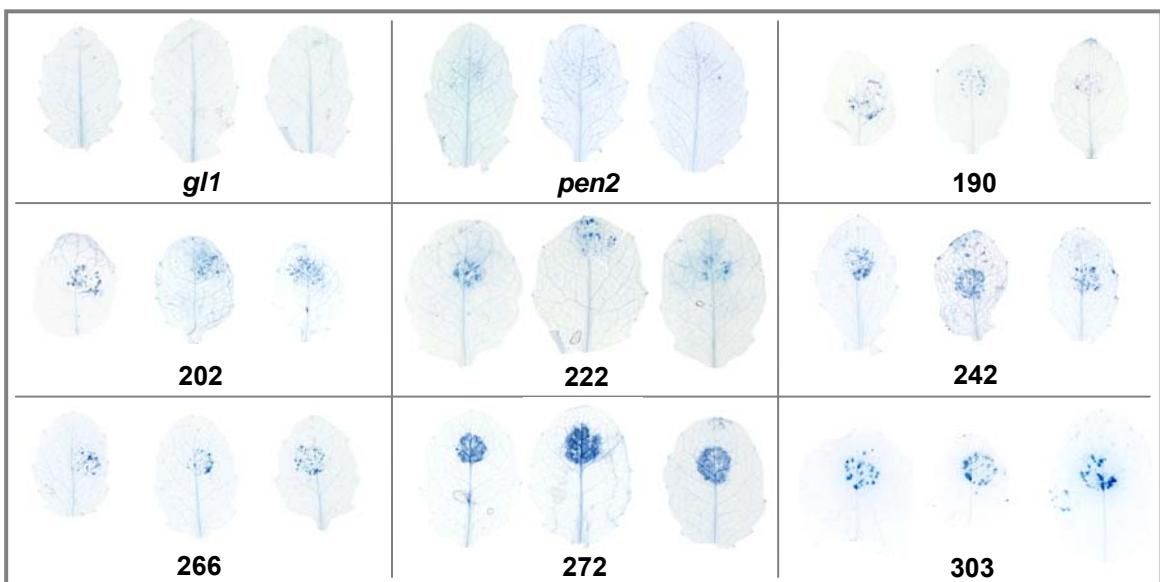


Abb. C-21: Hypersensitiver Zelltod unterschiedlicher putativer *A. thaliana*-Mutanten nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten Pflanzen der putativen *A. thaliana*-Mutanten wurden jeweils mit 10 µl einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (2×10^4 / ml) inkuliert, 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend mit Trypan-Blau gefärbt. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Blätter.

Aus Abb. C-21 geht hervor, dass alle untersuchten putativen Mutanten mit einer im Vergleich zu *pen2* erhöhten Zelltod-Häufigkeit nach *P. infestans*-Inokulation reagieren. Die Zelltod-Häufigkeit zeigte jedoch in den verschiedenenen putativen Mutanten ein unterschiedliches Ausmaß (Abb. C-22). Um eine computergestützte Verifikation der Zelltod-Häufigkeit zu ermöglichen, wurden die putativen Mutanten mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension inkuliert, die eine Sporenkonzentration von 1×10^5 / ml hatte (Abb. C-22). Die Verwendung niedriger oder höher konzentrierter Sporensuspensionen resultierte in einer für die Quantifizierung zu schwachen bzw. zu starken Färbung der infizierten Blätter (Daten nicht gezeigt). Nach mikroskopischer Analyse von Trypan-Blau-gefärbtem infiziertem Blattmaterial wurde beobachtet, dass neben der im Vergleich zu *pen2* erhöhten Anzahl hypersensitiv reagierender Epidermiszellen auch verstärkt Zellen des Mesophylls in den putativen Mutanten 202 und 222 mit Zelltod reagieren (Daten nicht gezeigt). Die

weitere Verstärkung des hypersensitiven Zelltods im Mesophyll der infizierten putativen Mutanten 190, 242, 266, 272 und 303 (Daten nicht gezeigt) ist daher als Grund für die Zunahme der Zelltod-Häufigkeit in diesen putativen Mutanten im Vergleich zu den putativen Mutanten 202 und 222 anzusehen (Abb. C-21; C-22).

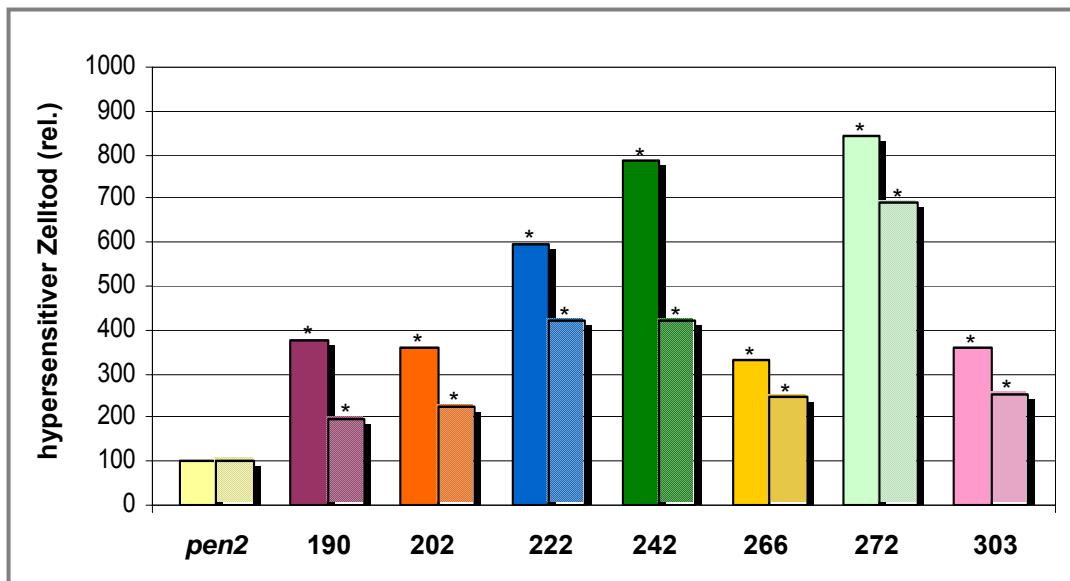


Abb. C-22: Quantifizierung des hypersensitiven Zelltods in unterschiedlichen putativen *A. thaliana*-Mutanten nach *P. infestans*-Inokulation. Dargestellt ist die quantitative Analyse der relativen Trypan-Blau-Intensität als Index des hypersensitiven Zelltods in unterschiedlichen putativen Mutanten nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 7 - 13 inkulierten Blättern je untersuchter *A. thaliana*-Linie (Nicht schraffierte bzw. schraffierte Balken entsprechen jeweils den Daten eines Experiments). Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied der Daten im Vergleich zu *pen2* (Einweg-ANOVA, $P \leq 0,001$).

Für eine Reihe isolierter *Arabidopsis*-Mutanten wurden spontane Zelltod-Reaktionen, d. h. in Abwesenheit eines Zelltod-induzierenden Signals beschrieben (Lorrain *et al.*, 2003; Lam, 2004). Um einen möglichen spontanen Zelltod in den putativen Mutanten zu untersuchen, wurden unbehandelte Blätter der putativen Mutanten mit Trypan-Blau gefärbt. In unbehandelten Blättern von ca. 3 Wochen alten Pflanzen der putativen Mutanten 202, 222, 266, 272 und 303 wurden dabei keine toten Zellgruppierungen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu deuten die über die gesamte Blattfläche verteilten makroskopisch sichtbaren Zelltod-Reaktionen in der putativen Mutante 242 auf einen konstitutiven Zelltod-Phänotyp (Abb. C-23). In den älteren Blättern von ca. 5 Wochen alten Pflanzen der putativen Mutante 190 wurde nach Trypan-Blau-Färbung ebenso, makroskopisch sichtbare Zelltod-Reaktionen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

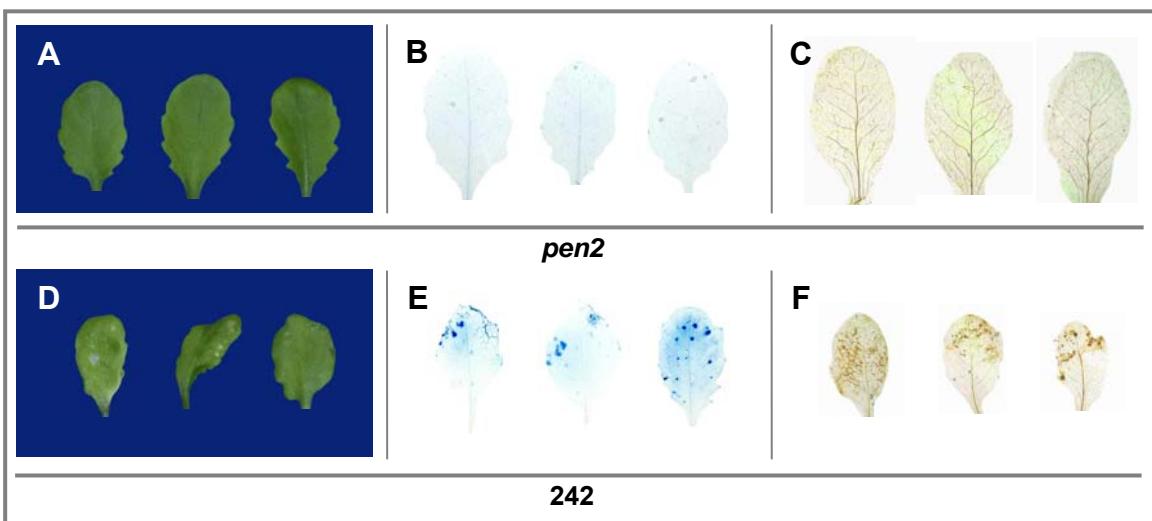


Abb. C-23: Spontaner HR-Phänotyp in unbehandelten Blättern der putativen *A. thaliana*-Mutante 242.

Voll entwickelte Rosettenblätter von ca. 4 - 5 Wochen alten Pflanzen von *pen2* und der putativen Mutante 242 wurden mit Trypan-Blau oder mit DAB gefärbt. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Blätter.

- A: unbehandelte Blätter von *pen2*
- B: unbehandelte Blätter von *pen2* nach Trypan-Blau-Färbung
- C: unbehandelte Blätter von *pen2* nach DAB-Färbung
- D: unbehandelte Blätter der putativen Mutante 242
- E: unbehandelte Blätter der putativen Mutante 242 nach Trypan-Blau-Färbung
- F: unbehandelte Blätter der putativen Mutante 242 nach DAB-Färbung

3.6.4 H_2O_2 -Akkumulation in putativen *Arabidopsis thaliana*-Mutanten nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Die Untersuchung des *oxidative burst* in den putativen *A. thaliana*-Mutanten nach *P. infestans*-Infektion, als eine weitere Komponente der pflanzlichen Pathogenabwehr, erfolgte durch Analyse der H_2O_2 -Akkumulation in inokulierten Blättern. Um eine Quantifizierung des *oxidative burst* zu ermöglichen, wurden die putativen Mutanten mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml) inokuliert und anschließend mit DAB gefärbt. Die Quantifizierung der nach *P. infestans*-Inokulation beobachteten H_2O_2 -Akkumulation erfolgte durch computergestützte Ermittlung des Pixel-Index in infizierten DAB-gefärbten Blättern (Abb. C-25). In Abb. C-24 ist eine repräsentative Auswahl infizierter und gefärbter Blätter dargestellt. Alle untersuchten putativen Mutanten reagieren mit einer im Vergleich zu *pen2* verstärkten Akkumulation von H_2O_2 nach *P. infestans*-Infektion. Die mikroskopische Untersuchung des gefärbten Blattmaterials zeigt, dass in infizierten Blättern von *pen2* neben den penetrierten Epidermiszellen zunehmend auch angrenzende Mesophyllzellen mit einem *oxidative burst*, d. h. mit einer Akkumulation von H_2O_2 , auf das eindringende Pathogen reagieren (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl von reagierenden Epidermis- und Mesophyllzellen scheint, im Gegensatz dazu, in den putativen Mutanten 190, 202, 222, 242, 266, 272, 303 weiter erhöht zu sein (Daten nicht gezeigt). Die Quantifizierung der DAB-Intensitäten in den putativen Mutanten deutet dabei auf eine etwa 3 - 4fach verstärkte H_2O_2 -Akkumulation im Vergleich zu *pen2* hin (Abb. C-25). In Korrelation zu den Ergebnissen der eingangs beschriebenen

zytologischen Charakterisierung des Pathosystems (siehe 1.4; C Ergebnisse) wurde gezeigt, dass es in allen putativen Mutanten nach *P. infestans*-Infektion zu einer, parallel zur verstärkten Nekrosebildung verlaufenden, Erhöhung der Zelltod-Häufigkeit bzw. zu einer Verstärkung des *oxidative burst* sowie der Autofluoreszenz, als Reaktion auf das eindringende Pathogen, kommt. Im Vergleich zur Referenz *pen2* sind jedoch alle untersuchten Reaktionen in den putativen Mutanten deutlich verstärkt. Die Untersuchung des *oxidative burst* in unbehandelten Blättern der putativen Mutanten zeigt, dass der für die putative Mutante 242 gezeigte spontane hypersensitive Zelltod von einer spontanen H₂O₂-Akkumulation begleitet ist (Abb. C-23). Die DAB-Färbung von unbehandelten älteren Blättern der putativen Mutante 190 deutet auch hier auf eine spontane Akkumulation von H₂O₂ hin (Daten nicht gezeigt). In Blättern von *pen2* (Abb. C-23) sowie der putativen Mutanten 202, 222, 266, 272 und 303 (Daten nicht gezeigt) wurde keine spontane H₂O₂-Akkumulation beobachtet.

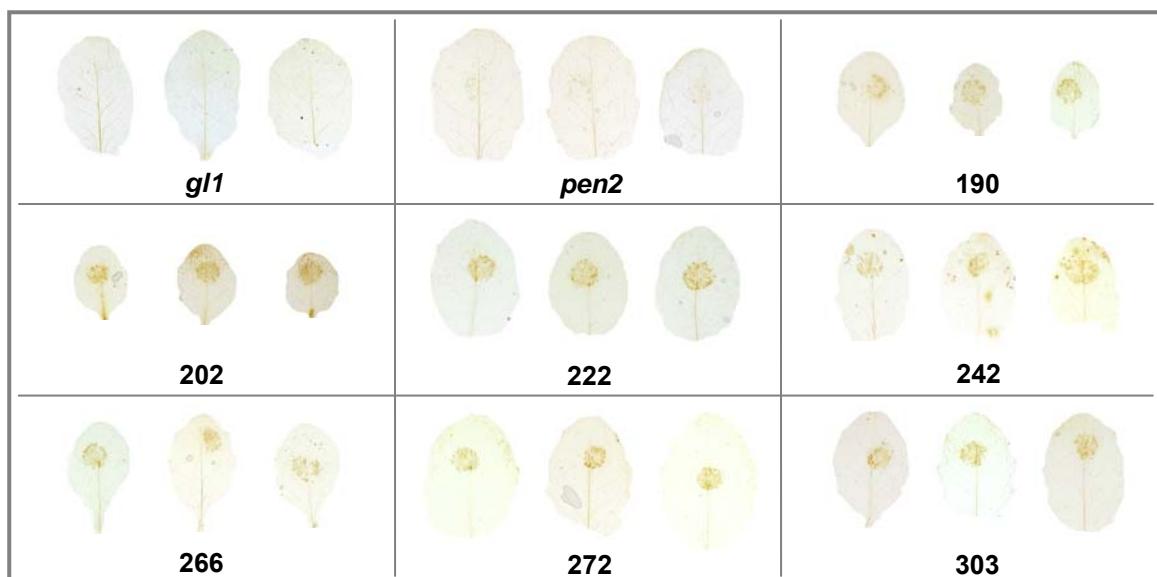


Abb. C-24: Akkumulation von H₂O₂ in unterschiedlichen putativen *A. thaliana*-Mutanten nach *P. infestans*-Inokulation. Voll entwickelte Rosettenblätter von 4 - 5 Wochen alten Pflanzen der putativen *A. thaliana*-Mutanten wurden jeweils mit 10 µl einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml) inkubiert, 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend mit DAB gefärbt. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Blätter.

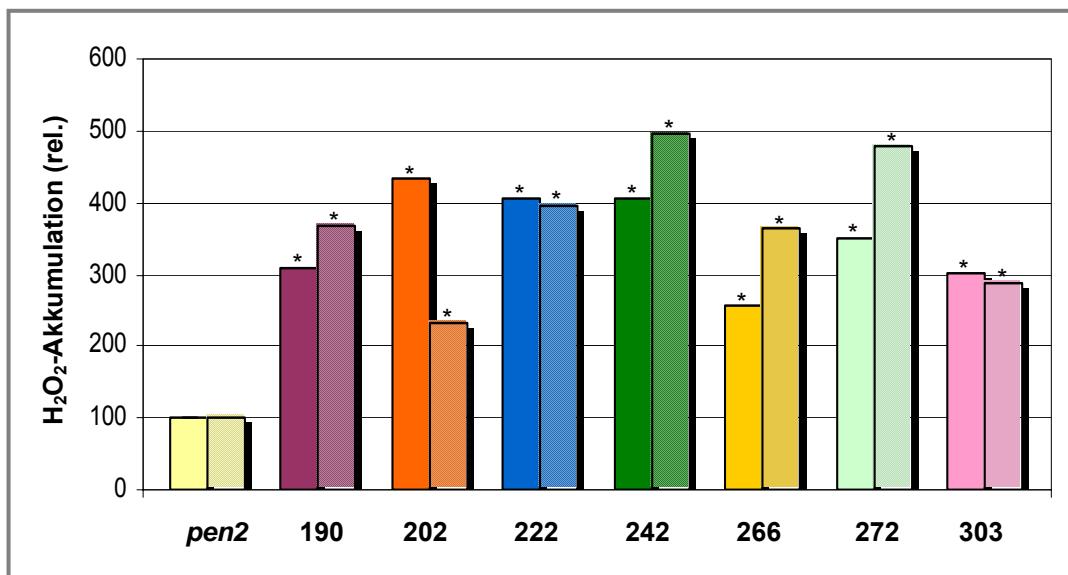


Abb. C-25: Quantifizierung der H₂O₂-Akkumulation in unterschiedlichen putativen *A. thaliana*-Mutanten nach *P. infestans*-Inokulation. Dargestellt ist die quantitative Analyse der relativen DAB-Intensität als Index der H₂O₂-Akkumulation in unterschiedlichen putativen Mutanten nach Inokulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (1×10^5 / ml). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 9 - 15 inokulierten Blättern je untersuchter *A. thaliana*-Linie (Nicht schraffierte bzw. schraffierte Balken entsprechen jeweils den Daten eines Experiments). Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied der Daten im Vergleich zu *pen2* (Einweg-ANOVA, $P \leq 0,001$).

3.6.5 Zytologische Analyse der putativen *Arabidopsis thaliana*-Mutanten nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Die zytologische Analyse der *P. infestans*-Interaktion in den putativen Mutanten 190, 202, 222, 242, 266, 272 und 303 zeigte hinsichtlich der entwickelten Pathogenstrukturen keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu *pen2*. Nach Trypan-Blau-Färbung von infiziertem Blattmaterial wurde in allen untersuchten putativen Mutanten die Ausbildung von *pen2*-ähnlichen invasiven Hyphen in infizierten Epidermiszellen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der im Vergleich zu *pen2* verstärkten hypersensitiven Reaktion im Mesophyll infizierter putativer Mutanten (Abb. C-21) und der dadurch bedingten starken Trypan-Blau-Färbung des infizierten Gewebes konnte ein mögliches weiteres Vordringen der invasiven Hyphen in das Mesophyll nicht zweifelsfrei untersucht werden. Die elektronenmikroskopische Analyse sollte daher weiteren Aufschluss über die zellulären Feinstrukturen in der *P. infestans*-Interaktion geben.

3.6.5.1 Elektronenmikroskopische Analyse: Untersuchung von zellulären Feinstrukturen in den putativen *Arabidopsis thaliana*-Mutanten nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Um eine optimale Auswertung der elektronenmikroskopischen Analysen zu ermöglichen, wurden Blätter der putativen Mutanten 190, 202, 222, 242, 266, 272 und 303 sowie der Referenzen *pen2*

und *g1* mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension hoher Dichte (5×10^5 / ml) inkuliert und nach einer Inkubation von 3 Tagen untersucht. Die Fixierung, Einbettung und Anfertigung der Ultradünnsschnitte der Präparate sowie die elektronenmikroskopische Analyse wurde von M. Birschwilks (IPB Halle) durchgeführt. Die Analyse mehrerer unabhängiger Experimente deutete auf keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der zellulären Feinstrukturen nach *P. infestans*-Infektion zwischen den untersuchten putativen Mutanten und *pen2* (siehe 1.4.5). In unabhängigen Experimenten wurde daher sowohl in Epidermiszellen als auch in Mesophyllzellen der infizierten putativen Mutanten *pen2*-ähnliche *P. infestans*-Hyphenstrukturen beobachtet. Eine Ausnahme davon scheint die putative Mutante 303 darzustellen (Daten nicht gezeigt). Hier wurden in zwei unabhängigen Experimenten lediglich in den Epidermiszellen *P. infestans*-Hyphen gefunden (M. Birschwilks, IPB Halle; persönliche Mitteilung). Eine lichtmikroskopische Prüfung dieses Befundes konnte jedoch aufgrund der erwähnten starken Zelltodreaktion der putativen Mutante 303 (siehe 3.6.3) nicht zweifelsfrei erfolgen.

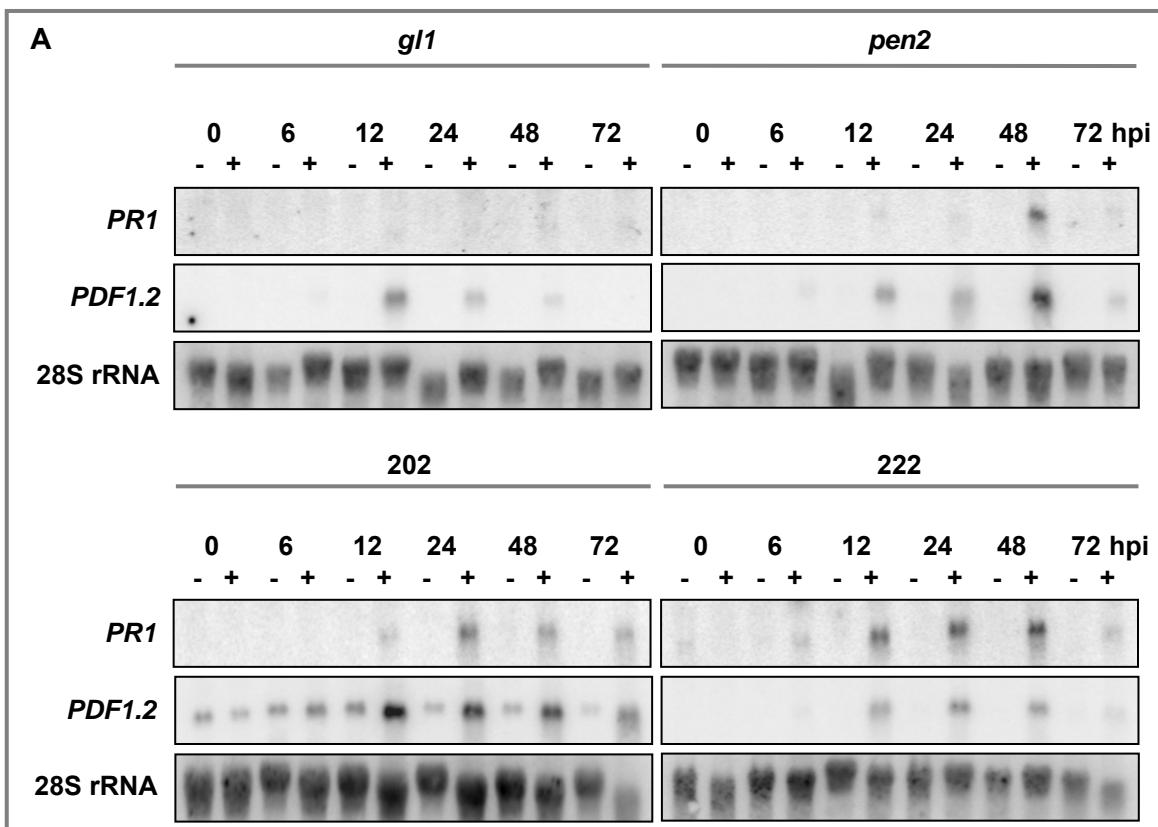
Zusammenfassend kann demnach davon ausgegangen werden, dass die Einführung von Sekundärmutationen im *pen2*-Hintergrund einerseits zu stärker ausgeprägten Abwehrreaktionen nach *P. infestans*-Infektion im Vergleich zu *pen2* führt, es jedoch nicht zu der erwarteten weiteren Differenzierung oder zu einem weiteren Vordringen des Oomyzeten kommt.

3.6.6 PR-Genexpression in putativen *Arabidopsis thaliana*-Mutanten nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Um eine Korrelation des im Vergleich zu *pen2* verstärkten HR-Phänotyps in den putativen Mutanten mit einer möglichen veränderten PR-Genexpression während der *P. infestans*-Infektion zu untersuchen, wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Nach Inkulation einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^5 / ml) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Blattmaterial der putativen Mutanten 202, 222, 242 und 272 geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und anschließend die Transkriptakkumulation der Abwehrgene *PR1* und *PDF1.2* analysiert. Die Untersuchung der PR-Genexpression in der putativen Mutante 222 (Abb. C-26 / A) und 272 (Abb. C-26 / B) nach *P. infestans*-Inokulation zeigt ein mit *pen2* weitgehend vergleichbares Expressionsmuster von *PR1* und *PDF1.2*. Ebenso zeigt die *PR1*-Transkriptakkumulation in der putativen Mutante 202 ein *pen2*-ähnliches Muster (Abb. C-26 / A). Im Vergleich zu anderen Experimenten ist die *PR1*-Genexpression in *pen2* in dem in Abb. C-26 (A) dargestellten Northern-Blot jedoch ungewöhnlich schwach induziert.

Die Untersuchung der *PDF1.2*-Transkriptakkumulation in der putativen Mutante 202 deutet im Gegensatz zu *pen2* auf eine konstitutive Expression von *PDF1.2* hin (Abb. C-26 / A). Die vergleichsweise starken Signale in den *P. infestans*-behandelten Proben zwischen 12 h und 72 h nach *P. infestans*-Infektion lassen jedoch annehmen, dass die Pathogen-Induzierbarkeit der *PDF1.2*-Genexpression in der putativen Mutante 202 aufrecht erhalten bleibt. Aufgrund der

konstitutiven *PDF1.2*-Genexpression, welche ebenso für die *A. thaliana*-Mutante *cev1-1* (CONSTITUTIVE EXPRESSION of VSP1-1; Ellis & Turner, 2001) beschrieben wurde, erfolgte eine Kopplungsanalyse mit dem *cev1-1*-gekoppelten SSLP (simple sequence length polymorphism)-Marker NGA225 in einer Kartierungspopulation der putativen Mutante 202 im Ler-Hintergrund. Die Analyse der DNA deutete nicht auf eine Kopplung von *cev1-1* und dem Locus 202 hin, so dass angenommen werden kann, dass es sich bei der Sekundärmutation 202 nicht um *cev1-1* handelt (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung der *PR1*-Genexpression der putativen Mutante 242 in zwei unabhängigen Experimenten zeigt, dass innerhalb der ersten 12 h nach *P. infestans*-Infektion sowohl in den H₂O- als auch in den *P. infestans*-behandelten Proben *PR1*-Transkripte akkumulieren (Abb. C-26 / B). In dem darauf folgenden Zeitraum (12 h - 72 h) kommt es dann wieder zu einem *pen2*-ähnlichen *PR1*-Genexpressionmuster (Abb. C-26 / B). Eine Ursache für diesen Phänotyp könnte die während der gesamten Inkubation anhaltende Substratnässe bzw. die hohe relative Luftfeuchtigkeit sein. Der potentielle Wasserstress könnte zu einer Inhibierung der konstitutiven *PR1*-Genexpression in der putativen Mutante 242 nach 12 h führen ohne jedoch einen Einfluss auf die Pathogen-induzierte *PR1*-Genexpression zu haben. Des Weiteren scheint die *PDF1.2*-Genexpression in der putativen Mutante 242 nach *P. infestans*-Infektion im Vergleich zu *pen2* schwächer induziert zu sein (Abb. C-26 / B). Um den möglichen Einfluss einer neben *pen2* und den Sekundärmutationen 202 bzw. 242 zusätzlich existierenden Mutation auf die *PR1*-Genexpression nach *P. infestans*-Infektion in den putativen Mutanten ausschließen zu können, müssten weitere Experimente mit entsprechenden rückgekreuzten Mutanten-Linien erfolgen, welche jedoch innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt worden.



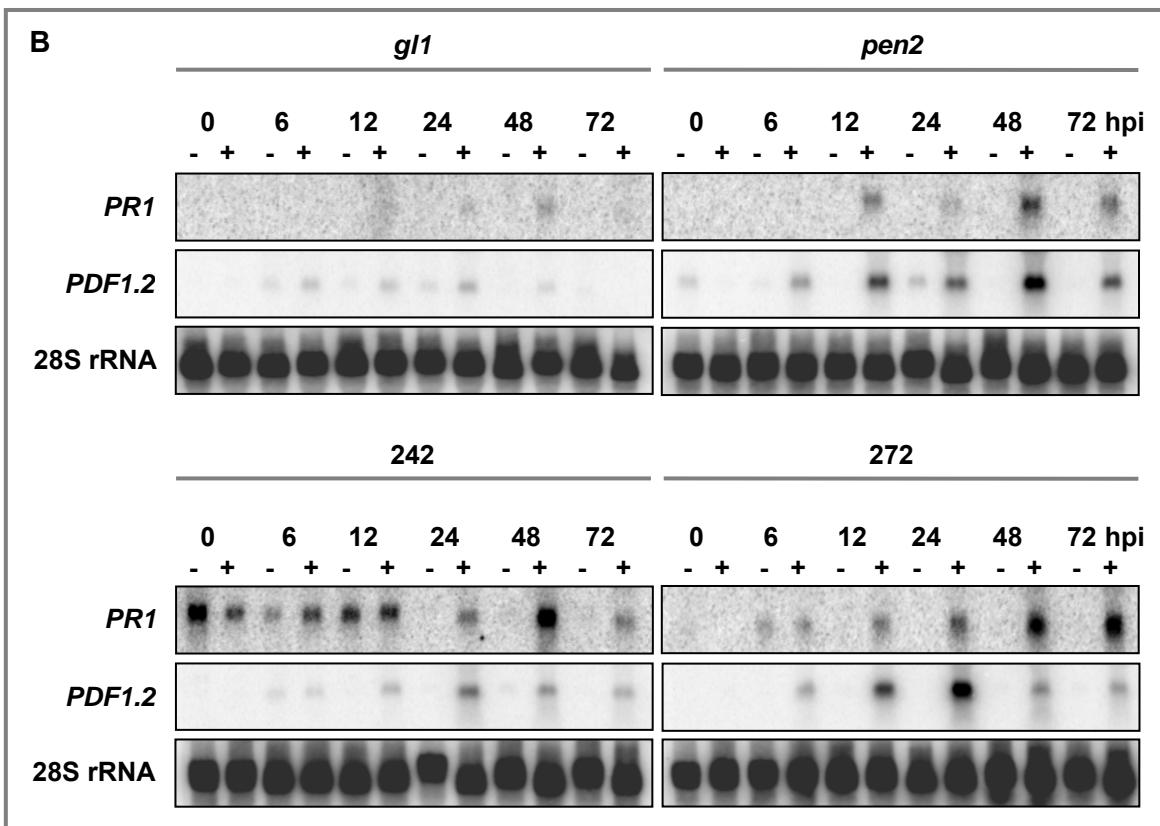


Abb. C-26: Northern-Blot-Analyse der PR-Genexpression in unterschiedlichen putativen *A. thaliana* Mutanten nach *P. infestans*-Inokulation. Gesamt-RNA wurde aus voll entwickelten Rosettenblättern von 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Inokulation (hpi) von H_2O [-] oder einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^5 / ml) [+] isoliert. Je 20 μg RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und anschließend mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde von *PR1* und *PDF1.2* hybridisiert. Zur Kontrolle der Beladung erfolgte eine Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde der 28S rRNA.

A: Autoradiogramme einer RNA-Hybridisierung der Gesamt-RNA, isoliert aus den putativen Mutanten 202 und 222 sowie aus *pen2* und *gl1* nach *P. infestans*-Inokulation.

B: Autoradiogramme einer RNA-Hybridisierung der Gesamt-RNA, isoliert aus den putativen Mutanten 242 und 272 sowie aus *pen2* und *gl1* nach *P. infestans*-Inokulation.

Die in A und B dargestellten Autoradiogramme repräsentieren jeweils eine von zwei Kinetiken mit vergleichbarem Ergebnis.

3.6.7 Kreuzungsanalysen der *Arabidopsis thaliana*-Mutanten 202 und 222

Alle im folgenden beschriebenen Kreuzungen und genetischen Analysen wurden mit den Mutanten 202 und 222 durchgeführt. Zur Kartierung der Sekundärmutationen 202 und 222, d. h. der Lokalisierung der Mutationen im *A. thaliana*-Genom erfolgte die Kreuzung der putativen Mutanten 202 und 222 mit dem *A. thaliana*-Ökotyp *Landsberg erecta*. Die erstellten Kartierungspopulationen wurden gleichzeitig zur Analyse der Abhängigkeit des stärkeren HR-Phänotyps von *pen2* verwendet.

3.6.7.1 Segregationsanalyse in den Kartierungspopulationen der putativen *Arabidopsis thaliana*-Mutanten 202 und 222

Die Konstitution der Genotypen der P-Generation (Mutante 202 bzw. 222 / Ler) und der nach Kreuzung dieser Eltern resultierenden F1-Generation sind in der Abb. C-27 / A dargestellt. Nach Selbstung der F1-Nachkommenschaft sind die durch zufällige Kombination der F1-Gameten entstandenen Genotypen der F2-Generation gezeigt (Abb. C-27 / B). Je nach Abhängigkeit des durch die Sekundärmutation 202 bzw. 222 verursachten stärkeren HR-Phänotyps von der Mutation *pen2* ist das zu erwartende Segregationsmuster des HR-Phänotyps dargestellt (Abb. C-27 / B).

Tab. C-5 zeigt die Analyse der in der F1- und F2-Generation einer Kreuzung der putativen Mutanten 202 und 222 mit dem *A. thaliana*-Ökotyp Ler beobachteten HR-Phänotypen nach *P. infestans*-Inokulation. Die untersuchten Pflanzen der F1-Nachkommenschaft reziproker Kreuzungen zeigten einen Wildtyp-ähnlichen HR-Phänotyp (im folgenden mit Wildtyp-HR bezeichnet). Bei einzelnen F1-Pflanzen wurde ein schwacher HR-Phänotyp beobachtet, welcher sich jedoch deutlich von der *pen2*-ähnlichen HR unterschied. Als Ursache dafür ist die vorhandene biologische und experimentelle Variabilität in der Ausprägung des HR-Phänotyps nach *P. infestans*-Infektion anzusehen.

Die *P. infestans*-Inokulation der F2-Generation der Mutanten 202 und 222 zeigte, dass neben der Bonitur der Wildtyp-HR eine eindeutige Bonitur der *pen2*-ähnlichen HR und der stärkeren HR im Einzelfall nicht möglich war. Aus diesem Grund wurden zur Analyse der Segregation des HR-Phänotyps alle Pflanzen mit einer *pen2*-ähnlichen HR und einer stärkeren HR zu einer Gruppe zusammengefasst und der Gruppe der Pflanzen mit Wildtyp-HR gegenüber gestellt (Tab. C-5; Abb. C-27 / B). Dennoch erfolgte in der Kartierungspopulation der Mutante 222 die Isolation einzelner F2-Pflanzen, denen ein im Vergleich zu *pen2* eindeutig verstärkter HR-Phänotyp zugeordnet werden konnte. Diese Pflanzen wurden zur Grobkartierung der Sekundärmutation 222 verwendet (siehe 3.6.7.2).

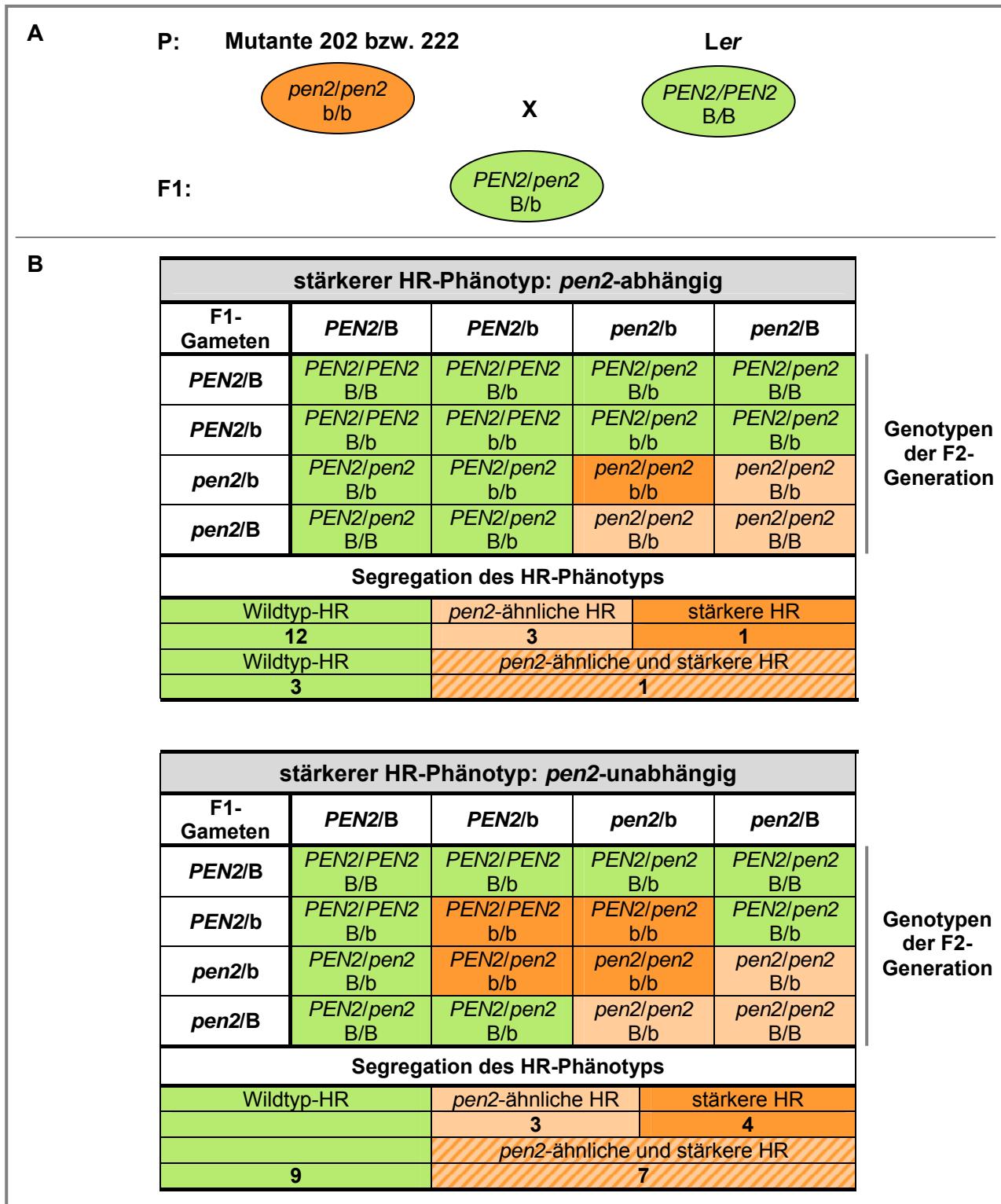


Abb. C-27: Schema der Kreuzung der *A. thaliana* Mutanten 202 und 222 mit dem *A. thaliana* Ökotyp Ler. Dargestellt ist die Konstitution der Genotypen der P- und der resultierenden F1-Generation (A) sowie der nach zufälliger Kombination der F1-Gameten zu erwartenden F2-Genotypen (B). Die in der F2-Nachkommenschaft zu erwartende Segregation der HR-Phänotypen ist für eine angenommene *pen2*-Abhängigkeit (B, oben) bzw. für eine *pen2*-Unabhängigkeit (B, unten) des stärkeren HR-Phänotyps gezeigt. Grün markierte Felder entsprechen einer Wildtyp-HR, hellorange markierte Felder entsprechen einer *pen2*-ähnlichen HR und orange markierte Felder entsprechen einer stärkeren HR.

(*pen2*: *PEN2* mutiert, *PEN2*: *PEN2* Wildtyp-Allel, b: Allel der Sekundärmutation 202 bzw. 222 mutiert, B: Wildtyp-Allel der Sekundärmutation 202 bzw. 222)

Um zu überprüfen, ob die experimentell ermittelten Daten zur Segregation des HR-Phänotyps den theoretisch zu erwartenden Verteilungen entsprechen, wurde die χ^2 -Methode verwendet. Dabei ist von einer, für eine rezessive Vererbung angenommene Segregation des HR-Phänotyps von 3:1 (*pen2*-abhängig) bzw. von 9:7 (*pen2*-unabhängig) für Pflanzen mit Wildtyp-HR zu Pflanzen mit stärkerer HR, d. h. Pflanzen, die mindestens eine *pen2*-ähnliche HR zeigen, ausgegangen worden (Abb. C-27 / B).

Nach *P. infestans*-Inokulation der Kartierungspopulation der Mutante 222 wurde die Segregation des HR-Phänotyps von 3:1 für Pflanzen mit einer Wildtyp-HR zu Pflanzen mit einer *pen2*-ähnlichen und stärkeren HR beobachtet, was darauf hindeutet, dass der im Vergleich zu *pen2* stärkere HR-Phänotyp in der Mutante 222 von einer Mutation in *PEN2* abhängig ist (Tab. C-5). Die Analyse des HR-Phänotyps in der F1- und F2-Nachkommenschaft der Kreuzung der Mutante 222 mit dem *A. thaliana*-Ökotyp Ler zeigt, dass die Mutation 222 durch ein einzelnes, zum Kerngenom gehörendes Gen vererbt wird.

In der Analyse des in der F1-Generation der reziproken Kreuzung der putativen Mutante 202 mit dem *A. thaliana*-Ökotyp Ler beobachteten HR-Phänotyps wurde ebenso eine Komplementation des Mutanten-Phänotyps nach *P. infestans*-Inokulation beobachtet, d. h. alle untersuchten F1-Pflanzen zeigten eine Wildtyp-HR (Daten nicht gezeigt). Daraus kann geschlossen werden, dass der HR-Phänotyp in der Mutante 202 ebenso kernkodiert vererbt wird.

Die Untersuchung der Segregation des HR-Phänotyps nach *P. infestans*-Infektion in der F2-Nachkommenschaft dieser Kreuzung zeigt, dass keine der aufgestellten Hypothesen (3:1 bzw. 9:7) bestätigt werden kann. Die beobachtete Anzahl von Pflanzen mit einer mindestens *pen2*-ähnlichen HR lag deutlich unter der für eine angenommene Aufspaltung von 3:1 oder 9:7 für Pflanzen mit Wildtyp-HR zu Pflanzen mit mindestens *pen2*-ähnlicher HR zu erwartenden Anzahl von Pflanzen (Tab. C-5). Die Segregationsanalyse des HR-Phänotyps in der Kartierungspopulation der Mutante 202 lässt daher keine Aussage über die Abhängigkeit des HR-Phänotyps von *pen2* ableiten. Ebenso kann nicht ausgeschlossen werden, dass der stärkere HR-Phänotyp der Mutante 202 durch zusätzlich zur Sekundärmutation 202 vorhandene Mutationen verursacht wird.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass der größte Teil der Pflanzen mit einem im Vergleich zu *pen2* stärkeren HR-Phänotyp nach *P. infestans*-Infektion auch den in Tab. C-4 beschriebenen morphologischen Phänotyp der Mutante 202 zeigt. Demnach scheint für den morphologischen Phänotyp der Mutante 202 eine weitere Mutation verantwortlich zu sein, die gekoppelt mit der Sekundärmutation 202 vererbt wird.

Es ist daher denkbar, dass es, bedingt durch eine Kopplung des morphologischen und des HR-Phänotyps in der Mutante 202, in der F2-Generation vermehrt zu Kleinwüchsigkeit von Pflanzen mit einer stärkeren HR kommt. Da während der Vereinzelung der 10 - 14 Tage alten Keimlinge der Kartierungspopulation kleinere oder jüngere Pflanzen weniger Berücksichtigung finden, könnte es

so zu einer Unterrepräsentierung von Pflanzen mit stärkerer HR in der F2-Nachkommenschaft mit den oben beschriebenen Folgen kommen.

Tab. C-5: Analyse des HR-Phänotyps nach *P. infestans*-Infektion in der F1- und F2-Nachkommenschaft der Kreuzung der *A. thaliana*-Mutanten 202 und 222 mit dem *A. thaliana*-Ökotyp Ler. Dargestellt ist der in der F1-Generation beobachtete HR-Phänotyp sowie die Segregation des HR-Phänotyps in der F2-Generation. Die beobachtete Anzahl von Pflanzen eines Phänotyps ist der für eine angenommene Aufspaltung des HR-Phänotyps von 3:1 bzw. 9:7 zu erwartenden Anzahl von Pflanzen gegenüber gestellt.

Segregation des HR-Phänotyps (Mutante 202)				
F1		F2		χ^2
N = 16		N = 1072	Wildtyp-HR ¹	
Wildtyp-HR ¹		Wildtyp-HR ¹	pen2-ähnliche und stärkere HR	
	16	beobachtet	872	200
		erwartet (3:1) ²	804	23,0 (P ≤ 0,05) ³
		erwartet (9:7) ²	603	274,3 (P ≤ 0,05) ³
Segregation des HR-Phänotyps (Mutante 222)				
F1		F2		
N = 23		N = 738	Wildtyp-HR ¹	χ^2
Wildtyp-HR ¹		Wildtyp-HR ¹	pen2-ähnliche und stärkere HR	
	23	beobachtet	545	193
		erwartet (3:1) ²	553,5	0,5 (P ≥ 0,05) ³
		erwartet (9:7) ²	415,1	93,0 (P ≤ 0,05) ³

¹⁾ Pflanzen mit dem Phänotyp Wildtyp-HR zeigten keine sichtbare HR oder in Einzelfällen eine schwache HR, welche sich deutlich von der pen2-ähnlichen HR unterschied.

²⁾ Die angenommene Segregation des HR-Phänotyps für Pflanzen mit Wildtyp-HR zu Pflanzen mit pen2-ähnlicher und stärkerer HR nach *P. infestans*-Infektion.

³⁾ Irrtumswahrscheinlichkeit (P) ermittelt für einen Freiheitsgrad ($f = 1$)

3.6.7.2 Grobkartierung der Sekundärmutation 222

Zur groben Kartierung der Sekundärmutation 222 erfolgte die Selektion von Pflanzen aus der F2-Nachkommenschaft von Kreuzungen der Mutante 222 mit dem *A. thaliana* Ökotyp Ler mit einer im Vergleich zu pen2 stärkeren HR nach *P. infestans*-Infektion, d. h. von Mutanten in denen die Sekundärmutation 222 putativ homozygot vorlag (siehe 3.6.7.1). Die Analyse des HR-Phänotyps in der F2-Generation zeigte, dass hinsichtlich der stärkeren Nekrotisierung größere Variabilitäten zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt). Um den in den selektierten F2-Pflanzen beobachteten HR-Phänotyp zu bestätigen, wurde die F3-Generation dieser Pflanzen erneut mit *P. infestans* inkuliert. Für 21 Linien konnte dabei der HR-Phänotyp nach Auswertung eines Experiments

bestätigt werden. Diese bestätigten Linien wurden zur Grobkartierung der Sekundärmutation verwendet. In einem weiteren Experiment sind jedoch Schwankungen in der Ausprägung des HR-Phänotyps einzelner Linien beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt). Da diese Linien jedoch in einem Experiment den stärkeren HR-Phänotyp zeigten, wurde angenommen, dass die Sekundärmutation 222 homozygot vorlag bzw. dass die in einem Experiment beobachtete Schwankung in der Ausprägung des HR-Phänotyps auf die vorhandene biologische und experimentelle Variabilität zurückzuführen ist.

Die PCR-basierte Genotypisierung der selektierten Linien mit *pen2*-spezifischen Oligonukleotiden zeigte, dass alle untersuchten Linien für die Mutation *pen2* homozygot sind und bestätigt daher die *pen2*-Abhängigkeit des stärkeren HR-Phänotyps der Mutante 222 (Daten nicht gezeigt, Tab. C-5). Um den Ort der Mutation 222 relativ zur Position bereits bekannter Marker zu kartieren, wurde die Analyse der Segregation unterschiedlicher SSLP-Marker in den bestätigten Linien durchgeführt (Tab. C-6). Je nach der Verfügbarkeit der DNA, erfolgte diese Untersuchung mit 9 - 21 Linien. Die dabei ermittelte Rekombinationsfrequenz von 31 – 38 % zwischen dem Ort der Sekundärmutation 222 und den Loci, die mit den untersuchten SSLP-Markern des Chromosoms 3 assoziieren, liefert erste Hinweise darauf, dass die Sekundärmutation 222 auf Chromosom 3 lokalisiert ist (Tab. C-6). Die ermittelte Rekombinationsfrequenz zwischen den untersuchten Loci auf den Chromosomen 1, 2, 4 und 5 und dem Ort der Mutation 222 betrug im Gegensatz dazu mindestens 45 % was darauf hindeutet, dass keine Kopplung der entsprechenden Marker und der Sekundärmutation 222 vorhanden ist (Tab. C-6). Eine Ausnahme stellt der mit dem SSLP-Marker NGA8 assoziierte Lokus auf dem oberen Arm von Chromosom 4 dar. Die Rekombinationsfrequenz zwischen diesem Lokus und dem Ort der Sekundärmutation 222 liegt in einem Bereich von 42 - 58 %. Dieser Bereich ergibt sich daraus, dass die Analyse der Segregation des SSLP-Markers NGA8 in einigen Linien eine Unterscheidung der heterozygoten Konstitution (Col-0/Ler), die einer Rekombinationsfrequenz von 42 % entspricht, von der homozygoten Konstitution (Ler/Ler), die einer Rekombinationsfrequenz von 58 % entspricht, nicht eindeutig erlaubte (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren zeigt die Kopplungsanalyse, dass in keiner der untersuchten Linien ein Rekombinationseignis an dem mit dem *pen2*-gekoppelten SSLP-Marker BIO2 assoziierten Lokus auf Chromosom 2 stattfindet. Alle untersuchten Linien sind daher an diesem Ort homozygot für Col-0. Als möglicher Ort der Sekundärmutation 222 kann der untere Arm des Chromosoms 2 jedoch ausgeschlossen werden, da eine Kopplung der Sekundärmutation 222 und *pen2* zu einer Aufspaltung des HR-Phänotyps in der Kartierungspopulation von Pflanzen mit Wildtyp-HR zu Pflanzen mit einer stärkeren HR im Verhältnis 3:1 führen würde. Es wären demnach bei einer Kopplung beider Mutationen keine oder nur wenige Pflanzen mit *pen2*-ähnlicher HR bzw. überwiegend Pflanzen mit stärkerer HR in der Gruppe der Pflanzen mit *pen2*-ähnlicher und stärkerer HR zu erwarten. Obwohl die Gruppe der Pflanzen mit stärkerer HR zur Analyse der *pen2*-Abhängigkeit des stärkeren HR-Phänotyps nicht getrennt betrachtet wurde (siehe 3.6.7.1;

Tab. C-6), ist ein solches Segregationsmuster in der Kartierungspopulation nicht beobachtet worden (Daten nicht gezeigt).

Tab. C-6: Grobkartierung der Sekundärmutation 222. Dargestellt ist das Ergebnis der SSLP-Marker-basierten Grobkartierung der Sekundärmutation 222. Die Analyse erfolgte mit 9 - 21 putativ homozygoten mutanten Linien aus der F2-Nachkommenschaft mehrerer, unabhängiger Kreuzungen der Mutante 222 mit dem *A. thaliana* Ökotyp Ler. Die Rekombinationsfrequenz stellt die Häufigkeit mit der ein Rekombinationsereignis zwischen zwei Loci auftritt dar und wurde für unterschiedliche Loci bezogen auf den Ort der Mutation 222 ermittelt.

Chromosom	SSLP-Marker	Position (Mbp)	Allele (gesamt)	Allele (Col-0)	Allele (Ler)	Rekombinationsfrequenz (%)
1	EAT1	1,4	20	6	14	70 %
1	NGA248	9,9	18	7	11	61 %
1	NGA280	20,9	22	11	11	50 %
1	ATPASE	28,5	20	11	9	45 %
2	PLS6	9,3	20	7	13	65 %
2	BIO2	18,0	20	20	0	0 %
3	NGA162	4,6	40	25	15	37 %
3	T6H20	16,0	42	29	13	31 %
3	F24M12TGF	19,1	42	27	15	36 %
4	NGA8	5,6	26	15/11	11/15	42-58 %
4	CIW7	11,5	20	7	13	65 %
4	NGA1139	16,4	22	9	13	59 %
5	NGA225	1,5	20	9	11	55 %
5	NGA139	8,4	20	10	10	50 %
5	CIW9	17,1	20	9	11	55 %
5	CIW10	24,5	18	5	13	72 %

Die Analyse der Segregation weiterer SSLP-Marker des Chromosoms 3 in den bestätigten mutanten Linien zeigt, dass die stärkste Kopplung im Bereich des unteren Arms von Chromosom 3 erfolgt (Tab. C-7). Die dabei ermittelte geringste Rekombinationsfrequenz beträgt 23,8 % (SSLP-Marker CIW4). Die festgestellte Häufigkeit für Rekombinationsereignisse in dieser Region wird auf 11,1 % reduziert, wenn zur Analyse der Rekombinationsfrequenz die Linien, die in einem zweiten Experiment einen nicht eindeutig verstärkten HR-Phänotyp (Linien 40, 83 und 108; Tab. C-7) zeigten und daher möglicherweise nicht homozygot für die Sekundärmutation 222 sind, nicht einbezogen werden (Daten nicht gezeigt). Es ist demnach anzunehmen, dass die Sekundärmutation 222 auf dem Chromosom 3 lokalisiert ist, wobei die stärkere Kopplung des SSLP-Markers CIW4 einen Hinweis dafür liefert, dass die Sekundärmutation 222 auf dem unteren Arm von Chromosom 3 lokalisiert ist.

Es ist jedoch auffallend, dass die Linien 13, 42 und 105 in der Region des SSLP-Markers CIW4 nicht homozygot für Col-0 sind, obwohl der in einem Experiment bestätigte stärkere HR-Phänotyp auf eine homozygote Konstitution in der Nähe der Sekundärmutation 222 schließen lässt. Es ist ebenso darauf hinzuweisen, dass scheinbar in einigen Linien ungewöhnlich viele Rekombinationsereignisse stattfinden, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass es sich hierbei um Regionen mit erhöhter Rekombinationsfrequenz handelt (Tab. C-7). Zur Untersuchung eines solchen Zusammenhangs bzw. um eine Fehlinterpretation des HR-Phänotyps auszuschließen, ist

jedoch die nochmalige Absicherung der beobachteten HR-Phänotypen sowie die Analyse weiterer Linien notwendig.

Tab. C-7: Grobkartierung der Sekundärmutation 222. Dargestellt ist das Ergebnis der Segregationsanalyse von unterschiedlichen SSLP-Markern des Chromosoms 3. Die Analyse erfolgte mit 9 - 21 putativ homozygoten mutanten Linien aus der F2-Nachkommenschaft von mehreren, unabhängigen Kreuzungen der Mutante 222 mit dem *A. thaliana* Ökotyp Ler, deren HR-Phänotyp in einem Experiment bestätigt wurde (der HR-Phänotyp der Linien 40, 83 und 108 war in einem zweiten Experiment nicht eindeutig verstärkt).

Linie	SSLP-Marker Chromosom 3										
	NGA 172	NGA 162	NT204	CIW11	GAP AB	T6H20	F1P2 TGF	SORB O34	CIW4	F24M1 2TGF	NGA6
	Position (Mbp)										
	0,8	4,6	5,6	9,8	10,3	16,0	17,5	18,2	18,9	19,6	23,0
5	CL	CL	CL	CL	CC	CL	CL	CL	CC	CL	n.e.
8	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CL	CL
13	CL	CC	CC	CC	CC	CL	CL	CL	CL	CL	LL
39	CL	CL	CL	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CL
41	LL	CL	CL	CC	CC	CL	CC	CC	CC	CC	CC
42	CL	CL	CC	CL	CL	CC	CL	CL	LL	LL	LL
70	LL	LL	CL	CL	CL	CC	CC	CC	CC	CC	CC
72	CL	CL	CL	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CL
77	LL	CL	CL	CL	CL	CC	CC	CC	CC	CC	CL
83	CL	CL	CL	CL	CL	CL	LL	LL	LL	LL	LL
100	LL	CC	CC	LL	LL	LL	LL	LL	CC	CL	n.e.
105	CC	CC	CC	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	n.e.
142	CC	CL	LL	LL	CL	CL	CL	CL	CC	CL	n.e.
25	n.e.	CC	CC	CL	CL	CL	CL	CL	CC	CC	n.e.
27	n.e.	LL	LL	LL	LL	CC	CC	CC	CC	CC	n.e.
40	n.e.	CL	LL	LL	CL	CL	LL	LL	LL	LL	n.e.
63	n.e.	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	n.e.
75	n.e.	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CC	CL	n.e.
102	n.e.	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	n.e.
108	n.e.	CL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	n.e.
112	n.e.	n.e.	LL	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	n.e.
	54	37,5	42,8	42,8	35,7	30,9	35,7	35,7	23,8	35,7	50,0
	Rekombinationsfrequenz (%)										
	n.e. (nicht ermittelt)										

3.6.7.3 HR-Phänotyp der Doppelmutante 202 / 222 im *pen2*-Hintergrund nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Um einerseits einen möglichen additiven Effekt der Doppelmutation 202 / 222 im *pen2*-Hintergrund auf die Resistenz gegen *P. infestans* und andererseits einen Allelismus der Mutationen 202 und 222 zu untersuchen, erfolgte die Kreuzung der Mutanten 202 und 222. Alle untersuchten Pflanzen der F1-Nachkommenschaft zeigten nach *P. infestans*-Inokulation eine *pen2*-ähnliche HR (Tab. C-8). Die Komplementation des im Vergleich zu *pen2* stärkeren HR-Phänotyps der Mutanten 202 und 222 in der F1-Generation deutet darauf hin, dass die Mutationen 202 und 222 in unterschiedlichen Genen lokalisiert sind. Des Weiteren ist daraus abzuleiten, dass sowohl die Sekundärmutationen

202 als auch 222 rezessiv vererbt werden, da die in der F1-Generation vorliegende heterozygote Konstitution beider Mutationen im homozygoten *pen2*-Hintergrund nicht zu einem stärkeren HR-Phänotyp führt. Nach *P. infestans*-Inokulation der F2-Nachkommenschaft wurde die beobachtete Segregation der *pen2*-ähnlichen HR und der stärkeren HR mittels χ^2 -Methode überprüft (Tab. C-8). Für eine dihybride Kreuzung mit rezessiver Ausprägung der mutanten Allele wurde eine Aufspaltung von 9:7 für Pflanzen mit einer *pen2*-ähnlichen HR zu Pflanzen mit einer stärkeren HR erwartet. Die in der F2-Generation ermittelte Anzahl von Pflanzen beider Phänotypen entsprach dabei nicht der für eine Segregation von 9:7 zu erwartenden Anzahl von Pflanzen (Tab. C-8). Es ist jedoch auch hier zu erwarten, dass Pflanzen, die homozygot für die Mutation 202 sind in der untersuchten Population unterrepräsentiert sind und daher möglicherweise das Aufspaltungsmuster verändern (siehe 3.6.7.1). Des Weiteren ist anzunehmen, dass aufgrund der schwachen Verstärkung des HR-Phänotyps in Pflanzen, die homozygot für die Mutation 222 sind, nicht der Gruppe der Pflanzen mit stärkerer HR sondern der Gruppe der Pflanzen mit *pen2*-ähnlicher HR zugeordnet wurden. Eine solche falsche Zuordnung der HR-Phänotyps könnte jedoch auch aufgrund der verwendeten mittleren *P. infestans*-Sporenkonzentration (1×10^5 / ml) erfolgt sein. Pflanzen mit einem eindeutig davon abweichenden Phänotyp wurden nicht beobachtet, so dass angenommen werden kann, dass die Kombination der Mutationen 202 und 222 im *pen2*-Hintergrund zu keiner im Vergleich zur Mutante 202 oder 222 weiteren Verstärkung des HR-Phänotyps nach *P. infestans*-Infektion führt.

Tab. C-8: Analyse des HR-Phänotyps nach *P. infestans*-Infektion in der F1- und F2-Nachkommenschaft der Kreuzung der *A. thaliana*-Mutante 202 mit der *A. thaliana*-Mutante 222. Dargestellt ist die beobachtete Anzahl der Pflanzen mit *pen2*-ähnlicher HR sowie die beobachtete Anzahl der Pflanzen mit stärkerer HR, wobei die für eine angenommene Aufspaltung des HR-Phänotyps von 9:7 zu erwartende Anzahl von Pflanzen gegenüber gestellt ist.

Segregation des HR-Phänotyps (Doppelmutante 202 / 222)				
F1	F2			
N = 18	N = 538			χ^2
<i>pen2</i> -ähnliche HR		<i>pen2</i> -ähnliche HR	stärkere HR	
18	beobachtet	357	180	
	erwartet (9:7) ¹	302,6	235,4	22,8 (P ≤ 0,05) ²

¹⁾ angenommene Segregation des HR-Phänotyps für Pflanzen mit *pen2*-ähnlicher HR zu Pflanzen mit stärkerer HR nach *P. infestans*-Infektion

²⁾ Irrtumswahrscheinlichkeit (P) ermittelt für einen Freiheitsgrad (f = 1)

3.6.8 Untersuchung der Resistenz der putativen Mutanten gegen unterschiedliche nekrotrophe Phytopathogene

3.6.8.1 Analyse der Interaktion mit *Alternaria brassicicola*

Die Beurteilung des Resistenzstatus erfolgte durch Beobachtung der makroskopisch sichtbaren Reaktionen 5 Tage nach der Infektion sowie durch lichtmikroskopische Analyse nach Trypan-Blau-Färbung von *A. brassicicola*-infizierten Blättern (Abb. C-28).

Zur Untersuchung der Interaktion mit dem nekrotrophen Pathogen *A. brassicicola* erfolgte die Inokulation von Blättern mit 10 µl einer *A. brassicicola*-Sporensuspension (5×10^5 / ml). Nach *A. brassicicola*-Inokulation wurden auf infizierten Blättern von *gl1* und *pen2* keine Nekrotisierungen oder Krankheitssymptome beobachtet werden (Abb. C-28/ A-B). Bei den in Abb. C-28 (A-B) sichtbaren dunkleren Bereichen innerhalb der Infektionsstellen handelt es sich um nicht gekeimte Sporen des *A. brassicicola*-Inokulums. Die Inokulation der putativen Mutanten 242 und 272 führte jedoch 5 Tage nach *A. brassicicola*-Infektion zu einer starken Nekrosebildung sowie zur Chlorose in den infizierten Blättern (Abb. C-28 / G-H). Dabei war zu beobachten, dass die reagierenden Blattbereiche sich über die Primärinfektionsstelle hinaus ausweiteten (Abb. C-28 / G-H). Weiterhin wurde gezeigt, dass Blätter der Mutante 202 und der putativen Mutante 303 nach *A. brassicicola*-Inokulation im Gegensatz zu *pen2* mit einer HR reagieren (Abb. C-28 / C, I). Die Nekrosen der Mutante 202, die bereits 3 Tage nach *A. brassicicola*-Inokulation zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt) sind jedoch schwächer ausgeprägt als die Nekrosen in der putativen Mutante 303 (Abb. C-28 / C, I). Die Phänotypen weiterer untersuchter putativer Mutanten nach *A. brassicicola*-Infektion sind in Tab. C-9 dargestellt.

Die lichtmikroskopische Analyse des infizierten und mit Trypan-Blau gefärbten Blattmaterials zeigt, dass in *pen2* und *gl1* nahezu keine hypersensitiv reagierenden Zellen, als Reaktion auf das eindringende Pathogen, zu beobachten sind (Abb. C-28 / D-E). Einzelne *A. brassicicola*-Sporen sind jedoch in der Lage zu keimen und kurze nichtinvasive Hyphen zu entwickeln (Abb. C-28 / D-E). Es ist demnach davon auszugehen, dass die Ausprägung der Resistenz in *A. thaliana* gegen *A. brassicicola* unabhängig von *PEN2* ist.

Im Gegensatz dazu wurde durch die lichtmikroskopische Analyse von infiziertem Blattmaterial der putativen Mutanten 242 und 272 ein stark verzweigtes sekundäres Hyphenwachstum von *A. brassicicola* beobachtet (Abb. C-28 / K-L). Die Abb. C-28 (K-L) verdeutlicht außerdem die interzelluläre Ausbreitung der *A. brassicicola*-Hyphen über die Primärinfektionsstelle hinaus. Nach einer Inkubation von 11 Tagen wurde in infiziertem Blattmaterial der putativen Mutanten 242 und 272 die Sporulation von *A. brassicicola* beobachtet, was auf den Verlust der Resistenz gegen *A. brassicicola* hindeutet (Abb. C-28 / N-O).

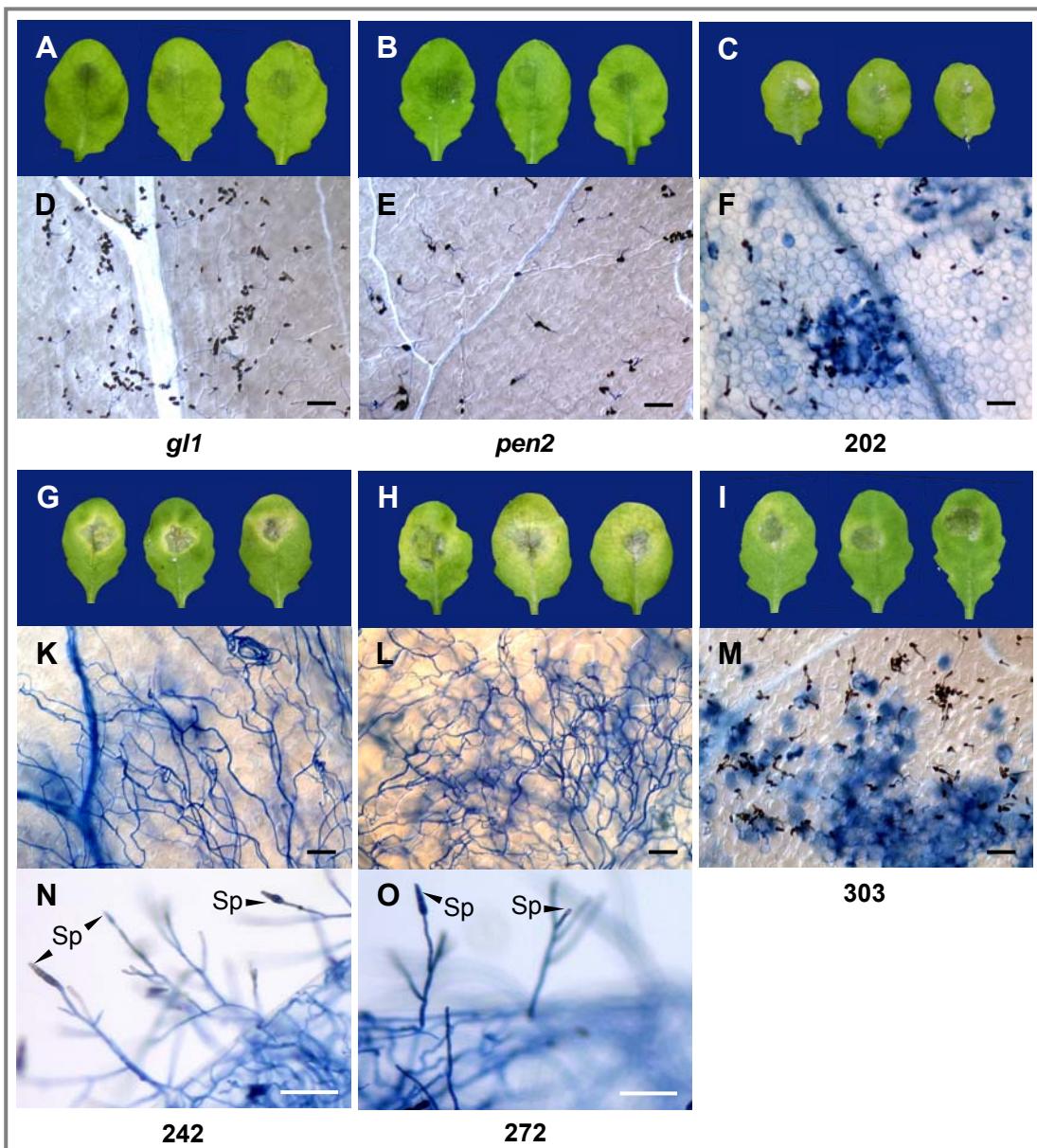


Abb. C-28: Veränderte Resistenz gegen *A. brassicicola* MUCL20297 in unterschiedlichen putativen *A. thaliana* Mutanten. Voll entwickelte Rosettenblätter von ca. 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden mit 10 µl einer *A. brassicicola*-Sporensuspension (5×10^5 / ml) inkuliert und 5 (A-M) oder 11 Tage (N-O) bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die lichtmikroskopische Analyse erfolgte nach Färbung von infiziertem Blattmaterial mit Trypan-Blau. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Blätter bzw. typische Infektionsorte.

A-C / G-I: infizierte Blätter von *gl1* (A), *pen2* (B) und den putativen Mutanten 202 (C), 242 (G), 272 (H) sowie 303 (I) nach *A. brassicicola*-Infektion

D-F / K-M: Übersichtsaufnahmen von infiziertem Blattgewebe in *gl1* (D), *pen2* (E) und den putativen Mutanten 202 (F), 242 (K), 272 (L) sowie 303 (M) nach Trypan-Blau-Färbung (DIC-Mikroskopie)

N-O: Detailaufnahmen von infiziertem Blattgewebe der putativen Mutanten 242 (N) und 272 (O) nach Trypan-Blau-Färbung (DIC-Mikroskopie) Sp, Spore (Maßstab: 100 µm)

Aufgrund der Tatsache, dass die putativen Mutanten 242 und 272 eine veränderte Resistenz gegen zwei phylogenetisch entfernte Pathogene zeigen, ist es denkbar, dass die mit den

Sekundärmutationen 242 und 272 korrespondierenden Gene für generelle Faktoren in der Pathogenresistenz in *A. thaliana* kodieren.

Die lichtmikroskopische Analyse von infiziertem Blattmaterial der Mutante 202 und der putativen Mutante 303 zeigt, dass es an den meisten Interaktionsorten zu einem hypersensitiven Zelltod als Reaktion auf das eindringende Pathogen kommt (Abb. C-28 / F, M). Der Zelltod in der Mutante 202 scheint jedoch, im Gegensatz zur putativen Mutante 303, auf kleinere Zellgruppierungen beschränkt zu sein (Abb. C-28 / F). Ein weiteres Hyphenwachstum oder Sporulation von *A. brassicicola* wurde in der Mutante 202 und der putativen Mutante 303 nicht beobachtet.

Tab. C-9: Untersuchung der Abwehrreaktionen unterschiedlicher putativer *A. thaliana* Mutanten nach Infektion mit den nekrotrophen Pathogenen *A. brassicicola* und *B. cinerea*. Dargestellt ist eine Übersicht der nach Infektion mit *A. brassicicola* bzw. *B. cinerea* beobachteten Phänotypen.

Referenz	<i>A. brassicicola</i>	<i>B. cinerea</i>
<i>gl1</i>	keine HR	HR
<i>pen2</i>	keine HR	HR
putative Mutante		
190	HR + Chlorose	HR
202	schwache HR ¹	schwache HR ²
222	keine HR	Läsionen + Chlorose
242	sek. Hyphenwachstum / Sporulation	HR
266	keine HR	HR
272	sek. Hyphenwachstum / Sporulation	Läsionen + Chlorose
303	HR + Chlorose	Läsionen + Chlorose

¹⁾ HR ist deutlich schwächer ausgeprägt als in den putativen Mutanten 190 und 303 und ist bereits 3 Tage nach der Infektion zu beobachten.

²⁾ HR ist deutlich schwächer ausgeprägt als in *pen2* und den putativen Mutanten 190, 242 und 266

3.6.8.2 Analyse der Interaktion mit *Botrytis cinerea*

Um die Resistenz der unterschiedlichen putativen Mutanten gegen *B. cinerea*, einem nekrotrophen Phytopathogen mit breitem Wirtsspektrum zu untersuchen, erfolgte die Inokulation von Blättern mit einer *B. cinerea*-Konidiosporensuspension (5×10^5 / ml). Nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit wurde der Resistenzstatus durch Beobachtung der Nekrotisierung bzw. der Krankheitssymptome infizierter Blätter beurteilt.

Die nach *B. cinerea*-Infektion in Blättern von *gl1* und *pen2* beobachteten Nekrosen waren in beiden Genotypen vergleichbar (Abb. C-29 / A-B). Demnach scheint die Ausprägung der Resistenz von *A. thaliana* gegen *B. cinerea* unabhängig von *PEN2* zu sein.

Im Gegensatz dazu waren die Nekrosen in infizierten Blättern der Mutante 202 schwächer ausgeprägt (Abb. C-29 / C). Die für diese Mutante beschriebene konstitutive *PDF1.2*-Genexpression (siehe 3.6.6) korreliert daher mit einer reduzierten Nekrotisierung, d. h. mit einer erhöhten Resistenz nach *B. cinerea*-Infektion.

Aus Abb. C-29 (D-F) geht außerdem hervor, dass die *B. cinerea*-Infektion von Blättern der Mutante 222 und der putativen Mutanten 272 und 303 im Gegensatz zu *pen2* zu einer deutlichen Verstärkung der Nekrosen bis hin zu wässrigen Läsionen mit chlorotischen Randbereichen führt. Des Weiteren ist eine Ausbreitung der Läsionen über den Bereich der Primärinfektion hinaus zu beobachten (Abb. C-29 / D-F). 10 Tage nach der *B. cinerea*-Infektion sind die inkulierten Blätter der Mutante 222 und der putativen Mutanten 272 und 303 weitgehend abgestorben (Daten nicht gezeigt). Die Phänotypen weiterer untersuchter, putativer Mutanten nach *B. cinerea*-Infektion sind in Tab. C-9 dargestellt. Nach Untersuchung der Resistenz der putativen Mutanten sowie der Mutanten 202 und 222 gegen *A. brassicicola* und *B. cinerea* kann aufgrund der beobachteten Phänotypen angenommen werden, dass es sich bei allen Sekundärmutationen um Mutationen unterschiedlicher Gene handelt.

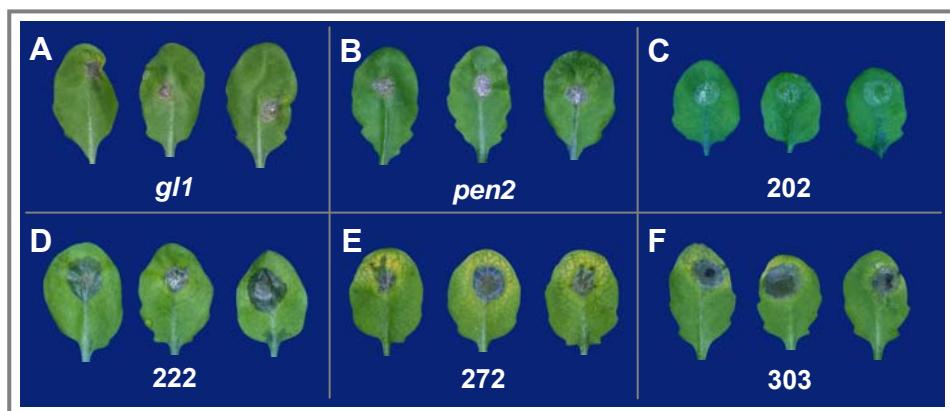


Abb. C-29: Veränderte Resistenz gegen *B. cinerea* in unterschiedlichen putativen *A. thaliana* Mutanten. Voll entwickelte Rosettenblätter von ca. 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden mit 10 µl einer *B. cinerea*-Sporensuspension (5×10^5 / ml) inkuliert und 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Blätter.
A-F: infizierte Blätter von *g1* (A), *pen2* (B) sowie den putativen Mutanten 202 (C), 222 (D), 272 (E) und 303 (F) 3 Tage nach *B. cinerea*-Infektion

D Diskussion

1 Charakterisierung des Nichtwirts-Pathosystems *Arabidopsis thaliana-Phytophthora infestans*

Eine Mutation in *PEN2* führt zu erhöhter Penetrations-Häufigkeit sowie zu potenzierten Abwehrreaktionen nach *P. infestans*-Infektion.

Der hypersensitive Zelltod, als eine Komponente der HR, ist eine häufig beobachtete Abwehrreaktion in der Pflanze-Pathogen-Interaktion, welche an der Ausprägung der Resistenz sowohl in Wirts-Pathosystemen als auch in Nichtwirts-Pathosystemen beteiligt ist (Staskawicz *et al.*, 1995; Dangl *et al.*, 1996; Kamoun *et al.*, 1999; Vleeshouwers *et al.*, 2000; Heath, 2000). Es wird grundsätzlich angenommen, dass die Zelltod-Reaktion eine effektive Abwehr gegen biotrophe Phytopathogene darstellt (McDowell & Dangl, 2000; Glazebrook, 2005; Oliver & Ipcho, 2004). Im Gegensatz dazu scheint der Zelltod jedoch für nekrotrophe Pathogene ein Virulenzfaktor zu sein, welcher notwendig ist um anfällige Pflanzen zu besiedeln (Thomma *et al.*, 2001).

Die zytologische Analyse *P. infestans*-infizierter und Trypan-Blau-gefärbter Blätter in *gl1* zeigte, dass es an den meisten Interaktionsorten zu einem effektiven Abstoppen der eindringenden Hyphen ohne Beteiligung einer HR kommt (Abb. C-6). Nur in Einzelfällen reagieren infizierte Epidermiszellen in *gl1* mit einer HR bzw. mit hypersensitivem Zelltod. Die makroskopische Analyse infizierter Blätter von *gl1* deutet ebenso auf eine Resistenzausprägung ohne maßgebliche Beteiligung einer HR hin (Abb. C-1). Demnach scheint die hypersensitive Reaktion für die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in der Interaktion mit *P. infestans* eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu wird in Huitema *et al.* (2003; 2004) und Kamoun (2001) für das Pathosystem *A. thaliana* – *P. infestans* die HR infizierter Epidermiszellen als typische Abwehrreaktion beschrieben. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass in den Arbeiten von Huitema *et al.* im Unterschied zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten *P. infestans*-Isolat CRA208 das wahrscheinlich virulentere Isolat 90128 verwendet wurde.

Den Untersuchungen von Huitema *et al.* (2003; 2004) und Kamoun (2001) entsprechend erfolgte in dem von Mysore & Ryu (2004) vorgeschlagenen Modell zur Klassifizierung der Nichtwirtsresistenz eine Zuordnung dieses Pathosystems zum Typ II, d. h. zu Nichtwirts-Interaktionen, die durch eine sichtbare HR (Nekrose) gekennzeichnet sind. Die Nichtwirts-Interaktionen, welche ohne sichtbare Symptome verlaufen werden danach dem Typ I zugeordnet.

Eine klare Einstufung des Pathosystems *A. thaliana* – *P. infestans* in einen der Nichtwirtsresistenz-Typen I und II erscheint jedoch schwierig, da die Ausprägung des Nichtwirtsresistenz-Phänotyps beispielsweise von der Virulenz des verwendeten *P. infestans*-Isolats oder von dem untersuchten *A. thaliana*-Ökotyp abhängig sein kann. So zeigte die Analyse *P. infestans*-infizierter Blätter des *A. thaliana* Ökotyps Landsberg erecta sichtbare Nekrosierungen der infizierten Blätter, die jedoch

nicht in infizierten Blättern des Ökotyps Columbia nachzuweisen waren (Daten nicht gezeigt). Ebenso ist anzunehmen, dass unterschiedliche Infektionsbedingungen einen Einfluss auf die Ausprägung des Infektions-Phänotyps haben können. Beispielsweise ist unter Nutzung hoher *P. infestans*-Inokulum-Dichten auch in *gl1* eine sichtbare schwache HR induzierbar (Daten nicht gezeigt).

Durch mikroskopische und makroskopische Untersuchung der Zelltod-Reaktionen bzw. der Nekrosierungen in infizierten Blättern von *pen2* wurde eine Beteiligung der HR an den Abwehrreaktionen von *A. thaliana* gegen *P. infestans* gezeigt. Obwohl in einzelnen infizierten Epidermiszellen in *pen2* trotz erfolgreicher Penetration keine Zelltod-Reaktion beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass die erhöhte Penetrations-Häufigkeit von *P. infestans* mit der Potenzierung des hypersensitiven Zelltods in *pen2* korreliert.

Die Tatsache, dass die Resistenzausprägung in infizierten Blättern von *gl1* in Abwesenheit der HR erfolgt, führt zu der Annahme, dass hauptsächlich präformierte Barrieren sowie HR-unabhängige induzierbare Abwehrmechanismen eine Besiedlung von *A. thaliana* durch *P. infestans* effektiv verhindern können. In Übereinstimmung damit deutete die zytologische Analyse infizierter Blätter von *gl1* auf eine Reihe von induzierten Abwehrreaktionen, wie beispielsweise Zellwandaufklagerungen (Papillen) sowie eine nachweisbare Akkumulation von autofluoreszierenden Komponenten, H₂O₂ und Kallose an den Orten der versuchten Penetration hin (Abb. C-6; Abb. C-8 - C-10).

Die Bildung struktureller Barrieren, wie Zellwandaufklagerungen, ist als eine wesentliche Ebene in der Resistenzausprägung gegen phytopathogene Pilze beschrieben worden (Aist & Bushnell, 1991, Thordal-Christensen *et al.*, 2000; Zeyen *et al.*, 2002). So bilden Papillen als lokale Zellwandaufklagerungen die Grundlage der basalen Penetrationsresistenz bzw. der Nichtwirtsresistenz gegen Mehltau-Pilze in Gerste bzw. *Arabidopsis* (Collins *et al.*, 2003; Schulze-Lefert, 2004). Durch Identifizierung der funktionell homologen Syntaxine PEN1 in *Arabidopsis* und ROR2 in Gerste, welche in Pathogen-induzierten Membranfusionsprozessen involviert sind, wurde gezeigt, dass ein prinzipiell ähnlicher Mechanismus an der Ausprägung von sowohl Penetrationsresistenz als auch Nichtwirtsresistenz gegen Gerstemehltau beteiligt ist (Freialdenhoven *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 2003).

Die zytologischen Untersuchungen der Interaktion *A. thaliana* – *P. infestans* deuten ebenso auf eine grundlegende Funktion der Pathogen-induzierten Papillen-Formation in der Resistenzausprägung dieses Nichtwirts-Pathosystems. Es wurde aber auch gezeigt, dass PEN1 offensichtlich keinen Effekt auf die Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* zu haben scheint (siehe 1.1 - 1.3; C Ergebnisse).

Die Induzierung unterschiedlicher Abwehrreaktionen nach *P. infestans*-Infektion legt ebenso nahe, dass eine Erkennung von *P. infestans*-assoziierten spezifischen Strukturen (PAMPs) in

Arabidopsis stattfindet. Inokulationen mit einer Lösung, die Exudate der *P. infestans*-Zoosporen jedoch keine Sporen enthielt, deuteten bereits darauf hin, dass für eine solche Erkennung ein direkter Kontakt mit *P. infestans*-Strukturen notwendig ist (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung). Es scheint daher, dass die von *P. infestans* sekretierten extrazellulären PAMPs nicht für eine Erkennung bzw. Auslösung von Abwehrreaktionen in *Arabidopsis* ausreichend sind. Dass extrazelluläre PAMPs aus Oomyzeten der Gattung *Phytophthora* in der Lage sind, komplexe Abwehrreaktionen in Petersilie und Kartoffel auszulösen, wurde in Untersuchungen des schon erwähnten Pep-13 gezeigt (Nürnberg *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2002; Halim *et al.*, 2004). Des Weiteren sind in der Literatur vor allem die bereits erwähnten Elicitine von *P. infestans* und anderer *Phytophthora*-Spezies beschrieben worden, welche als extrazelluläre Proteine HR in unterschiedlichen Nichtwirts-Pflanzen auslösen können (Kamoun *et al.*, 1998; Huitoma *et al.*, 2005). Eine Beteiligung von Elicitinen an der Auslösung von Abwehrreaktionen in *Arabidopsis* gegen *P. infestans* ist bisher jedoch noch nicht untersucht worden. Ebenso sind extrazelluläre Mucin-ähnliche Proteine aus *P. infestans*-Appressorien erwähnt worden, welche eine Funktion in der Zellwand-Anhaftung der *P. infestans*-Sporen haben und daher potentielle PAMPs darstellen können (Gornhardt *et al.*, 2000).

Es ist aber auch bekannt, dass *P. infestans*-assoziierte Moleküle in der Lage sind, Abwehrreaktionen in Wirtspflanzen zu unterdrücken. Beispielsweise supprimieren lösliche Glukane von *P. infestans* in Kartoffel die Akkumulation von ROS und die Ausprägung der HR (Doke, 1975). Durch Analyse der Akkumulation von Kallose in infizierten Blättern von *gl1* und *pen2* wurde eine Beteiligung der Kallose an den nach *P. infestans*-Infektion induzierten Zellwandaufklagerungen gezeigt (Abb. C-10). Es wurde bisher angenommen, dass Kallose am Aufbau physischer Barrieren gegen eindringende Pathogene beteiligt ist und daher potentiell in der Lage ist, die Invasion phytopathogener Organismen zu verhindern oder zu erschweren (Brown *et al.*, 1989; Aist & Bushnell, 1991; Donofrio & Delaney, 2001).

Jedoch deuten neuere Studien auch auf eine kontroverse Funktion der Kallose in der Pflanze-Pathogen-Interaktion. So wurde in *Arabidopsis* gezeigt, dass der Verlust der Pathogen-assoziierten Kallose-Akkumulation in der Mutante *pmr4-1* (POWDERY MILDEW RESISTANCE4) bzw. in einer transgenen Linie mit einer T-DNA-Insertion im Gen *GSL5* (GLUCAN SYNTHASE-LIKE5) zu einer breiten Resistenz gegen virulente Mehltaupilze führt (Nishimura *et al.*, 2003; Jacobs *et al.*, 2003). Möglicherweise dient die Pathogen-induzierte Kallose-Akkumulation einer Maskierung von Pathogen-assoziierten Elicitoren, was infolgedessen eine Auslösung effizienter Abwehrreaktionen im Wildtyp verhindert (Jacobs *et al.*, 2003). Diskutiert wird aber auch ein durch Kallose ermöglichter Schutz der eindringenden Pilze vor antimikrobiellen Substanzen der Pflanze. Um den Einfluss der Papillen-assoziierten Kallose in der Nichtwirts-Interaktion *A. thaliana* – *P. infestans* zu untersuchen, erfolgte die Analyse der Mutante *pmr4-1* sowie der Doppelmutante *pmr4-1 pen2*. Da der HR-Phänotyp der infizierten Mutante *pmr4-1* vergleichbar mit dem infizierter

Blätter des Wildtyps Col-0 ist und auch keine signifikante Veränderung des *pen2*-abhängigen HR-Phänotyps in infizierten Blättern der Doppelmutante *pmr4-1 pen2* beobachtet wurde, kann angenommen werden, dass die Akkumulation von Kallose wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung in der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen *P. infestans* ist (Daten nicht gezeigt).

In diesem Hintergrund erscheint eine Bedeutung der für die Mutante *pen2* gezeigten verstärkten Kallose-Akkumulation nach *P. infestans*-Infektion für die Nichtwirtsresistenz fraglich. Möglicherweise erfolgt nach der (verstärkten) Pathogen-Erkennung in *pen2* im Gegensatz zu *gl1* die Aktivierung eines breiten Spektrums von Abwehrmechanismen nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip, unabhängig von der Effizienz der einzelnen Abwehrreaktion.

Von Nishimura *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass trotz des Verlustes der Papillen-assoziierten Kallose eine im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant veränderte Papillen-Formation in infizierten Blättern der Mutante *pmr4-1* zu beobachten ist. Demnach erfolgt die Bildung der Papillen unabhängig von einer Kallose-Auflagerung.

Einen Hinweis, welcher auf die Beteiligung phenolischer Verbindungen am Aufbau der Papillen-Strukturen nach *P. infestans*-Infektion hindeutet, lieferte die Untersuchung der Akkumulation autofluoreszierender Komponenten in infizierten Blättern von *gl1* und *pen2* (Abb. C-8). So wurde gezeigt, dass sowohl in *gl1* als auch in *pen2* autofluoreszierende Komponenten in den Zellwandauflagerungen unterhalb der Penetrationsorte akkumulieren (Abb. C-8). Es ist daher denkbar, dass die am Aufbau der Papillen beteiligte Akkumulation phenolischer Verbindungen hinreichend zum Aufbau effizienter Papillen-Strukturen ist. Eine Untersuchung der Akkumulation von Kallose in den Papillen-Strukturen der Mutante *pmr4-1* bzw. der Doppelmutante *pmr4-1 pen2* nach *P. infestans*-Infektion wäre jedoch noch erforderlich, um die Annahme einer möglichen Kallose-unabhängigen Resistenzausprägung in der Interaktion mit *P. infestans* zu unterstützen.

Hinweise für eine Beteiligung des pflanzlichen Zytoskeletts sowie von zellulären Organellen an Pathogen-induzierten dynamischen Prozessen während der Interaktion *A. thaliana* – *P. infestans* lieferten mikroskopische Analysen infizierter epidermaler Zellen. So wurde in einigen hypersensitiv reagierenden Epidermiszellen, sowohl in *gl1* als auch in *pen2*, eine veränderte granuläre Zytoplasma-Struktur in Reaktion auf das eindringende Pathogen beobachtet (Abb. C-6; Daten nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang sind sogenannte zytoplasmatische Aggregationen und Neuordnungen innerhalb des Zytoskeletts der pflanzlichen Zelle als früh sichtbare zelluläre Reaktionen auf virulente und avirulente Oomyzeten-Pathogene bereits beschrieben worden (Takemoto *et al.*, 2003, Holub & Cooper, 2004). Experimentelle Bestätigung der dynamischen Reaktion des Zytoskeletts innerhalb der Interaktion von Pflanze und Pathogen liefert auch die von Yun *et al.* (2003) demonstrierte Beteiligung von Aktin-Mikrofilamenten an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen Weizenmehltau.

Desweiteren deutet die Akkumulation von Vesikel-ähnlichen Strukturen und von Mitochondrien unmittelbar am Ort der versuchten Penetration auf Pathogen-induzierte dynamische Prozesse in der Zellperipherie (Abb. C-11).

Ebenso wurde in *B. graminis*-infizierten epidermalen Zellen aus Gerste gezeigt, dass es zur Akkumulation von H₂O₂-beladenen Vesikeln unterhalb der Penetrationsstelle kommt und dass das Auftreten solcher Vesikel in Korrelation zur Ausprägung der Resistenz gegen Gerstemehltau steht (Hückelhoven *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2003). Die Identifizierung von PEN1 verdeutlicht interessanterweise, dass Vesikel bzw. Vesikelfusionsereignisse, auch in der Nichtwirtsresistenz von *Arabidopsis* gegen *B. graminis* f. sp. *hordei* eine bedeutende Funktion haben (Collins *et al.*, 2003).

Ein weiteres Beispiel für Pathogen-induzierter, dynamischer Prozesse stellt die Relokalisierung zellulärer Organellen zum Ort der Pathogenpenetration im Pathosystem *A. thaliana* – *P. sojae* dar, von der angenommen wird, dass sie eine Funktion beim Aufbau physischer und chemischer Barrieren gegen eindringende Pathogene hat (Holub & Cooper, 2004).

Die Beurteilung der Penetrationsresistenz im Pathosystem *A. thaliana* – *P. infestans* erfolgte durch Bonitur der Penetrations-Häufigkeit nach *P. infestans*-Infektion, d. h. durch Auszählung penetrierter und hypersensitiv reagierender Epidermiszellen in infizierten Blättern. Es wurde gezeigt, dass ein Verlust der Genfunktion von *PEN2* eine im Vergleich zu *gl1* erhöhte Penetrations-Häufigkeit von *P. infestans* zur Folge hat. Aufgrund der Penetrations-Anfälligkeit gegen weitere biotrophe und nekrotrophe Nichtwirts-Pathogene kann angenommen werden, dass *PEN2* wahrscheinlich an der Resistenzausprägung gegen ein breites Pathogenspektrum beteiligt ist (Lipka *et al.*, 2005; Dittgen, 2005). Aufgrund des gegenwärtig noch unbekannten Substrats der Glykosyl-Hydrolase *PEN2* kann derzeit über den der *PEN2*-vermittelten Resistenz zugrunde liegenden Mechanismus keine Aussage getroffen werden. Jedoch scheint die Funktion von *PEN2* Teil eines nach Pathogeninfektion induzierten, zentralen und unspezifischen Abwehrmechanismus in der Zellperipherie zu sein (Lipka *et al.*, 2005).

Die *PR*-Genexpression ist in *pen2* nach Infektion mit *P. infestans* verstärkt.

Genexpressionsanalysen von Markergen für SA- bzw. JA/ET-abhängige Abwehrreaktionen sollten zum einen Aufschluss über die Beteiligung von unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in *A. thaliana* gegen *P. infestans* geben. Zum anderen sollte eine mögliche Korrelation des in *pen2* nach *P. infestans*-Infektion beobachteten HR-Phänotyps mit einer möglichen veränderten *PR*-Genexpression untersucht werden.

Die Analyse der Genexpression zeigte eine früh nach Pathogeninfektion induzierte JA/ET-abhängige *PDF1.2*-Expression, während eine schwache Induzierung der SA-abhängigen *PR1*-

Expression in den späten Phasen der Interaktion mit *P. infestans* zu beobachten war. Dieses Genexpressionsmuster ist weitgehend in Übereinstimmung mit der von Huitema *et al.* (2003) für das Pathosystem *A. thaliana* – *P. infestans* beschriebenen Genexpression, in der eine nach *P. infestans*-Infektion signifikant induzierte Expression des JA/ET-abhängigen Markergens *PDF1.2* gezeigt wurde.

Ein weiterer Hinweis für eine mit der Aktivierung der JA/ET-abhängigen Abwehr assoziierte Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* liefern DNA-microarray-basierte, vergleichende Genexpressionanalysen (Huitema *et al.*, 2003). So wurde durch Analyse der nach JA-Behandlung bzw. nach *P. infestans*-Infektion veränderten Genexpression gezeigt, dass in großen Teilen Ähnlichkeiten hinsichtlich der beobachteten Genexpressionsmuster existieren (Huitema *et al.*, 2003).

Untersuchungen der Genexpression in Nichtwirts-Interaktionen von *Arabidopsis* und biotrophen Mehltaupilzen deuteten auf Unterschiede in der Induzierbarkeit der JA/ET-regulierten Abwehr. So zeigte Zimmerli *et al.* (2004) in Analogie zu Huitema *et al.* (2003) eine Korrelation von Nichtwirtsresistenz und Induzierung JA/ET-abhängiger Abwehrmechanismen in der Interaktion mit Gerstemehltau. Vergleichende Expressionsstudien in Nichtwirts- und Wirts-Interaktionen zeigten, dass virulente Mehltaupilze offenbar in der Lage sind, JA/ET-vermittelte Abwehrreaktionen zu supprimieren bzw. die Fähigkeit besitzen, die Auslösung dieser zu vermeiden.

Hinweise, welche diese Annahme unterstützen, lieferte die Beobachtung, dass ektopische Aktivierung des JA/ET-vermittelten Signaltransduktion zur Resistenz gegenüber virulenten biotrophen Pathogenen führte (Zimmerli *et al.*, 2004).

Obwohl die Studien eine präferenzielle Aktivierung der JA/ET-vermittelten Abwehr in der Nichtwirtsresistenz von *Arabidopsis* gegen *B. graminis* belegen, zeigten JA/ET-Signaltransduktionsmutanten nach *B. graminis*-Infektion Wildtyp-ähnliche Phänotypen (Zimmerli *et al.*, 2004). In Übereinstimmung damit scheint die JA/ET-vermittelte Abwehr in der Nichtwirts-Interaktion von *Arabidopsis* mit Weizenmehltau keine signifikante Bedeutung zu haben (Yun *et al.*, 2003).

Die Untersuchung der Expression von *PR1* und *PDF1.2* in *g1* bzw. *pen2* verdeutlicht ebenso, dass die verstärkte Abwehrreaktion der Mutante *pen2* nach *P. infestans*-Infektion mit einer im Vergleich zu *g1* verstärkten Induzierung der *PR1*- und *PDF1.2*-Expression korreliert, wobei das zeitliche Genexpressionsmuster von *PDF1.2* in *pen2* und *g1* weitestgehend übereinstimmt. Die *PR1*-Transkriptakkumulation wurde in *g1* im Gegensatz zu *pen2* innerhalb von 48 h nach *P. infestans*-Infektion nur schwach oder gar nicht beobachtet. Daher kann in Übereinstimmung mit den Studien von Huitema *et al.* (2003) angenommen werden, dass die SA-abhängige Abwehr in der Kontrolle der frühen Interaktion mit *P. infestans* eine untergeordnete Bedeutung hat.

In Bezug auf die zumindest für die frühen Infektionsphasen von *P. infestans* beschriebenen biotrophen Lebensweise erscheint es daher auch überzeugend, dass die mit HR und

Nekrotisierung korrelierende SA-abhängige Abwehr während der frühen Infektion möglicherweise aktiv oder passiv, z. B. durch eine Aktivierung JA/ET-vermittelter Signaltransduktionswege unterdrückt wird. Hinweise für eine antagonistische Regulation des SA-vermittelten Signalwegs durch Aktivierung JA/ET-abhängiger Abwehrmechanismen lieferten die bereits erwähnten Untersuchungen von Zhao *et al.* (2003).

PEN1 hat keinen Einfluss auf die Nichtwirtsresistenz im Pathosystem *A. thaliana* – *P. infestans*.

Die makroskopische und zytologische Untersuchung der pflanzlichen Abwehrreaktionen in der Mutante *pen1* deuteten darauf hin, dass PEN1 keinen signifikanten Effekt auf die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen *P. infestans* hat. In Übereinstimmung damit zeigten die bisherigen Untersuchungen der Mutante *pen1*, dass PEN1 wahrscheinlich eine spezifische Funktion in der Nichtwirtsresistenz gegen biotrophe Mehltaupilze zu haben scheint (Collins *et al.*, 2003; Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005). Auch im Hintergrund einer verstärkten *P. infestans*-Penetration in der Doppelmutante *pen1 pen2* wurde keine Veränderung des *pen2*-abhängigen Phänotyps beobachtet. Dementgegen ist nach Infektion der Doppelmutante *pen1 pen2* mit Gerstemehltau ein additiver Effekt in der Penetrationsanfälligkeit gezeigt worden (Dittgen, 2005). Es wird angenommen, dass PEN1 sowie PEN2 und PEN3 die Hauptelemente der Zellperipherie-assozierten Penetrationsresistenz gegen biotrophe Mehltaupilze darstellen. Des Weiteren deuten genetische Analysen auf die Existenz eines weiteren Mechanismus, der sogenannten posthaustoriellen Resistenz hin, in der die EDS1-Komplexe eine zentrale Funktion übernehmen (Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005). Es scheint daher, dass zwei weitgehend unabhängige Mechanismen an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen biotrophe Mehltaupilze beteiligt sind, wobei gezeigt wurde, dass einzelne Komponenten dieser Mechanismen auch in der Resistenz gegen weitere phylogenetisch entfernte Nichtwirtspathogene involviert sind (Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005; diese Arbeit).

Untersuchungen der Nichtwirts-Interaktion *A. thaliana* – *P. syringae* pv *phaseolicola* zeigten, dass auch während einer ohne sichtbare Symptome verlaufenden Nichtwirts-Interaktion die Induzierung von Abwehrreaktionen, wie z. B. die Expression von *PR*- oder Abwehr-assozierten Genen, erfolgen kann (Lu *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2003). Die Analysen der Expression der *PR*-Gene *PR1* und *PDF1.2* in der Mutante *pen1*, die ebenso keinen sichtbaren Phänotyp nach *P. infestans*-Inokulation zeigt, sowie in der Doppelmutante *pen1 pen2*, welche einen *pen2*-ähnlichen Phänotyp zeigt, deutete auf eine vergleichbare *PR*-Genexpression in Col-0 und *pen1* bzw. in *pen2* und *pen1 pen2* hin. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der zytologischen Untersuchung kann daher angenommen werden, dass PEN1 keinen Effekt auf die Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* hat.

Nach Untersuchung des Nichtwirts-Pathosystems *A. thaliana* – *P. infestans* auf zytologischer und molekularer Ebene kann angenommen werden, dass präformierte Barrieren wahrscheinlich in Kombination mit weiteren früh induzierten Abwehrreaktionen ein Vordringen von *P. infestans*-Strukturen bereits auf epidermaler Ebene effizient limitieren können. Zur Ausprägung der Resistenz in *Arabidopsis* gegen *P. infestans* scheint die HR von geringerer Bedeutung zu sein, wobei gezeigt wurde, dass erst nach dem Verlust der Penetrationsresistenz (*pen2*) eine mit der HR assoziierte Abwehr erfolgt.

2 Analyse der Nichtwirtsresistenz gegen *Phytophthora infestans* in unterschiedlichen *Arabidopsis thaliana*-Signaltransduktionsmutanten

PAD4 und EDR1 sind an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* beteiligt, wobei die Fähigkeit zur Salizylsäure-Akkumulation keinen Einfluss zu haben scheint.

Die Genexpressionsanalyse von *gl1* zeigte, dass die Expression des SA-regulierten Gens *PR1* in der frühen Interaktion von *A. thaliana* und *P. infestans* wahrscheinlich weniger bedeutend ist (Abb. C-13). Die Northern-Blot-Analyse der Mutante *pen2* deutete aber auf eine Verstärkung der *PR1*-Genexpression nach Pathogeninfektion hin, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass die erhöhte Penetrations-Häufigkeit von *P. infestans* und die verstärkten Abwehrreaktionen in *pen2* unter Beteiligung SA-regulierter Mechanismen erfolgen. Die *P. infestans*-Inokulation einer *NahG*-exprimierenden *pen2*-Linie führte jedoch zu keiner Verstärkung oder Abschwächung der *pen2*-abhängigen HR (Daten nicht gezeigt). In Analogie dazu demonstriert der Wildtyp-ähnliche Phänotyp einer infizierten *NahG*-exprimierenden Linie eine von der Signalkomponente SA unabhängige Ausprägung der Nichtwirtsresistenz im *A. thaliana* Ökotyp Col-0. An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, dass der Einfluss von SA-Abbauprodukten, wie Catechol, auf den in *pen2 NahG* beobachteten Phänotyp nicht auszuschließen ist.

Da einerseits die Aktivierung der Genexpression des SA-regulierten Gens *PR1* nach *P. infestans*-Infektion gezeigt wurde, andererseits das SA-Signal offenbar nicht essentiell für die Nichtwirtsresistenz gegen *Arabidopsis* zu sein scheint, ist anzunehmen, dass die *PR1*-Expression in der Ausprägung der Resistenz gegen *P. infestans* von untergeordneter Bedeutung ist. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass in der Mutante *npr1-1* eine Wildtyp-ähnliche (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung) bzw. in der Doppelmutante *pen2 npr1-1* eine *pen2*-ähnliche HR-Ausprägung nach *P. infestans*-Infektion beobachtet wurde. Eine Analyse der *PR1*-Genexpression in infizierten *NahG*-exprimierenden *pen2*-Linien bzw. in *pen2 npr1-1* müsste jedoch zur Bestätigung der Annahme einer von der Expression SA-regulierter *PR*-Gene unabhängigen Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* noch erfolgen.

Die genetische Analyse der Nichtwirtsresistenz in Tomate und Tabak gegen den Rostpilz *Uromyces vignae* sowie in *Arabidopsis* gegen Gerstemehltau deuten ebenso auf eine untergeordnete Funktion der SA-regulierten Abwehr in diesen Pathosystemen hin (Mellersh & Heath, 2003; Dittgen, 2005). Ebenso zeigen Untersuchungen von Zimmerli *et al.* (2004), dass Komponenten der SA-regulierten Signaltransduktion in der Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen Gerstemehltau keinen signifikanten Effekt haben. Demgegenüber scheint die SA-vermittelte Abwehr eine stärker ausgeprägte Funktion in der Nichtwirtsresistenz gegen Weizenmehltau zu haben (Yun *et al.*, 2003). So wurde gezeigt, dass in den Mutanten *pad4*, *npr1* und *eds1* und in transgenen *NahG*-Pflanzen die Penetrations-Häufigkeit von *B. graminis* f. sp. *tritici* erhöht ist. Darüber hinaus ist demonstriert worden, dass ein additiver Verlust der EDS1-Funktion und der Aktin-Funktion hinreichend ist, um die Nichtwirtsresistenz gegen Weizenmehltau zu überwinden.

In Analogie zu dem in der Mutante *npr1-1* bzw. in der *NahG*-exprimierenden Linie nach *P. infestans*-Infektion beobachteten Phänotyp zeigen die Mutanten *rar1-10*, *sgt1b-1*, *eds1-2* und *ndr1-1* ebenso eine im Vergleich zum Wildtyp unveränderte HR (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung). Die Analyse der entsprechenden Mutanten im *pen2*-Hintergrund demonstrierte, dass keine dieser Komponenten einen Effekt auf den *pen2*-abhängigen Phänotyp zu haben scheint. Für RAR1 und SGT1 wurde eine Funktion in der *R*-Gen-spezifischen Resistenz beschrieben, welche möglicherweise in Verbindung mit der Regulation von *R*-Proteinkomplexen durch SCF-abhängige Ubiquitinierungsprozesse steht. Daraus kann geschlossen werden, dass RAR1/SGT1-abhängige Ubiquitinierungen in der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* nicht von Bedeutung sind. Alternativ dazu ist eine zu RAR1/SGT1 redundant vorhandene Funktion anderer Komponenten in der SCF-abhängigen Regulation nicht auszuschließen.

Beispiele, die eine Beteiligung von RAR1 oder SGT1 in der Nichtwirtsresistenz belegen, wurden im Gegensatz dazu bereits gezeigt. Neben der erwähnten Funktion von SGT1 in der Nichtwirtsresistenz von *N. benthamiana* ist von Freialdenhoven *et al.* (2005) für RAR1 eine Bedeutung im Nichtwirts-Pathosystem *Hordeum vulgare* – *Golovinomyces orontii* beschrieben worden.

Auch EDS1 und NDR1, die Funktionen in der Vermittlung *R*-Gen-spezifischer Resistenzmechanismen haben, scheinen für die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* von untergeordneter Bedeutung zu sein. Während die biochemische Funktion von NDR1, welches Glykosylphosphatidyl-Inositol-(GPI)-verankert in der Plasmamembran lokalisiert ist, gegenwärtig noch unklar ist, wird angenommen, dass EDS1, als ein Protein mit Homologie zu eukaryontischen Lipasen, in der frühen Pathogenabwehr, d. h. hierarchisch über dem PCD und dem „oxidative burst“ einzuordnen ist (Coppinger *et al.*, 2004; Wiermer *et al.*, 2005). Des Weiteren ist für EDS1 in Assoziation mit PAD4 (*PHYTOALEXIN DEFICIENT4*) eine Funktion in der SA-Akkumulation und Amplifikation pflanzlicher Abwehrreaktionen beschrieben worden (Feys *et al.*,

2001). Mehrere Studien belegen, dass SA-Akkumulation und *EDS1/PAD4*-Expression durch positive Rückkopplungsmechanismen zur gegenseitigen Signalverstärkung in der Abwehr beitragen (Xiao *et al.*, 2003; Chandra-Shekara *et al.*, 2004).

Mutationen in *EDS1* führen neben einer erhöhten Anfälligkeit für virulente Pathogene auch zu einer Beeinträchtigung der Nichtwirtsresistenz und deuten daher auf eine generelle regulatorische Funktion von *EDS1* in der Pathogenresistenz hin (Parker *et al.*, 1996; Yun *et al.*, 2003; Zimmerli *et al.*, 2004; Wiermer *et al.*, 2005). So wurde beispielsweise gezeigt, dass der kombinierte Verlust von *PEN2* und *EDS1* bzw. *PEN2* und *PAD4* zu einem Verlust der Nichtwirtsresistenz gegen den Erbsenmehltau *Erysiphe pisi* führte (Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005). Der *EDS1/PAD4*-Komplex scheint demnach eine zentrale Komponente in der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen *Erysiphe pisi* darzustellen. Im Gegensatz dazu kann jedoch angenommen werden, dass *EDS1* auf die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* keinen Effekt hat (Tab. C-1; Daten nicht gezeigt).

Die *P. infestans*-Infektion der Doppelmutante *pen2 pad4-1* deutete auf eine Suppression des *pen2*-abhängigen Nekrose- und Zelltod-Phänotyps hin (Abb. C-15; Abb. C-16). Es wurde gezeigt, dass der durch höhere Inokulum-Dichten induzierte hypersensitive Zelltod im Mesophyll von *pen2* durch eine Mutation in *PAD4* weitestgehend unterdrückt werden kann (Abb. C-16). Interessanterweise scheint jedoch die Anzahl penetrierter und hypersensitiv reagierender Epidermiszellen in *pen2* und *pen2 pad4-1* auf vergleichbarem Niveau zu sein (Abb. C-17). Offenbar ist der durch geringere Inokulum-Dichten induzierte hypersensitive Zelltod penetrierter epidermaler Zellen in *pen2* unbeeinflusst von *pad4-1*.

Es kann daher angenommen werden, dass *PAD4* eine Funktion in der positiven Regulation der HR nach *P. infestans*-Infektion in *Arabidopsis* hat. Aufgrund der Tatsache, dass die Mutante *eds1-2* keine HR bzw. die Doppelmutante *pen2 eds1-2* keine Veränderung der *pen2*-abhängigen HR zeigt, kann geschlossen werden, dass für die *PAD4*-abhängige Regulation der HR-Ausprägung im Mesophyll eine Interaktion mit *EDS1* nicht notwendig ist (Daten nicht gezeigt).

Ähnliche Befunde sind auch in Studien der *HRT* (*HR to TCV*)-spezifischen Resistenz gegen TCV (*turnip crinkle virus*) gefunden worden (Dempsey *et al.*, 1997; Chandra-Shekara *et al.*, 2004). *HRT* zeigt Homologien zu dem *R*-Gen *RPP8* (*RECOGNITION of PERONOSPORA PARASITICA8*) und *RPP8*-Homologen, welche Resistenz gegen den Oomyzeten *H. parasitica* vermitteln (Cooley *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass durch *pad4-1* und *eds1-1* eine Beeinträchtigung der *HRT*-abhängigen Resistenz erfolgt, diese jedoch nur in *eds1-1* durch exogene SA-Applikation wiederhergestellt werden kann. Demnach ist die *HRT*-vermittelte Resistenz SA- und *PAD4*-abhängig jedoch unabhängig von *EDS1*. Möglicherweise könnte daher eine Erkennung des Oomyzetenpathogens *P. infestans* in *Arabidopsis* analog der *HRT/RPP*-vermittelten Mechanismen erfolgen.

Nach Untersuchung der *NahG*-exprimierenden *pen2*-Linien kann geschlossen werden, dass die Akkumulation von SA für die von PAD4 regulierte Zelltod-Reaktion in *pen2* nicht essentiell ist. Diese Annahme könnte experimentell durch eine exogene SA-Applikation in infizierten *pen2 pad4-1* überprüft werden. Zu erwarten wäre dann, dass exogene SA-Applikation keinen Effekt auf die Suppression des HR-Phänotyps in *pen2 pad4-1* hat. Gleichzeitig würde ein solcher Befund dafür sprechen, dass die für die Mutante *pad4-1* beschriebene Reduzierung der SA-abhängigen Biosynthese des Phytoalexins Camalexin nicht ursächlich für den in der Doppelmutante *pen2 pad4-1* beobachteten Phänotyp ist. Übereinstimmend damit zeigten die Doppelmutanten *pen2 pad3-1* und *pen2 pad5-1* eine *pen2*-ähnliche HR nach *P. infestans*-Infektion (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung). Der in *pen2 pad4-1* beobachtete Effekt scheint daher wahrscheinlich mit einer regulatorischen Funktion von PAD4 in der Interaktion mit *P. infestans* in Verbindung zu stehen.

Als ein weiterer Interaktionspartner von EDS1 ist SAG101 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101) identifiziert werden (Feys *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den anderen EDS1-Komplexen scheint der Komplex EDS1-SAG101 Kern-lokalisiert vorzuliegen. Des Weiteren ist eine teilweise redundante Funktion von PAD4 und SAG101 hinsichtlich ihrer Funktion in der (TIR-NBS-LRR)-*R*-Gen-spezifischen Resistenz beschrieben worden (Wiermer *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde kürzlich demonstriert, dass der kombinierte Verlust der Funktion von SAG101 und PAD4 hinreichend ist, um die Nichtwirtsresistenz gegen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* zu überwinden (Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005). Ebenso scheint es, dass die Sporulation dieses biotrophen Nichtwirtspathogens mit einer signifikant reduzierten Zelltod-Reaktion infizierter Zellen in *pad4-1 sag101-1* korreliert. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit dem Grundsatz, dass die Entwicklung biotroper Pathogene effizient durch den hypersensitiven Zelltod eingeschränkt werden kann. Um einen möglichen Effekt von SAG101 in der Interaktion mit *P. infestans* zu untersuchen, erfolgt zur Zeit die Analyse weiterer Mutantenkombinationen von *pen2*, *pad4-1* und *sag101-1*.

Des Weiteren erscheint überraschend, dass *P. infestans* trotz der im Mesophyll unterdrückten Zelltod-Reaktion in *pen2 pad4-1* nicht in der Lage ist, sich weiter im infizierten Gewebe auszubreiten und daher in *pen2 pad4-1* sowie *pen2* eine vergleichbare Entwicklung zeigt (Daten nicht gezeigt). Als Grund hierfür könnte angenommen werden, dass der bereits in den penetrierten Epidermiszellen induzierte hypersensitive Zelltod hinreichend ist, um *P. infestans* effizient an der weiteren Ausbreitung zu hindern.

Um diese Annahmen zu unterstützen wären weitere genetische Analysen unter Nutzung von weiteren Doppelmutanten-Linien erforderlich. Denkbar wäre beispielsweise eine Kombination von *pen2* und den *dnd* (defense, no death)-Mutationen, welche durch eine erhöhte Pathogenresistenz bei gleichzeitigem Verlust des HR-assozierten Zelltods gekennzeichnet sind (Yu *et al.*, 1998; Jurkowsky *et al.*, 2005).

Die Untersuchung der Doppelmutante *pen2 edr1-1* nach *P. infestans*-Infektion zeigte, dass durch kombinierten Verlust der Funktion von PEN2 und EDR1 eine Verstärkung des *pen2*-abhängigen HR-Phänotyps induziert werden kann (Abb. C-15). Durch mikroskopische (Daten nicht gezeigt) und makroskopische Analyse des hypersensitiven Zelltods (Abb. C-16) wurde demonstriert, dass im Vergleich zu *pen2* eine größere Anzahl von Zellen mit hypersensitivem Zelltod auf die *P. infestans*-Infektion reagiert. In welchem Maß die verstärkte Zelltod-Häufigkeit mit einer erhöhten Anzahl penetrierter epidermaler Zellen korreliert, konnte aufgrund der starken Zelltod-Reaktion im Mesophyll von *pen2 edr1-1* nicht zweifelsfrei ermittelt werden. Es wäre daher auch möglich, dass der Phänotyp in *pen2 edr1-1* durch die HR von Epidermis- und Mesophyllzellen hervorgerufen wird, welche an penetrierte Zellen angrenzen, jedoch selbst nicht penetriert worden.

Nach *P. infestans*-Infektion der Mutante *edr1-1* wurde eine *g1*-ähnliche HR bzw. Penetrations-Häufigkeit beobachtet, was zu der Annahme führt, dass ein Verlust der EDR1-Funktion nur im *pen2*-Hintergrund eine weitere Verstärkung der HR in infizierten Blättern hervorruft. Für die Ausprägung des verstärkten Mesophyll-Zelltods in *pen2 edr1-1* ist daher die Unterdrückung der Penetrationsresistenz (*pen2*) notwendig.

EDR1 kodiert für eine CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1)-ähnliche Kinase und ist als negativer Regulator der pflanzlichen Pathogenabwehr isoliert worden (Frye & Innes, 1998). Des Weiteren ist die Beteiligung der MAPK Kinase Kinase EDR1 an MAP-Kinase-Kaskaden beschrieben worden, welche SA-abhängige Abwehrreaktionen nach Pathogenbefall negativ regulieren (Frye & Innes, 1998; Frye *et al.*, 2001). So wurde beispielsweise in *edr1-1* eine im Vergleich zum Wildtyp schnellere Induzierung des Mesophyll-Zelltods nach Infektion mit dem virulenten Mehltau *Erysiphe cichoracearum* demonstriert (Frye *et al.*, 2001).

Es könnte daher angenommen werden, dass EDR1 bzw. MAP-Kinase-Kaskaden an einer Signaltransduktion beteiligt sind, welche zur Suppression des hypersensitiven Zelltods im Mesophyll nach *P. infestans*-Infektion führt. Dabei wäre denkbar, dass nur in den infizierten Epidermiszellen bzw. in wenigen umgebenden Mesophyllzellen der negative Effekt von EDR1 überlagert wird, so dass es zur Auslösung des Zelltods bzw. zur Limitierung des eindringenden Pathogens kommt. Alternativ dazu könnte es ebenso möglich sein, dass die EDR1-Funktion auf das Mesophyll beschränkt ist. Die Pathogen-induzierte Unterdrückung dieser Funktion ist jedoch nur in der Mutante *pen2* wirksam, da *P. infestans* in *pen2* in der Lage ist bis in das Mesophyll vorzudringen. In dem umgebenden nicht infizierten Gewebe würde die Pathogen-induzierte Überlagerung des EDR1-Effekts jedoch nicht erfolgen, was die EDR1-vermittelte Unterdrückung der HR zur Folge hätte. Eine solche Regulation könnte demnach ein für die Pflanze essentiellen Mechanismus darstellen, um die Ausbreitung der Pathogen-assoziierten HR im nicht infizierten Gewebe einzuschränken.

In Untersuchungen der gegen ein breites Spektrum von Mehltaupilzen gerichteten *RPW8*-vermittelten Resistenz wurde gezeigt, dass EDR1 sowohl HR als auch Resistenz durch Limitierung

der *RPW8.1*- und *RPW8.2*-Expression negativ reguliert (Xiao *et al.*, 2003; 2005). Es wird angenommen, dass die nur an den Orten der Pathogenpenetration erfolgte starke *RPW8*-Transkriptakkumulation zu einer lokalen Aktivierung des hypersensitiven Zelltods führt, wobei *EDR1* in dem umgebenden Gewebe durch Unterdrückung der *RPW8*-Transkriptakkumulation die HR-Ausprägung limitiert.

Neben der Funktion in der Pathogenresistenz ist ebenso eine Beteiligung von *EDR1* in der Regulation der ET-induzierten Seneszenz und verschiedener Stress-induzierter Prozesse, wie Zelltod und Wachstumsstörung beschrieben worden (Tang *et al.*, 2005; Tang & Innes, 2002). Demnach korreliert die normale Funktion von *EDR1* mit dem Schutz vor nachteilig wirkender Aktivierung Stress-induzierter pflanzlicher Reaktionen und Seneszenz.

Die Untersuchung der Nichtwirtsresistenz unterschiedlicher Signaltransduktionsmutanten deutet darauf hin, dass der Funktionsverlust einzelner Faktoren der SA-regulierten Abwehr sowie das SA-Signal selbst keinen Effekt auf die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* zu haben scheinen. Erst durch funktionellen Verlust der *PEN2*-Ebene, d. h. der Penetrationsresistenz wurde für *PAD4* und *EDR1* eine Beteiligung an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* gezeigt, wobei ein kombinierter Verlust der Genfunktion von *PEN2* und *PAD4* bzw. *PEN2* und *EDR1* zu einer im Vergleich zu *pen2* nicht signifikant veränderten Entwicklung der Infektionsstrukturen des Oomyzeten führt.

3 *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach *Phytophthora infestans*-Inokulation

Die *pen2*-Mutagenese führte zur Isolation unterschiedlicher putativer Mutanten mit einer im Vergleich zu *pen2* verstärkten HR nach Infektion mit *P. infestans*.

Durch chemische Mutagenese sollten Mutationen im *pen2*-Genom induziert werden, welche zu einer im Vergleich zu *pen2* veränderten Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* führen. Da eine Mutation in *PEN2* bereits zu einem veränderten Phänotyp nach *P. infestans*-Infektion führt, konnte ein Spektrum von Phänotypen erwartet werden, welches von einer Suppression des *pen2*-abhängigen Phänotyps bis hin zur Suszeptibilität reicht. In der Primärcharakterisierung, d. h. in der Analyse des HR-Phänotyps der M2-Nachkommenschaft der remutagenisierten *pen2*-Population war bereits zu erkennen, dass sich wahrscheinlich keine suszeptiblen Linien unter den isolierten putativen Mutanten befanden. Durch die Überprüfung des Phänotyps in der M3-Nachkommenschaft wurde diese Beobachtung bestätigt. Es ist daher anzunehmen, dass die Einführung einer Sekundärmutation in den *pen2*-Hintergrund nicht hinreichend ist, um einen Verlust der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* zu bewirken. Diese Annahme würde mit der für die Nichtwirtsresistenz postulierten Stabilität übereinstimmen, welche darin begründet wird, dass

dieser Resistenzform wahrscheinlich unterschiedliche Faktoren bzw. mehrere unabhängige Ebenen der Abwehr zu Grunde liegen (Heath, 2000; Kamoun, 2001; Thordal-Christensen, 2003). Die Beständigkeit der Nichtwirtsresistenz kann auch darin begründet sein, dass die Resistenzvermittelnden Faktoren genetisch redundant in der Zelle vorliegen. Gleichzeitig könnte die genetische Redundanz dieser Komponenten die Ursache dafür sein, weshalb keine putativen Mutanten mit einem vollständigen Verlust der Nichtwirtsresistenz isoliert werden konnten. An dieser Stelle ist aber auch zu erwähnen, dass in einigen Nichtwirts-Pathosystemen demonstriert wurde, dass bereits der Verlust der Funktion zweier unabhängiger Faktoren den Verlust der Nichtwirtsresistenz bedingen kann (Yun *et al.*, 2003; Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005). Als eine weitere Möglichkeit ist ebenso nicht auszuschließen, dass eine Mutation in Genen, die essentiell für die Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* sind, zu Letalität in den entsprechenden Mutanten führt.

Der Phänotyp der putativen Suppressoren des *pen2*-abhängigen Phänotyps wurde in der M3-Nachkommenschaft nicht bestätigt. Anzunehmen ist, dass die in der M2-Generation beobachtete Unterdrückung des Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyps wahrscheinlich eher durch eine niedrige Keimungsrate oder durch ungenügende Virulenz des verwendeten *P. infestans*-Isolats als durch eine Suppressor-Mutation verursacht wurde. In der Gruppe der putativen Mutanten, die eine Verstärkung des *pen2*-abhängigen Phänotyps zeigten (Klasse 1 und 2) wurde von 110 überprüften putativen Mutanten für 26 Linien aus 13 unabhängigen M1-Gruppen der beobachtete Phänotyp in der M3-Generation bestätigt. Als nicht unerheblichen Grund für die verhältnismäßig hohe Zahl von putativen Mutanten, deren Phänotyp nicht bestätigt wurde, ist die hohe biologische Variabilität des durch *P. infestans* induzierten Nekrose-Phänotyps anzunehmen. So wurde nach *P. infestans*-Inokulation mehrerer Individuen eines Genotyps unter identischen Bedingungen eine verhältnismäßig große Variabilität in der Ausprägung eines Phänotyps beobachtet. Ebenso sind experimentelle Schwankungen, die bei einer Tropfen-Inokulation einer großen Zahl von Pflanzen unvermeidbar sind, nicht auszuschließen.

Die untersuchten Sekundärmutationen führen zu einer Potenzierung der in *pen2* beobachteten Abwehrreaktionen sowie zu einer weiteren Erhöhung der Penetrations-Häufigkeit in den Mutanten 202 und 222 nach *P. infestans*-Infektion

Die Untersuchung der im Rahmen dieser Arbeit isolierten putativen Mutanten zeigte, dass die Einführung von Sekundärmutationen in den *pen2*-Hintergrund eine weitere Verstärkung unterschiedlicher Abwehrreaktionen nach *P. infestans*-Infektion bewirkt. Es ist daher anzunehmen, dass die korrespondierenden Gene direkt oder indirekt in der negativen Regulation der pflanzlichen Pathogenabwehr involviert sind.

Faktoren, die im Zusammenhang mit der negativen Regulation pflanzlicher Abwehrreaktionen stehen, wie z. B. dem Pathogen-induzierten hypersensitiven Zelltod, sind bereits identifiziert

worden. Ein negativer Regulator des programmierten Zelltods (*programmed cell death*; PCD) in Pflanzen ist z. B. der putative Transkriptionsfaktor LSD1 (LESIONS SIMULATING DISEASE1; Jabs *et al.*, 1996). Genetische Studien demonstrieren, dass Mutationen in *PAD4* und *EDS1* in der Lage sind, den *lsd1*-Phänotyp zu supprimieren, was darauf hindeutet, dass sich LSD1 hierarchisch unter PAD4 und EDS1 befindet (Lorrain *et al.*, 2003). Des Weiteren wird angenommen, dass LSD1 ein Schlüssel-Faktor in der SA-abhängigen Signal-Amplifizierung ist, welche zur Auslösung der HR führt (Aviv *et al.*, 2002). Die Identifizierung des LSD1-Homologen LOL1 (LSD1-QNE-LIKE1) lieferte den Hinweis, dass möglicherweise über einen antagonistischen und Schwellenwert-abhängigen Mechanismus beider Komponenten eine Regulation der Zelltod-Exekution ermöglicht wird (Epple *et al.*, 2003; Lam, 2004). Obwohl weitere Regulatoren des pflanzlichen PCDs identifiziert worden sind, wie z. B. Caspase-ähnliche Proteasen oder BAX (BCL2-ASSOCIATED X PROTEIN)-ähnliche Proteine, ist die Aufklärung der PCD-Signaltransduktion in Pflanzen im Vergleich zu tierischen Systemen jedoch noch sehr lückenhaft (Lam, 2004).

Ein weiterer negativer Regulator in der pflanzlichen Pathogenabwehr stellt das bereits erwähnte EDR1 dar (Frye & Innes, 1998; Frye *et al.*, 2001). Die Beteiligung von EDR1 an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* wurde in Studien der Doppelmutante *pen2 edr1-1* demonstriert (Abb. C-15). Durch erste Kartierungsexperimente wurde eine Mutation in *EDR1* als Ursache für die verstärkte HR in der Mutante 222 bereits ausgeschlossen. Ob eine mögliche Mutation in *EDR1* an der Ausprägung des veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyps in den verbleibenden putativen Mutanten beteiligt ist, muss jedoch noch untersucht werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Penetrations-Häufigkeit nicht in allen isolierten Mutanten zweifelsfrei bestimmt werden konnte, ist nicht auszuschliessen, dass die durch die Sekundärmutationen 190, 242, 266, 272 und 303 induzierte stärkere HR die Folge einer potenzierten Abwehrreaktion von nicht penetrierten Zellen ist. Es ist daher möglich, dass trotz der beobachteten stärkeren HR die Penetrations-Häufigkeit in diesen Linien mit der in *pen2* vergleichbar ist. Obwohl die Penetrations-Häufigkeit von *P. infestans* in den Mutanten 202 und 222 im gegenüber der in *pen2* erhöht ist, wurde, wie auch in den übrigen untersuchten Mutanten, im Vergleich zu *pen2* keine signifikant veränderte zelluläre Differenzierung des Oomyzeten oder ein weiteres Vordringen der *P. infestans*-Strukturen beobachtet.

Durch Kreuzungsanalysen wurde gezeigt, dass die Kombination der Mutationen 202 und 222 keine im Vergleich zur Mutante 202 oder 222 weitere Verstärkung des HR-Phänotyps zur Folge hat (siehe Tab. C-8). Daraus kann formal abgeleitet werden, dass die Mutationen 202 und 222 Auswirkungen auf den gleichen zur Verstärkung der HR nach *P. infestans*-Infektion führenden Mechanismus haben.

Die Faktoren 202 und 222 stellen daher, neben PEN2, weitere Elemente der Penetrationsresistenz gegen *P. infestans* dar, welche jedoch nicht, wie auch die übrigen Sekundärmutationen, zur Überwindung der Nichtwirtsresistenz führen. Es ist daher anzunehmen, dass noch weitere

Faktoren bzw. Ebenen in der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* beteiligt sind und zu deren Stabilität beitragen. In allen untersuchten mutanten Linien ist daher nicht von einem Verlust der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* auszugehen. Mögliche Gründe hierfür sind bereits diskutiert worden (siehe 3; D Diskussion).

Da der vollständige Verlust der Nichtwirtsresistenz gegen unterschiedliche biotrophe Mehltaupilze, deren natürliche Wirtspflanzen monokotyle Gräser sind, in *Arabidopsis* bereits gezeigt worden ist, kann angenommen werden, dass die phylogenetische Distanz der Nichtwirtspflanze gegenüber der Wirtspflanze wahrscheinlich kein Kriterium für die Stabilität der Nichtwirtsresistenz darstellt.

Die Segregationsanalyse unterschiedlicher SSLP-Marker in der Kartierungspopulation der Mutante 222 deutet darauf hin, dass die Mutation 222 auf dem Chromosom 3 lokalisiert ist (Tab. C-6). Die dabei ermittelte Kopplung von SSLP-Markern des Chromosoms 3, insbesondere die des SSLP-Markers CIW4 stellt einen Hinweis dar, dass die Sekundärmutation 222 möglicherweise auf dem unteren Arm des Chromosoms 3 lokalisiert ist (Tab. C-7). Bestätigt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass die ermittelte Rekombinationsfrequenz in dieser Region bezogen auf die Sekundärmutation 222 sinkt, wenn die in einem zweiten Experiment nicht eindeutig in ihrem HR-Phänotyp bestätigten Linien nicht berücksichtigt werden. Des Weiteren deutet die genetische Konstitution in den Linien 13, 42 und 105 nicht auf eine Lokalisation der Sekundärmutation 222 in der Region des SSLP-Markers CIW4 hin, was jedoch auch darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Sekundärmutation 222 in diesen Linien nicht homozygot vorliegt. Obwohl der HR-Phänotyp dieser Linien in einem Experiment bestätigt wurde, ist anzunehmen, dass die gesicherte Identifizierung von für die Mutation 222 homozygoter Linien nur nach wiederholter Bestätigung des HR-Phänotyps in der F3-Nachkommenschaft möglich ist. Es ist daher davon auszugehen, dass die in der Mutante 222 beobachtete und im Vergleich zu anderen isolierten Mutanten verhältnismäßig schwach ausgeprägte Verstärkung des HR-Phänotyps nach *P. infestans*-Infektion Fehlinterpretationen des HR-Phänotyps begünstigt. Da der zur Erstellung der Kartierungspopulation verwendete *A. thaliana*-Ökotyp Ler eine schwache HR nach *P. infestans*-Infektion zeigt (siehe 2.1; C Ergebnisse), kann angenommen werden, dass der heterogene genetische Hintergrund aus sowohl Col-0 als auch Ler-Sequenzbereichen in den zu untersuchenden Linien eine Beurteilung des HR-Phänotyps zusätzlich erschwert.

Des Weiteren ist auffallend, dass die Kopplung der SSLP-Marker SORBO34 bzw. F24M12TGF und der Sekundärmutation 222 verhältnismäßig schwach ist bezogen auf die relativ geringe Entfernung zum SSLP-Marker CIW4 (siehe Tab. C-7). Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Region auf Chromosom 3 eine im Vergleich zu anderen Regionen des *A. thaliana*-Genoms erhöhte Häufigkeit für Rekombinationsereignisse zeigt. In der Literatur ist jedoch eine erhöhte Rekombinationsfrequenz dieser Region bisher nicht beschrieben worden, so dass davon

ausgegangen werden muss, dass es sich um eine spezifische Beobachtung in der untersuchten Kartierungspopulation handelt.

Die Sekundärmutationen 202 und 242 führen zu einer im Vergleich zu *pen2* veränderten *PR*-Genexpression nach *P. infestans*-Infektion

Die Analyse der *PR1*- und *PDF1.2*-Expression in den Mutanten 272 und 222 zeigte, dass die Genexpression nach *P. infestans*-Infektion weitestgehend mit der in *pen2* beobachteten Transkriptakkumulation vergleichbar ist. Die für diese putativen Mutanten im Vergleich zu *pen2* gezeigten verstärkten Abwehrreaktionen korrelieren demnach nicht mit einer entsprechenden verstärkten Induzierung der *PR*-Genexpression. Es kann daher angenommen werden, dass die Mechanismen, welche zur Ausprägung der HR und zur Aktivierung der *PR*-Genexpression nach *P. infestans*-Infektion führen, teilweise überlappende Funktionen haben, aber scheinbar auch durch spezifische Komponenten unabhängig voneinander reguliert werden können. Ebenso ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine mögliche verstärkte *PR*-Gen-Transkriptakkumulation in den putativen Mutanten durch die starke Mazeration des infizierten Blattgewebes nicht nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu wurde für die mutante Linie 202 gezeigt, dass die Sekundärmutation zu einer konstitutiven Expression von *PDF1.2* nach *P. infestans*-Infektion führt. Die erhöhte Penetrations-Häufigkeit der Mutante 202 scheint daher mit der Aktivierung von JA/ET-regulierten Abwehrreaktionen zu korrelieren. In Übereinstimmung damit wurde bereits in *pen2* eine früh nach *P. infestans*-Infektion induzierte *PDF1.2*-Expression beobachtet.

Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Induzierung JA/ET-abhängiger Abwehrmechanismen und erhöhte Suszeptibilität erscheint jedoch unwahrscheinlich. So wurde nach *P. infestans*-Infektion unterschiedlicher JA/ET-Signaltransduktionsmutanten ein Wildtyp-ähnlicher Phänotyp beobachtet (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung), was darauf hindeutet, dass für die Ausprägung der Penetrationsresistenz die JA/ET-regulierte Abwehr von untergeordneter Bedeutung ist. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass für die Resistenzausprägung im Pathosystem *A. thaliana* – *P. infestans* der Verlust von Komponenten der JA/ET-vermittelten Signaltransduktionskaskade nicht limitierend ist. Es bleibt jedoch durch geeignete genetische Analysen zu prüfen, ob für die erhöhte Anfälligkeit der Mutante 202 eine funktionelle JA- bzw. ET-regulierte Abwehr notwendig ist.

Die für die Mutante 202 gezeigte konstitutive *PDF1.2*-Expression (Abb. C-26) sowie die beobachteten Wachstumsstörungen (Daten nicht gezeigt) liefern darüber hinaus Hinweise auf einen möglichen Allelismus zu *cev1-1* (*constitutive expression of VSP1*; Ellis & Turner, 2001). So wurde in der Mutante *cev1-1* eine Korrelation von konstitutiver Expression JA/ET-abhängiger Abwehr gene und von Wachstumsstörungen gezeigt. In weiteren Fällen ist ebenso ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Abwehrreaktionen und der Inhibition von Wachstum demonstriert worden (Feys *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1995a,b; Zimmerli *et al.*, 2004).

Die diesen Mechanismen zu Grunde liegenden Faktoren sind größtenteils unbekannt, jedoch wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung von Abwehr-assoziierten Genen mit einer Suppression von Genen des Photosynthese-Apparats und des generellen Metabolismus korreliert (Logemann *et al.*, 1995; Ehness *et al.*, 1997).

Es wird angenommen, dass möglicherweise Störungen der Zellwand-Integrität in *cev1-1* zu einer aktivierte JA/ET-abhängigen Stress- und Abwehrreaktion führen (Ellis *et al.*, 2002). Erste Experimente zur Kartierung des Mutanten-Lokus in 202 weisen jedoch nicht auf einen Allelismus zu *cev1* hin.

Die Isolierung weiterer *Arabidopsis*-Mutanten wie *cet1-1* und *cet3-1* (*constitutive expression of the thionin gene*), *cex1-1* (*constitutive expression of JA-regulated genes1*) sowie *joe1-1* (*jasmonate overexpressing1*) deutet ebenso auf eine durch erhöhte Akkumulation von JA oder OPDA (12-oxo-phytodienoic-acid) verursachte konstitutive Expression JA-abhängiger Gene hin und liefert damit Hinweise für eine mögliche Identität negativer Regulatoren der JA-vermittelten Abwehr (Hilpert *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2002).

Die Untersuchung der Genexpression der putativen Mutante 242 zeigt eine konstitutive Expression von *PR1* (Abb. C-26). Interessanterweise ist die in den Wasser-behandelten Proben beobachtete konstitutive *PR1*-Transkriptakkumulation zwischen 12 h und 72 h nicht mehr nachzuweisen. Es scheint jedoch, dass die Pathogen-induzierte *PR1*-Expression der putativen Mutante 242 in diesem Zeitraum mit der in *pen2* vergleichbar ist. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass der während der Pathogen-Inkubation experimentell bedingte Wasserstress nach 12 h zu einer Unterdrückung der konstitutiven *PR1*-Expression in der putativen Mutante 242 führt, welcher jedoch möglicherweise keinen Effekt auf die Pathogen-induzierte *PR1*-Transkriptakkumulation hat. Hinweise auf eine von der Substratbewässerung bzw. Luftfeuchtigkeit abhängige konstitutive *PR*-Genexpression lieferte bereits die Mutante *cpn1-1* (*copine1*; Jambunathan *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass eine Mutation in *CPN1* in Abhängigkeit von der Wasserverfügbarkeit der Mutante spontane Läsionen, eine beschleunigte HR sowie eine erhöhte Pathogenresistenz zur Folge hat. Die Isolierung von *CPN1*, welches für ein Kalzium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein kodiert, deutet daher auf eine mögliche Koregulation der Aktivierung von Abwehrreaktionen und der Adaption an unterschiedliche abiotische Stimuli hin (Jambunathan & McNellis, 2003; Liu *et al.*, 2005).

Des Weiteren scheint die konstitutive *PR1*-Expression mit einem spontanen HR-Phänotyp in der putativen Mutante 242 zu korrelieren. In Übereinstimmung damit steht der für eine Reihe von *Arabidopsis*-Mutanten, den sogenannten LM (*lesion mimic*)-Mutanten beschriebene Zusammenhang der konstitutiven Expression von Abwehrmechanismen und der Ausprägung spontaner Läsionen (Lorrain *et al.*, 2003). Außerdem wurde für eine große Zahl der LM-Mutanten eine erhöhte Pathogenresistenz gezeigt. Darüber hinaus demonstrierten genetische Analysen, dass für einige dieser LM-Mutanten die Akkumulation von SA notwendig für die Ausprägung der

spontanen Läsionen sowie der erhöhten Resistenz gegen virulente Pathogene ist. In anderen LM-Mutanten hingegen scheint eine Unterdrückung der SA-Akkumulation zu einer Beeinträchtigung der *PR*-Genexpression sowie der Pathogenresistenz, jedoch nicht zur Suppression der spontanen Läsionen zu führen (Hunt *et al.*, 1997; Rate & Greenberg, 2001).

Eine Untersuchung der SA-Abhängigkeit der konstitutiven *PR1*-Genexpression und der verstärkten HR nach *P. infestans*-Infektion in der putativen Mutante 242 würde daher weiteren Aufschluss über einen möglichen Zusammenhang von SA-Akkumulation und der in dieser Linie beobachteten Phänotypen geben.

Hinsichtlich der HR-Ausprägung nach Pathogenbefall sind unterschiedliche Effekte in LM-Mutanten beschrieben worden. Es wurde gezeigt, dass LM-Mutanten wie z. B. *lsd2* - *lsd5*, *dli* (*disease-like lesions1*) und *acd5* (*accelerated cell death5*) nach Infektion mit avirulenten Pathogenen mit einer Wildtyp-ähnlichen Ausprägung von HR und Pathogenresistenz reagieren (Lorrain *et al.*, 2003).

Für die LM-Mutanten *lsd1*, *acd1* und *acd2* wurde hingegen das Phänomen des *runaway cell death* (RCD), d. h. die durch endogene oder exogene Faktoren ausgelöste unkontrollierte HR sowie erhöhte Pathogenresistenz gezeigt (Dietrich *et al.*, 1994; Greenberg *et al.*, 1994). Des Weiteren scheint in einigen LM-Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp bereits die Inokulation mit niedrigeren Pathogendichten eine HR auszulösen (Greenberg *et al.*, 1994).

In welchem Ausmaß der spontane HR-Phänotyp bzw. die konstitutive *PR*-Genexpression in der putativen Mutante 242 eine verstärkte Anfälligkeit gegen *P. infestans* bewirkt, d. h. ob im Vergleich zu *pen2* eine erhöhte Penetrations-Häufigkeit auftritt, konnte auf Grund des starken Mesophyll-Zelltods experimentell nicht ermittelt werden. Alternativ dazu könnte durch *real time*-PCR ein potentiell verstärktes *P. infestans*-Wachstum, welches möglicherweise lichtmikroskopisch nicht erkennbar ist, durch Quantifizierung der *P. infestans*-Biomasse nachgewiesen werden.

Die Kombination von *pen2* und der Sekundärmutation 242 oder 272 führt zum Verlust der Resistenz gegen *Alternaria brassicicola*

Um eine Beteiligung der für den veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp in den putativen Mutanten verantwortlichen Faktoren an der Ausprägung der Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene zu untersuchen, erfolgte die Infektion mit *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea*.

Die *A. brassicicola*-Infektion von *gl1* und *pen2* verlief ohne sichtbare Symptome, was zu der Annahme führt, dass die Ausprägung der Resistenz gegen *A. brassicicola* unabhängig von *PEN2* ist (Abb. C-28). Die Inokulation der putativen Mutanten 242 und 272 zeigte jedoch, dass die Sekundärmutationen 242 und 272 zu einer Anfälligkeit für *A. brassicicola* führen (Abb. C-28). Da *A. brassicicola* in der Lage ist, in beiden mutanten Linien erfolgreich zu sporulieren, ist davon auszugehen, dass die Resistenz gegen dieses nekrotrophe Pathogen durch Kombination von *pen2* mit der Sekundärmutation 242 oder 272 überwunden werden kann. An dieser Stelle ist zu

erwähnen, dass in der Literatur hinsichtlich der Resistenzausprägung im Pathosystem *A. thaliana* – *A. brassicicola* unterschiedliche Beobachtungen beschrieben worden sind (Van Wees *et al.*, 2003; Kagan & Hammerschmidt, 2002; Glazebrook, 2005). Als Grund dafür ist beispielsweise denkbar, dass die Inokulation hoher Pathogendichten oder eines virulenteren *A. brassicicola*-Isolats in einigen *Arabidopsis*-Ökotypen Symptome hervorrufen kann und in anderen Ökotypen nicht. Die Einstufung dieses Pathosystems in eines der Konzepte der pflanzlichen Pathogenresistenz erscheint daher schwierig.

Die in den putativen Mutanten 242 und 272 beeinträchtigte Resistenz gegen die phylogenetisch entfernten Pathogene *P. infestans* und *A. brassicicola* deutet darauf hin, dass die Faktoren 242 und 272 möglicherweise eine Funktion in der Ausprägung der Resistenz gegen ein breiteres Spektrum an Pathogenen haben könnten. Unterstützt wird diese Annahme, durch die zumindest in der putativen Mutante 272 ebenfalls beobachtete erhöhte Anfälligkeit für *B. cinerea*.

Für die Sekundärmutationen 190, 202 und 303 wurde ebenso ein Effekt auf die Resistenz gegen *A. brassicicola* gezeigt, jedoch scheint dieser im Vergleich zu den Sekundärmutationen 242 und 272 von geringerem Ausmaß zu sein (Abb. C-28).

Die Untersuchung der Interaktion *A. thaliana* – *B. cinerea* in den putativen Mutanten demonstriert, dass die konstitutive Expression von *PDF1.2* mit einer im Vergleich zu *pen2* deutlich schwächeren Induzierung der HR nach *B. cinerea*-Infektion in der Mutante 202 korreliert (Abb. C-26; Abb. C-29). In Übereinstimmung damit steht die Annahme, dass die JA/ET-abhängige Signaltransduktion, welche z. B. die Aktivierung der *PDF1.2*-Expression zur Folge hat, für eine effiziente Abwehr nekrotropher Pathogene notwendig ist (Thomma *et al.*, 1998). Die aufgrund der konstitutiven *PDF1.2*-Expression in der Mutante 202 bereits aktivierte Abwehr könnte daher auch eine Ursache für die nach *A. brassicicola*-Infektion dieser Mutante im Gegensatz zu *pen2* beobachteten schwachen HR sein. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die schwachen nekrotischen Reaktion der putativen Mutante 202 nach *A. brassicicola*-Infektion die Folge von Pathogenanfälligkeit sind, was darauf hindeuten würde, dass die konstitutive *PDF1.2*-Expression einerseits mit einer reduzierten Resistenz gegen *A. brassicicola* und andererseits mit einer erhöhten Resistenz gegen *B. cinerea* korreliert. In Analogie dazu ist beschrieben worden, dass die Mutante *pad3-1* anfällig für *A. brassicicola* jedoch nicht für *B. cinerea* ist, was einen Hinweis dafür liefert, dass die Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene neben generellen auch durch Pathogen-spezifische Abwehrmechanismen beeinflusst wird (Thomma *et al.*, 1999b).

Da in der Literatur bereits unterschiedliche Gene beschrieben worden sind, wie z. B. *PAD2* und *COI1*, die einen Einfluss auf die Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene wie *A. brassicicola* haben, kann vermutet werden, dass diese Faktoren potentielle Kandidaten für die Sekundärmutation in den putativen Mutanten mit erhöhter Anfälligkeit nach *A. brassicicola*-Infektion sein könnten. Es wurde gezeigt, dass eine Mutation in unterschiedlichen *PAD*-Loci neben der verringerten oder fehlenden Akkumulation des *Arabidopsis*-Phytoalexins Camalexin auch eine

Beeinträchtigung der Resistenz gegen *A. brassicicola* aber auch gegen biotrophe Pathogene zur Folge hat (Glazebrook *et al.*, 1997a; Glazebrook & Ausubel, 1994; Van Wees *et al.*, 2003). Studien von Kagan & Hammerschmidt (2002) verdeutlichen jedoch, dass das Indol-Derivat Camalexin nicht der Schlüssel-Faktor in der Resistenz gegen *A. brassicicola* zu sein scheint. So wurde gezeigt, dass sowohl resistente als auch suszeptible *Arabidopsis*-Ökotypen hinreichende Camalexin-Mengen produzieren, um das *A. brassicicola*-Wachstum *in vitro* effizient zu hemmen. Aufgrund der Tatsache, dass die Mutante *pad2-1* neben einer erhöhten Anfälligkeit für *A. brassicicola* auch eine verstärkte HR nach Infektion mit *P. infestans* zeigt (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Sekundärmutationen 242, 272 oder 303 möglicherweise in *PAD2* lokalisiert ist. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die Mutante *pad2-1* (Ferrari *et al.*, 2003) wie auch die putativen Mutanten 272 und 303 eine erhöhte Anfälligkeit für *B. cinerea* zeigen. Diese Beobachtung lässt es auf der anderen Seite unwahrscheinlich erscheinen, dass es sich bei der Sekundärmutation 242 um *PAD2* handelt, da die Untersuchung der Resistenz der Mutante 242 nach *B. cinerea*-Infektion nicht auf eine Anfälligkeit hindeutete. Interessanterweise wurde ebenso demonstriert, dass *PAD2* eine Funktion in der Ausprägung der Resistenz von *Arabidopsis* gegen den Oomyzeten *Phytophthora brassicae* hat (Roetschi *et al.*, 2001). Der gegenwärtig noch unbekannte *PAD2*-abhängige Resistenzmechanismus gegen *P. brassicae* scheint jedoch unabhängig von SA-, JA- und ET-regulierten Abwehrreaktionen zu sein. Da *PAD2* wahrscheinlich auch in der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* beteiligt ist (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung), könnte angenommen werden, dass *PAD2* möglicherweise eine Funktion in der basalen Abwehr von Oomyzeten-Pathogenen hat.

Ein potentieller Kandidat für die Sekundärmutation 272 bzw. 303 stellt *COI1* dar. Es wurde demonstriert, dass die Mutation *coi1-1* zu einer erhöhten Anfälligkeit sowohl für *A. brassicicola* als auch für *B. cinerea* führt (Penninckx *et al.* 1996; Thomma *et al.* 1998). Jedoch ist zu erwähnen, dass die putativen Mutanten 272 und 303 keine Störung der Fertilität zeigen, die Mutante *coi1-1* hingegen ist männlich steril.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Mutationen in *BOS* (*BOTRYTIS-SUSCEPTIBLE*)-Genen sowie eine Mutation in *ESA1* (*ENHANCED SUSCEPTIBILITY to ALTERNARIA*) ebenfalls zu einer beeinträchtigten Resistenz gegen *A. brassicicola* und *B. cinerea* führen und somit ebenso für die Identität der Sekundärmutationen in Frage kommen könnten (Mengiste *et al.*, 2003 Veronese *et al.*, 2004). Interessanterweise führt die Mutation in *BOS1* neben der erhöhten Anfälligkeit für *A. brassicicola* und *B. cinerea* auch zu verstärkten Krankheitssymptomen nach Infektion mit dem biotrophen Oomyzeten *Hyaloperonospora parasitica*. Es ist demnach davon auszugehen, dass die mit den Sekundärmutationen korrespondierenden Gene für Faktoren kodieren, welche zusätzlich zur Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* auch in der Resistenz gegen die nekrotrophen Pathogene *A. brassicicola* und/oder *B. cinerea* involviert sind.

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Etablierung des Nichtwirts-Pathosystems *Arabidopsis thaliana* – *Phytophthora infestans* sowie die Analyse unterschiedlicher bereits bekannter Mutanten im *pen2*-Hintergrund und zum anderen die Isolation und Charakterisierung von putativen *A. thaliana*-Mutanten mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach *P. infestans*-Infektion.

Durch die zytologische Untersuchung der Interaktion mit *P. infestans* wurde gezeigt, dass unterschiedliche Abwehrreaktionen, wie Zellwandauflagerungen und die Akkumulation von autofluoreszierenden Komponenten sowie von H₂O₂ während der Abwehr von *P. infestans* induziert sind. Dabei scheint es, dass die mit der HR assoziierte Abwehrreaktion für die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* von untergeordneter Bedeutung ist. Es ist daher anzunehmen, dass das Vordringen von *P. infestans* effizient durch das Zusammenspiel von konstitutiven Barrieren und induzierbaren, HR-unabhängigen Abwehrreaktionen in der Zellperipherie verhindert wird. Ebenso wurde demonstriert, dass die mit PEN1, als zentrales Element der Zellperipherie-assoziierten Penetrationsresistenz gegen Gerstemehltau, verbundenen Vesikelfusions-Prozesse für die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* nicht von Bedeutung sind.

Die Untersuchung der Mutante *pen2* zeigte, dass der Verlust der Funktion von PEN2 eine erhöhte Penetrations-Häufigkeit sowie eine Verstärkung von Abwehrreaktionen nach *P. infestans*-Infektion zur Folge hat. Des Weiteren kann angenommen werden, dass erst nach dem Verlust der Funktion von PEN2 die Potenzierung einer mit der HR assoziierten Abwehr erfolgt.

Studien der PR-Genexpression deuten auf eine frühe Induzierung der JA-abhängigen Abwehr nach *P. infestans*-Infektion, welche jedoch in *pen2* im Vergleich zu *g1* verstärkt ist. Nach Analyse unterschiedlicher Signaltransduktionsmutanten im *pen2*-Hintergrund kann aber angenommen werden, dass die JA-regulierte Abwehr sowie die Fähigkeit zur SA-Akkumulation für die Resistenzausprägung von *A. thaliana* gegen *P. infestans* nicht limitierend sind. Die Mutantenanalysen deuteten außerdem auf eine Beteiligung von EDR1 und PAD4 an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in *A. thaliana* hin. Dabei scheint EDR1 die *pen2*-abhängige HR nach *P. infestans*-Infektion negativ zu regulieren. Im Gegensatz dazu ist anzunehmen, dass PAD4 ein positiver Regulator der *P. infestans*-induzierten HR in *Arabidopsis* ist.

Nach Durchmusterung der etwa 70 000 Pflanzen umfassenden M2-Nachkommenschaft einer remutagenisierten *pen2*-Population wurden 26 putative Mutanten isoliert, die eine im Vergleich zu *pen2* potenzierte Ausprägung der HR nach *P. infestans*-Infektion zeigen. Für die putativen Mutanten 190, 202, 222, 242, 266, 272 und 303 wurde gezeigt, dass die Zelltod-Häufigkeit sowie die H₂O₂-Akkumulation nach *P. infestans*-Infektion im Vergleich zu *pen2* erhöht ist. Die Einführung der Sekundärmutationen 202 und 222 führt zu einer weiteren Erhöhung der Penetrations-

Häufigkeit über das für *pen2* beobachtete Niveau hinaus, ohne jedoch eine signifikant veränderte zelluläre Entwicklung von *P. infestans* zu ermöglichen. Die mikroskopische Analyse der putativen Mutanten 190, 242, 266, 272 und 303 deutet jedoch auch in diesen Linien auf eine mit der zellulären Entwicklung von *P. infestans* in *pen2* vergleichbare Differenzierung des Oomyzeten hin. Nach Untersuchung der Interaktion der putativen Mutanten 190, 242, 272 und 303 bzw. der Mutanten 202 und 222 mit den nekrotrophen Pathogenen *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* kann geschlossen werden, dass die mit den Sekundärmutationen korrespondierenden Faktoren auch in der Resistenzausprägung gegen mindestens ein weiteres Pathogen involviert sind. In den putativen Mutanten 242 und 272 scheint zudem die Resistenz gegen *A. brassicicola* überwunden zu sein.

Erste Experimente zur Grobkartierung der Mutante 222 deuten darauf hin, dass die Sekundärmutation 222 auf Chromosom 3 lokalisiert ist. Die in der Grobkartierung des Mutationsortes 222 gefundene Kopplung mit dem SSLP-Marker CIW4 liefert darüber hinaus einen Hinweis dafür, dass die Sekundärmutation 222 auf dem unteren Arm von Chromosom 3 lokalisiert ist.

F Literatur

Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B.J., Daniels, M.J., Parker J.E. (1998) Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R-gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **17**: 10306-10311

Abramovitch, R.B. and Martin, G.B. (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 356–364

Adam, L. and Somerville S.C. (1996) Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **9**: 341-356

Aderem, A. and Ulevitch, R. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**: 782-787

Aist, J.R. and Bushnell, W.R. (1991) Invasion of plants by powdery mildew fungi, and cellular mechanism of the resistance. *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals* (Cole, G.T. and Hoch, H.C., eds) New York: Plenum Press 321-345

Alfano, J.R. and Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol*. **42**: 385-414

Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**: 773-784

Ameisen, J.C. (2002) On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* **4**: 367-393

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., Thordal-Christensen, H. (2004) The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Mol Biol Cell* **15**: 5118-5129

Atkinson, M.M., Midland, S.L., Sims, J.J., Keen, N.T. (1996) Syringolide 1 triggers Ca²⁺ influx, K⁺ efflux, and extracellular alkalization in soybean cells carrying the disease resistance gene Rpg4. *Plant Physiol*. **112**: 297-302

Austin, M.J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B.J., Jones, J.D., Parker, J.E. (2002) Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science* **295**: 2077-2080

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., Stuhl, K. (1997) *Short Protocols in Molecular Biology*, 3. Ausgabe, John Wiley, New York

Aviv, D. H., Rusterucci, C., Holt, B.F. 3rd, Dietrich, R.A., Parker, J.E., Dangl, J.L. (2002) Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *lsd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. *Plant J* **29**: 381-391

Axtell, M.J., and Staskawicz, B.J. (2003) Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the *AvrRpt2*-directed elimination of *RIN4*. *Cell* **112**: 369-377

Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., Schulze-Lefert, P. (2002) The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* **295**: 2073-2076

Bais, H.P., Prithiviraj, B., Jha, A.K., Ausubel, F.M., Vivanco, J.M. (2005) Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* **434**: 217-221

Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I., Doolittle, W.F. (2000) A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**: 972-977

Bhat, R.A., Miklis, M., Schmelzer, E., Schulze-Lefert, P., Panstruga, R. (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3135-40

Beers, E.P. and McDowell, J.M. (2001) Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 561-567

Bendahmane, A., Farnham, G., Moffett, P., Baulcombe, D.C. (2002) Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. *Plant J* 2002 **32**: 195-204

Bent, A.F., Innes, R.W., Ecker, J.R., Staskawicz, B.J. (1992) Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**: 372-378

Bent, A.F. (2001) Plant mitogen-activated protein kinase cascades: Negative regulatory roles turn out positive. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 784-786

Belkhadir, Y., Subramaniam, R., Dangl, J.L. (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 391-399

Bell, C.J. and Ecker, J.R. (1994) Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**: 137-144

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523

Blatt, M.R., Grabov, A., Brearley, J., Hammond-Kosack, K., Jones, J.D. (1999) K⁺ channels of Cf-9 transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *Plant J* **19**: 453-462

Blume, B., Nürnberg, T., Nass, N., Scheel, D. (2002) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**: 1425–1440

Boller, T. (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 189-214

Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibayeva, F. (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* **53**: 1367-1376

Bonas, U. and Lahaye, T. (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol* **1**: 44 - 50

Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J. (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30

Brown, I., Trethowan, J., Kerry, M., Mansfield, J., Bolwell, G.P. (1998) Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant J* **15**: 333-344

Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, S., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., Nürnberg, T. (2002) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *EMBO J* **21**: 6681-6688

Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., Dong, X. (1994) Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **6**: 1583-1592

Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., Dong, X. (1997) The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**: 57-63

Century, K.S., Holub, E.B., Staskawicz, B.J. (1995) NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6597-6601

Century, K.S., Shapiro, A.D., Repetti, P.P., Dahlbeck, D., Holub, E., Staskawicz, B.J. (2002) NDR1, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. *Science* **278**: 1963-1965

Chandra-Shekara, A.C., Navarre, D., Kachroo, A., Kang, H.G., Klessig, D., Kachroo, P. (2004) Signaling requirements and role of salicylic acid in HRT- and rrt-mediated resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis*. *Plant J* **40**: 647-659

Cheong, J.-J. and Choi, Y.D. (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genetics* **19**: 409-413

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159

Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M., Dong, X. (2000) Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 2175-2190

Cohn, J., Sessa, G. and Martin, G.B. (2001) Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* **13**: 55-62

Collins, N.C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J.L., Huckelhoven, R., Stein, M., Freialdenhoven, A., Somerville, S.C., Schulze-Lefert, P. (2003) SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* **425**: 973-997

Collmer, A. (1998) Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 329-335

Cooley, M.B., Pathirana, S., Wu, H.J., Kachroo, P., Klessig, D.F. (2000) Members of the *Arabidopsis* HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell* **12**: 663-676

Coppinger, P., Repetti, P.P., Day, B., Dahlbeck, D., Mehlert, A., Staskawicz, B.J. (2004) Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **40**: 225-237

Cutt, J.R. and Klessig, D.F. (1992) Pathogenesis-related proteins. In *Genes Involved in Plant Defense* (Bollert, T. and Meins, F., eds), 209-243, Springer Verlag

Dangi, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-1807

Dangi, J.L. and Jones, J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833

Dat, J.F., Pellinen, R., Beeckman, T., Van De Cotte, B., Langebartels, C., Kangasjarvi, J., Inze, D., Van Breusegem, F. (2003) Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J* **2003** **4**: 621-632

Day, B., Dahlbeck, D., Huang, J., Chisholm, S.T., Li, D., Staskawicz, B.J. (2005) Molecular Basis for the RIN4 Negative Regulation of RPS2 Disease Resistance. *Plant Cell* **17**: 1292-1305

Delaney, T., Uknés, S., Vernooy, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. (1994) A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science* **266**: 1247-1250

Delaney, T.P., Friedrich, L., Ryals, J.A. (1995) Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U SA* **92**: 6602-6606

Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., 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/leucin zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* **15**: 2181-2191

Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xiem, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., Turner, J.G. (2002) COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *Plant J* **32**: 457-466

Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.S., Chilcott, C., Zhu, T., Turner, J.G. (2005) Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* **58**: 497-513

Devoto, A. and Turner, J.G. (2005) Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network. *Physiol Plant* **123**: 161-172

Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknés, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., Dangl, J.L. (1994) Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**: 565-577

Dittgen, J. (2005) Genetische Analyse der Nichtwirtsresistenz gegenüber biotrophen Mehltäupilzen in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Universität zu Köln

Doke, N. (1975) Prevention of the hypersensitive reaction of potato cells to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* by constituents of the zoospores. *Physiol Plant Pathol* **7**: 1-7

Dong, X. (2001) Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 309-314

Dong, X. (2004) NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 547-527

Donofrio, N.M. and Delaney, T.P. (2001) Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defence-compromised *Arabidopsis nim1-1* and salicylate hydroxylase-expressing plants. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 439-50

Dow, M., Newman, M.A. and von Roepenack, E. (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol* **38**: 241-261

Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10328-10333

Ebel, J. and Mithöfer, A. (1998) Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**: 335–348

Ebel, J. and Scheel, D. (1997). Signals in host-parasite interactions. In *The Mycota. Plant Relationships, Part A*, G.C. Carroll and P. Tudzynski, eds. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 85-105

Ehness, R., Ecker, M., Godt, D.E., Roitsch, T. (1997) Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defence mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* **9**: 1825–1841

Ellis, C. and Turner, J.G. (2001) The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* **13**: 1025-1033

Ellis, C., Karayannidis, I., Wasternack, C., Turner, J.G. (2002) The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**: 1557-1566

Epple, P., Mack, A.A., Morris, V.R., Dangl, J.L. (2003). Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in *Arabidopsis* by two related, plant-specific zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6831-6836

Eulgem, T. (2005) Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci* **10**: 71-78

Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D., Daniels, M.J., Parker, J.E. (1999) EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3292-3297

Fan, W. and Dong, X. (2002) In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 1377-1389

Felix, G., Regenass, M., Boller, T. (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a factory state. *Plant J* **4**: 307–316

Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N., Deng, X.W. (2003) The COP9 signalosome interacts physically with SCFCOI1 and modulates jasmonate responses. *Plant Cell* **15**: 1083-1094

Felix, G. and Boller, T. (2003) Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem* **278**: 6201-6208

Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M. (2003) Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant J* **35**: 193-205

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

Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.-A., Parker, J.E. (2001) Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J* **20**: 5400-5411

Feys, B., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.A., Medina-Escobar, N., Neu, C., da Cruz-Cabral, A., Parker, J.E. (2005) Arabidopsis SAG101 stabilizes and signals within an EDS1 complex in plant innate immunity. *Plant Cell*; submitted

Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275-296

Freialdenhoven, A., Peterhansel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F., 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**: 5-14

Frye, C.A. and Innes, R.W. (1998) An Arabidopsis mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell* **10**: 947-956

Frye, C.A., Tang, D., Innes, R.W. (2001) Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 373-378

Fry, W.E. and Goodwin, S.B. (1997) Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Dis.* **81**: 1349-1357

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknas, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754-755

Galan, J.E. and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322-1328

Gelli, A., Higgins, V.J., Blumwald, E. (1997) Activation of plant plasma membrane Ca²⁺-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* **113:** 269-279

Glazebrook, J. and Ausubel, F.M. (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **91:** 8955-8959

Glazebrook, J., Rogers, E.E., Ausubel, F.M. (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143:** 973-982

Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I., Holub, E., Hammerschmidt, R., Ausubel, F.M. (1997a) Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* **146:** 381-392

Glazebrook, J., Rogers, E.E., Ausubel, F.M. (1997b) Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annu Rev Genet* **31:** 547-569

Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Metraux, J.P., Zhu, T., Katagiri, F. (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J* **2:** 217-228

Glazebrook, J. (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* [Epub ahead of print]

Gornhardt, B., Rouhara, I., Schmelzer, E. (2000) Cyst germination proteins of the potato pathogen *Phytophthora infestans* share homology with human mucins. *Mol. Plant Microbe Interact* **13:** 32-42

Granado, J., Felix, G., Boller, T. (1995) Perception of fungal sterols in plants. Subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalinization in tomato cells. *Plant Physiol* **107:** 485-490

Grant, M. and Mansfield, J. (1999) Early events in host-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* **2:** 312-319

Gray, W.M., Muskett, P.R., Chuang, H.W., Parker, J.E. (2003) *Arabidopsis SGT1b* is required for SCF(TIR1)-mediated auxin response. *Plant Cell* **15:** 1310-1319

Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F., Ausubel, F.M. (1994) Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77:** 551-563

Guo, H. and Ecker, J.R. (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol* **7:** 40-49

Halim, V.A., Hunger, A., Macioszek, V., Landgraf, P., Nürnberger T., Scheel, D., Rosahl, S. (2004) The oligopeptide elicitor Pep-13 induces salicylic acid-dependent and –independent defense reactions in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **64**: 311-318

Hammond-Kosack, K.E. and Parker, J.E. (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol* **2**: 177-193

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099-1103

Heath, M.C. (1996) Plant resistance to fungi. *Can J Plant Pathol* **18**: 469-475

Heath, M.C. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 315-319

Heck, S., Grau, T., Buchala, A., Metraux, J.P., Nawrath, C. (2003) Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the *Arabidopsis*-*Pseudomonas syringae* pv tomato interaction. *Plant J* **36**: 342-352

Heo, W.D., Lee, S.H., Kim, M.C., Kim, J.C., Chung, W.S., Chun, H.J., Lee, K.J., Park, C.Y., Park, H.C., Choi, J.Y. Cho, M.J. (1999) Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 766-771

Hilpert, B., Bohlmann, H., op den Camp, R.O., Przybyla, D., Miersch, O., Buchala, A., Apel, K. (2001) Isolation and characterization of signal transduction mutants of *Arabidopsis thaliana* that constitutively activate the octadecanoid pathway and form necrotic microlesions. *Plant J* **26**: 435–446

Holub, E.B. and Cooper, A. (2004) Matrix, reinvention in plants: how genetics is unveiling secrets of non-host disease resistance. *Trends Plant Sci* **9**: 211-214

Holt, B.F. 3rd, Hubert, D.A., Dangl, J.L. (2003) Resistance gene signaling in plants--complex similarities to animal innate immunity. *Curr Opin Immunol* **1**: 20-25

Hubert, D.A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K. and Dangl, J.L. (2003) Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *EMBO J* **22**: 5679–5689

Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C., Kogel, K. H. (1999) Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol* **119**: 1251–1260

Hülskamp, M., Misera, S., Jürgens, G. (1994) Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* **76**: 555-566

Huitema, E., Vleeshouwers, V. G. A. A., Francis, D. M., Kamoun, S. (2003) Active defence responses associated with non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* *Mol Plant Pathol* **4**: 487-500

Huitema, E., Bos., J.I., Tian, M., Win, J., Waugh, M.E., Kamoun, S. (2004) Linking sequence to phenotype in *Phytophthora*-plant interactions. *Trends Microbiol* **12**: 193-200

Huitema, E., Vleeshouwers, V.G., Cakir, C., Kamoun, S., Govers, F. (2005) Differences in intensity and specificity of hypersensitive response induction in *Nicotiana* spp. by INF1, INF2A, and INF2B of *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact.* **18**: 183-193

Hunt, M.D., Delaney, T.P., Dietrich, R.A., Weymann, K.B., Dangl, J.L., Ryals, J.A. (1997) Salicylate-independent lesion formation in *Arabidopsis* *lsd* mutants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 531-536

Imler, J.L. and Hoffmann, J.A. (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol* **11**: 304-311

Jabs, T., Dietrich, R.A., Dangl, J.L. (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**: 1853-1856

Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1997) Elicitorstimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **94**: 4800-4805

Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., Fincher, G.B. (2003) An *Arabidopsis* Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *Plant Cell* **15**: 2503-2513

Jambunathan, N., Siani, J.M., McNellis, T.W. (2001) A humidity-sensitive *Arabidopsis* copine mutant exhibits precocious cell death and increased disease resistance. *Plant Cell* **13**: 2225-2240

Jambunathan, N. and McNellis, T.W. (2003) Regulation of *Arabidopsis* COPINE 1 gene expression in response to pathogens and abiotic stimuli. *Plant Physiol* **132**: 1370-1381

Jander, G., Norris, S.R., Rounsley, S.D., Bush, D.F., Levin, I.M., Last, R.L. (2002) *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol* **129**: 440-450

Jensen, A.B., Raventos, D., Mundy, J. (2002) Fusion genetic analysis of jasmonate-signaling mutants in *Arabidopsis*. *Plant J* **29**: 595-606

Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* **19**: 4004-4014

Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., Glazebrook, J. (1999) *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13583-13588

Johnson, C., Boden, E., Arias, J. (2003) Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 1846-1858

Jones, D.A. and Takemoto, D. (2004) Plant innate immunity—direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Curr Opin Immunol* **16**: 48–62

Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L., Hirt, H. (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 415-424

Jones, D.A. and Jones, J.D.G. (1997) The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. *Adv Bot Res* **24**: 89-167

Jones, J.D. (2001) Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 281-287

Judelson, H.S., Tyler, B.M., Michelmore, R.W. (1991) Transformation of the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact* **4**: 602-607

Jurkowski, G.I., Smith, R.K. Jr., Yu, I.C., Ham, J.H., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Fengler, K.A., Bent, A.F. (2004) *Arabidopsis* DND2, a second cyclic nucleotide-gated ion channel gene for which mutation causes the "defense, no death" phenotype. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 511-520

Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E.J., Klessig, D.F. (2001) A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9448-9453

Kachroo, A., He, Z., Patkar, R., Zhu, Q., Zhong, J., Li, D., Ronald, P., Lamb, C., Chattoo, B.B. (2003) Induction of H₂O₂ in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. *Transgenic Res* **5**: 577-586

Kagan, I.A. and Hammerschmidt, R. (2002) *Arabidopsis* ecotype variability in camalexin production and reaction to infection by *Alternaria brassicicola*. *J Chem Ecol* **28**: 2121-2140

Kajava, A.V. (1998) Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J Mol Biol* **277**: 519-527

Kamoun, S., van West, P., Vleeshouwers, V.G., de Groot, K.E., Govers, F. (1998) Resistance of *nicotiana benthamiana* to *phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* **9**: 1413-1426

Kamoun, S., Huitema, E., Vleeshouwers, V.G. (1999) Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci* **4**: 196-200

Kamoun, S. (2001) Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 295-300

Kang, L., Li, J., Zhao, T., Xiao, F., Tang, X., Thilmony, R., He, S., Zhou, J.M. (2003) Interplay of the *Arabidopsis* nonhost resistance gene NHO1 with bacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3519-3524

Kanzaki, H. (2003) Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol* **4**: 383-391

Khush, R.S. and Lemaitre, B. (2000). Genes that fight infection - what the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends Genet* **16**: 442-449

Kim, M.C., Panstruga, R., Elliott, C., Muller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C., Cho, M.J., Schulze-Lefert, P. (2002) Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* **416**: 447-451

Kim, M.G., Cunha, L.D., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., Mackey, D. (2005) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**: 749-759

Kitagawa, K., Skowyra, D., Elledge, S.J., Harper, J.W., Hieter, P. (1999) SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol Cell* **4**: 21-33

Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. Silva, H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8849-8855

Kloek, A.P., Verbsky, M.L., Sharma, S.B., Schoelz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F. Kunkel, B.N. (2001) Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (coi1) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J* **26**: 509-522

Klüsener, B. and Weiler, E.W. (1999) Pore-forming properties of elicitors of plant defense reactions and cellulolytic enzymes. *FEBS Lett* **459**: 263-266

Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T., Kunoh, H. (1997) Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant Journal* **11**: 525-537

Kobe, B. and Deisenhofer, J. (1994) The leucine-rich repeat: A versatile binding motif. *Trends Biochem* **19**: 415-421

Kombrink, E. and Somssich, I. E. (1995) Pathogenesis-related proteins and plant defense. In *Plant Relationships*, 6 (Carroll, G. and Tudzynski, P., eds). Berlin: Springer Verlag, 107-128

Koornneef, M., Dellaert, L.W., van der Veen, J.H. (1982) EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutat Res.* **93**: 109-123

Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberg, T., Gäbler, Y., Lee, J., Scheel, D. (2003) Mitogen-activated protein kinase play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J. Biol Chem* **278**: 2256-2264

Kunkel, B.N. and Brooks, D.M. (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 325-331

Lam, E., Kato, N., Lawton, M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**: 848-853

Lam, E. (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 305-315

Lamb, C. and Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275

Li, J., Brader, G., Palva, E.T. (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* **16**: 319-331

Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H. and Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**: 2054-2057

Lim, M.T. and Kunkel, B.N. (2004) The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 promotes virulence independently of RIN4, a predicted virulence target in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **40**: 790-798

Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S., Schulze-Lefert, P. (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science* **310**: 1180-1183

Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.W., Dinesh-Kumar, S.P. (2002) Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N genemediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**: 1483-1496

Liu, J., Jambunathan, N., McNellis, T.W. (2005) Transgenic expression of the von Willebrand A domain of the BONZAI 1/COPINE 1 protein triggers a lesion-mimic phenotype in Arabidopsis. *Planta* **221**: 85-94

Logemann, E., Wu, S.C., Schroder, J., Schmelzer, E., Somssich, I.E., Hahlbrock, K. (1995) Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in Petroselinum crispum is correlatated with repression of cell cycle-related genes. *Plant J* **8**: 865–876

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165-178

Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., Solano, R. (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **7**:1938-1950

Lorrain, S., Vailleau, F., Balagué, C., Roby, D. (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci* **8**: 263-271

Lu, M., Tang, X., Zhou, J.M. (2001) Arabidopsis NHO1 is required for general resistance against Pseudomonas bacteria. *Plant Cell* **13**: 437-447

Lukowitz, W., Gillmor, C.S., Scheible, W.R. (2000) Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* **123**: 795-805

Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A., Dangl, J.L. (2002) RIN4 interacts with Pseudomonas syringae type III effector molecules and is required for RPM1 -mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**: 743-754

Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Dangl, J.L. (2003) Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**: 379-389

Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Cameron, R.K. (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature* **419**: 399-403

Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Gan, M.W., Spivey, R., Wu, T.Y., Earle, E.D., Tanksley, S.D. (1993) Map-based cloning of a protein-kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**: 1432-1436

Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Muller-Rober, B., Schulz, B. (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters - More than just detoxifiers. *Planta* **214**: 345-355

McDowell, J.M. and Dangl, J.L. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem Sci* **25**: 79-82

Medzhitov, R. and Janeway, C.A.J. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**: 295-298

Medzhitov, R. and Janeway, C.A.J. (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways *Immunol Rev* **173**: 89-97

Mellersh, D.G., Foulds, I.V., Higgins, V.J., Heath, M.C. (2002) H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant J* **29**: 257-268

Mellersh, D.G. and Heath, M.C. (2003) An investigation into the involvement of defense signaling pathways in components of the nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* to rust fungi also reveals a model system for studying rust fungal compatibility. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 398-404

Mendgen, K. and Hahn, M. (2002) Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci* **7**: 352-356

Moffett, P., Farnham, G., Peart, J., Baulcombe, D.C. (2002) Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *EMBO J* **17**: 4511-4519

Muskett, P.R., Kahn, K., Austin, M.J., Moisan, L.J., Sadanandom, A., Shirasu, K., Jones, J.D., Parker, J.E. (2002). *Arabidopsis RAR1* exerts rate-limiting control of R gene-mediated defenses against multiple pathogens. *Plant Cell* **14**: 979-992

Nandi, A., Krothapalli, K., Buseman, C.M., Li, M., Welti, R., Enyedi, A., Shah, J. (2003) *Arabidopsis* *sfd* mutants affect plastidic lipid composition and suppress dwarfing, cell death, and the enhanced disease resistance phenotypes resulting from the deficiency of a fatty acid desaturase. *Plant Cell* **15**: 2383-2398

Nandi, A., Welti, R., Shah, J. (2004) The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene *SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY 1* is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **16**: 465-477

Nawrath, C. and Métraux, J.P. (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**: 1393-1404

Nawrath, C., Heck, S., Parinthawong, N., 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**: 275-286

Nimchuk, Z., Rohmer, L., Chang, J.H., Dangl, J.L. (2001) Knowing the dancer from the dance: R-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 288-294

Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.H., Vogel, J.P., Edwards, H., Somerville, S.C. (2003) Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* **301**: 969-972

Nomura, K., Melotto, M., He, S.Y. (2005) Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 361-368

Norman-Setterblad, C., Vidal, S., Palva, E.T. (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 430-438

Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**: 449-460

Nürnberg, T. (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cell Mol Life Sci* **55**: 167-182

Nürnberg, T. and Scheel, D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* **8**: 372-379

Nürnberg, T., and 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**: 318-324

Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**: 249-266

Nürnberg, T. and Lipka, V. (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol* **6**: 335-345

Oliver, R. and Ipcho, S.V.S. (2004) *Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens *Mol Plant Pathol* **5**: 347-352

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

Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., Daniels, M.J. (1996) Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell* **8**: 2033-2046

Pearl, J.R., Lu, R., Sadanandom, A., Malcuit, I., Moffett, P., Brice, D.C., Schausler, L., Jaggard, D.A., Xiao, S., Coleman, M.J., Dow, M., Jones, J.D., Shirasu, K., Baulcombe, D.C. (2002) Ubiquitin ligaseassociated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10865-10869

Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., Broekaert, W.F. (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 2103-2113

Perfect, E.S. and Green, J.R. (2001) Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Mol. Plant Pathol* **2**: 101–108

Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattson, O., Jensen, A.B., Mundy, J. (2000) *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111-1120

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

Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K.M., Keurentjes, J.J.B., Verhagen, B.W.M., Knoester, M., Van der Sluis, I., Bakker, P.A.H.M., Van Loon, L.C. (2001) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *Eur J Plant Pathol* **107**: 51-61

Pieterse, C.M., Van Loon, L.C. (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 456-464

Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., Collins, N.C., Panstruga, R., Schulze-Lefert, P. (2002) The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol* **129**: 1076-1085

Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, I.P., Western, T.L., Jetter, R., Kunst, L., Samuels, A.L. (2004) Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**: 702-704

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

Pratt, W.B. and Toft, D.O. (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* **2**:111-133

Rate, D.N. and Greenberg, J.T. (2001) The *Arabidopsis* aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant J* **27**: 203–211

Ren, D., Yang, H., Zhang, S. (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**: 559-565

Reymond, P. and Farmer, E.E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 404-411

Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high ph as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**: 208-212

Robinson, L.H. and Cahill, D.M. (2003) Ecotypic variation in the response of *Arabidopsis thaliana* to *Phytophthora cinnamomi*. *Aust Plant Pathol*. **32**: 53–64

Roetschi, A., Si-Ammour, A., Belbahri, L., Mauch, F., Mauch-Mani, B. (2001) Characterization of an *Arabidopsis*–*Phytophthora* pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant J* **28**: 293–305

Rogers, S.O. and Bendich, A.J. (1988) Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol Biol Manual A6*: 1-10

Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R., Jones, J.D. (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J* **20**: 5556-5567

Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M.D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819

Salmeron, J.M., Oldroyd, G.E.D., Rommens, C.M.T., Scofield, S.R., Kim, H.S., Lavelle, D.T., Dahlbeck, D., Staskawicz, B.J. (1996) Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene-cluster. *Cell* **86**: 123-133

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. (ed.), Cold Spring Harbor New York

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

Sangster, T.A. and Queitsch, C. (2005) The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 86-92

Scheel, D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 305-310

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

Schulze-Lefert, P. (2004) Plant immunity: the origami of receptor activation. *Curr Biol* **1**: R22-24

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

Shah, J., Tsui, F., Klessig, D.F. (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA inducible expression of the tms2 gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**: 69-78

Shah, J., Kachroo, P., Klessig, D.F. (1999) The *Arabidopsis ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* **11**: 191-206

Shah, J., Kachroo, P., Nandi, A., Klessig, D.F. (2001) A recessive mutation in the *Arabidopsis SSI2* gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *Plant J* **25**: 563-574

Shah, J. (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 365-371

Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E., Innes, R.W. (2003) Cleavage of *Arabidopsis PBS1* by a bacterial type III effector. *Science* **5637**: 1230-1233

Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Mauch, F. (2003) Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: beta-aminobutyric acid but not BTH protects potato and *Arabidopsis* from infection. *Mol Plant Pathol* **4**: 237-248

Smart, M.G., Aist, J.R., Israel, H.W. (1986) Structure and function of wall appositions. 1. General histochemistry of papillae in barley (*Hordeum vulgare*) coleoptiles attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Can J Bot* **64**: 793-801

Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X., Pieterse, C.M. (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**: 760-770

Spurr, A. R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* **26**: 31-43

Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., Jones, J.D. (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**: 661-667

Staskawicz, B.J., Mudgett, M.B., Dangl, J.L., Galan, J.E. (2001) Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* **292**: 2285-2289

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

Stein, M., Dittgen, J., Sanchez-Rodriguez, C., Hou, B.H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V., Somerville, S. (2006) *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP Binding Cassette Transporter, Contributes to Nonhost Resistance to Inappropriate Pathogens That Enter by Direct Penetration. *Plant Cell* (Epub ahead of print)

Stepanova, A.N. and Alonso, J.M. (2005) *Arabidopsis* ethylene signaling pathway. *Sci STKE* **276**: cm4

Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J.P. (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Plant Pathol* **35**: 253-270

Stone, B.A. and Clarke, A.E. (1992) Chemistry and biology of (1→3)- β -D glucans. (Victoria, Australia: La Trobe University Press)

Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., Shirasu, K. (2003) HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11777-11782

Takemoto, D., Jones, D.A., Hardham, A.R. (2003) GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of *Arabidopsis* by oomycete pathogens. *Plant J* **33**: 775-792

Tameling, W.I., Elzinga, S.D., Darmin, P.S., Vossen, J.H., Takken, F.L., Haring, M.A., Cornelissen, B.J. (2002) The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* **11**: 2929-2939

Tang, D., and Innes, R.W. (2002) Overexpression of a kinase-deficient form of the EDR1 gene enhances powdery mildew resistance and ethylene-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* **32**: 975-983

Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J. Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., Katagiri, F. (2003) Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*. **15**: 317-330

Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D.B. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. *Plant J* **11**: 1187-94

Thordal-Christensen, H., Gregersen, P.L., Collinge, D.B. (2000) The barley / *Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. In *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Edited by Slusarenko, A., Fraser, R., van Loon, L.C. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 77-100

Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15107-15111

Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F., Broekaert, W.F. (1999a) Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **121**: 1093-1102

Thomma, B.P., Nelissen, I., Eggermont, K., Broekaert, W.F. (1999b) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J* **19**:163-171

Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., Cammue, B.P. (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol*. **13**: 63-68

Tierens, K.F., Thomma, B.P., Bari, R.P., Garmier, M., Eggermont, K., Brouwer, M., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., Cammue, B.P. (2003) *Esa1*, an *Arabidopsis* mutant with enhanced susceptibility to a range of necrotrophic fungal pathogens, shows a distorted induction of defense responses by reactive oxygen generating compounds. *Plant J* **29**: 131-140

Ton, J., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M. (2002) Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 27-34

Tor, M., Gordon, P., Cuzick, A., Eulgem, T., Sinapidou, E., Mert-Turk, F., Can, C., Dangl, J.L., and Holub, E.B. (2002). *Arabidopsis SGT1b* is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell* **14**: 993-1003

Torres, M.A., Dangl, J.L., Jones, J.D. (2002) *Arabidopsis gp91phox* homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 517-522

Tornero, P., Merritt, P., Sadanandom, A., Shirasu, K., Innes, R.W., Dangl, J.L. (2002). RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in *Arabidopsis*, and their relative contributions are dependent on the R gene assayed. *Plant Cell* **14**: 1005-1015

Underhill, D.M. and Ozinsky, A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* **14**: 103-110

Van der Hoorn, R.A., De Wit, P.J., Joosten, M.H. (2002) Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci* **2**: 67-71

Van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.G. (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **12**: 454-456

Van Wees, S.C. and Glazebrook, J. (2003) Loss of non-host resistance of *Arabidopsis* NahG to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J* **33**: 733-742

Van Wees, S.C., Chang, H.S., Zhu, T., Glazebrook, J. (2003) Characterization of the early response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. *Plant Physiol* **132**: 606-617

Veronese, P., Chen, X., Bluhm, B., Salmeron, J., Dietrich, R., Mengiste, T. (2004) The BOS loci of *Arabidopsis* are required for resistance to *Botrytis cinerea* infection. *Plant J* **40**: 558-574

Vleeshouwers, V.G., van Dooijeweert, W., Govers, F., Kamoun, S., Colon, L.T. (2000) The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* **210**: 853-864

Vogel, J. and Somerville, S. (2000) Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 1897-1902

Ward, E.R., Uknas, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P., Ryals, J.A. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**: 1085-1094

Warren RF, Henk A, Mowery P, Holub E, Innes RW. (1998) A mutation within the leucine-rich repeat domain of the *Arabidopsis* disease resistance gene RPS5 partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *Plant Cell* **9**: 1439-1452

Wendehenne, D., Durner, J., Klessig, D.F. (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 449-55

Wiermer, M., Feys, B.J., Parker, J.E. (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 383-389

Wilson, U. E. and Coffey, M. D. (1980) Cytological evaluation of general resistance to *Phytophthora infestans* in potato foliage. *Ann Bot* **45**: 81-90

Wright, D.P., Baldwin, B.C., Shephard, M.C., Scholes, J.D. (1995a) Source–sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. I. Alterations in carbohydrate metabolism. *Physiol Mol Plant Pathol* **47**: 237–253

Wright, D.P., Baldwin, B.C., Shephard, M.C., Scholes, J.D. (1995b) Source–sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. *Physiol Mol Plant Pathol* **47**: 255–267

Xiao, S., Ellwood, S., Calis, O., Patrick, E., Li, T., Coleman, M., Turner, J.G. (2001) Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. *Science* **5501**: 118–120

Xiao, S.Y., Brown, S., Patrick, E., Bearley, C., Turner, J.G. (2003) Enhanced transcription of the *Arabidopsis* disease resistance genes RPW8.1 and RPW8.2 via a salicylic acid-dependent amplification circuit is required for hypersensitive cell death. *Plant Cell* **15**: 33-45

Xiao, S., Calis, O., Patrick, E., Zhang, G., Charoenwattana, P., Muskett, P., Parker, J.E., Turner, J.G. (2005) The atypical resistance gene, RPW8, recruits components of basal defence for powdery mildew resistance in *Arabidopsis*. *Plant J* **42**: 95-110

Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., Turner, J.G. (1998) COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091-1094

Xu, L., Liu, F., Wang, Z., Peng, W., Huang, R., Huang, D., Xie, D. (2001) An *Arabidopsis* mutant *cex1* exhibits constant accumulation of jasmonate-regulated AtVSP, Thi2.1 and PDF1.2. *FEBS Lett* **494**: 161–164

Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., Xie, D. (2002) The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 1919-1935

Xue, M., and Zhang, B. (2002) Do SNARE proteins confer specificity for vesicle fusion? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13359-13361

Yang, Y., Shah, J., Klessig, D.F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev* **11**: 1621-1639

Yang, K.-Y., Liu, Y., Zhang, S. (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 741-746

Yoda, H., Yamaguchi, Y., Sano, H. (2003) Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol* **4**: 1973-1981

Yoshida, S., Ito, M., Nishida, I., Watanabe, A. (2002) Identification of a novel gene HYS1/CPR5 that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **29**: 427-437

You, I.S., Ghosal, D., Gunsalus, I.C. (1991) Nucleotide sequence analysis of the *Pseudomonas putida* PpG7 salicylate hydroxylase gene (nahG) and its 3'-flanking region. *Biochemistry* **30**: 1635-1641

Yu, I.C., Parker, J., Bent, A.F. (1998) Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7819-7824

Yun, B.W., Atkinson, H.A., Gaborit, C., Greenland, A., Read, N.D., Pallas, J.A., Loake, G.J. (2003) Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in *Arabidopsis* against wheat powdery mildew. *Plant J* **34**: 768-777

Zeyen, R.J., Carver, T.L.W., Lyngkjaer, M.F. (2002) Epidermal cell papillae. In *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. Edited by Belanger, R.R., Bushnell, W.R. St. Paul, Minnesota: APS Press; 107-125

Zhang, Y. L., Fan, W.H., Kinkema, M., Li, X., Dong, X. (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6523-6528

Zhang, S. and Klessig, D.F. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci* **6**: 520-527

Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C.L., Schaller, A., He, S.Y., Howe, G.A. (2003) Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J* **36**: 485-499

Zhou, N., Tootle, T.L., Tsui, F., Klessig, D.F., Glazebrook, J. (1998) PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1021-1030

Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., Klessig, D.F. (2000) NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 191-202

Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P., Somerville, S. (2004) Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. *Plant J* **40**: 633-646

Zimmermann, S., Nürnberg, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. Scheel, D.
(1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca^{2+} -permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2751-2755

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

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere ebenfalls, dass die Arbeit an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Halle (Saale), den 06. März 2006

Jörn Landtag

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Vor- und Nachname: Jörn Landtag
Anschrift: Blumenstraße 4
06108 Halle (Saale)
Geburtsdatum: 19. September 1974
Geburtsort: Halle (Saale)
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung

09/1981 – 07/1989 10. Polytechnische Oberschule Dr. Theodor Neubauer
09/1989 – 07/1993 Sportgymnasium Halle (Saale)
07/1993 Schulabschluss: Abitur

Wehrdienst

07/1993 - 06/1994 Wehrdienst, 3./Jägerlehrbataillon 353, Hammelburg

Studium und Promotion

10/1994 – 09/1995 Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Martin-Luther-Universität Halle (Saale)
10/1995 – 06/2001 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle (Saale), Hauptfächer Mikrobiologie und Genetik
06/2000 – 05/2001 Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale), Prof. Dr. D. Scheel: „Transformation von Kartoffel- und Tabakpflanzen mit der Tyrosin-Decarboxylase-2 cDNA aus Petersilie und Untersuchung der Expression des Transgens“
seit 09/2001 Promotionsstudium am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale), Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie, Prof. Dr. D. Scheel

Halle (Saale), den 06. März 2006

Jörn Landtag

Veröffentlichungen

Publikationen

Landtag, J., Baumert, A., Degenkolb, T., Schmidt, J., Wray, V., Scheel, D., Strack, D., Rosahl S. (2002) Accumulation of tyrosol glucoside in transgenic potato plants expressing a parsley tyrosine decarboxylase. *Phytochemistry* **60**: 683-689

Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S., Schulze-Lefert, P. (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science* **310**: 1180-1183

Posterbeiträge

Landtag, J., Westphal, L., Lipka, L., Dittgen, J., Schulze-Lefert, P., Scheel, D., Rosahl S. Searching For Novel Components Involved In Plant Nonhost Disease Resistance In *Arabidopsis*. International Conference on *Arabidopsis* Research, Berlin July 11th – 14th 2004

Patente

Lipka, V., Scheel, D., Schulze-Lefert, P., Rosahl, S., Landtag, J.
"Polynucleotides encoding a beta-glucosidase and uses thereof"
Application No./Patent No.: 03743388.5-24.05-EP0302315 (6 March 2003)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel für die Überlassung des interessanten Themas, für seine konstruktive Kritik sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am IPB.

Frau Dr. Sabine Rosahl danke ich für die fortwährende Unterstützung sowie die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft während meiner Doktorandenzeit sowie für die kritische Betrachtung des Manuskriptes.

Der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie am IPB gilt mein Dank für das sehr gute Arbeitsklima. Für ihre vielfältige fachliche und persönliche Unterstützung danke ich insbesondere allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Induzierte Pathogenabwehr, vor allem jedoch Frau Angelika Weinel. Frau Dr. Lore Westphal danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln) danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Labor. Bei Herrn Dr. Volker Lipka und Herrn Dr. Jan Dittgen (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln) möchte ich mich für die konstruktive Zusammenarbeit sowie für die Bereitstellung des Saatguts bedanken.

Für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Analyse möchte ich mich bei Frau Dr. Mandy Birschwilks, Frau Sylvia Krüger sowie Herrn Dr. Dieter Neumann bedanken.

Dank geht auch an Frau Dr. Bettina Hause für die Unterstützung bei der mikroskopischen Analyse.

Bei der Arbeitsgruppe Grafik/Fotografie, insbesondere bei Frau Annett Kohlberg möchte ich mich für die Anfertigung der Fotos bedanken.

Ebenso gebührt mein Dank den Mitarbeitern der Gärtnerei für die Pflege der Pflanzen und allem was dazu gehört.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für Ihre ausdauernde Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken. Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Susanne, ohne deren Engagement und Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danke für alles!