

**Herstellung von hypoallergenen Möhren (*Daucus carota*)
und
Analyse ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber
mikrobiellen Pathogenen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
(Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Justus-Liebig-Universität Gießen
durchgeführt am

Institut für Phytopathologie
und Angewandte Zoologie

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Susanna Pirita Peters
Gießen, Juni 2010

Dekan: Prof. Dr. Volkmar Wolters
1. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel
2. Gutachter: HD Dr. Christoph Forreiter

Teile dieser Arbeit sind oder werden veröffentlicht in:

Veröffentlichungen:

Peters, S., Weigand, D., Scheurer, S., Vieths, S., Nothnagel, T., Kogel, K.-H. und Imani, J. (2009) Untersuchung von hypoallergenen Möhren bezüglich ihrer Anfälligkeit gegenüber mikrobiellen Pflanzenpathogenen. "Gentechnik und Somatische Embryogenese" Workshop, 1.-3. Oktober 2009, Rostock

Weigand, D*, Peters, S*, Fotisch, K., Lidholm, J., Mahler, V., Kogel, K.-H., Vieths, S., Scheurer, S. und Imani, J. (2009) Allergy, 64, 558, Supplement: Suppl. 90. 28th Congress of the European-Academy-of-Allergy-and-Clinical-Immunology, Warsaw, POLAND, JUN 06-10

Eingereicht:

Susanna Peters*, Jafargholi Imani*, Vera Mahler, Kay Foetisch, Kathrin Paulus, Stephan Scheurer, Stefan Vieths and Karl-Heinz Kogel. Reduced allergenicity of carrot roots harvested from Dau c 1.01 and Dau c 1.02–silenced transgenic carrot plants. Transgenic Research eingereicht.

* geteilte Erstautorenschaft

In Vorbereitung:

Peters, S., Krämer, R., Nothnagel, T., Imani, J. und Kogel, K.-H. Dau c 1.01 and Dau c 1.02–silenced transgenic carrot plants are not more susceptible to *Alternaria radicina*, *Alternaria dauci* or *Botrytis cinerea* than wild type carrots.

Mahler, V., Fötisch, K., Scheurer, S., Peters, S., Kogel, K.-H. und Vieths, S. Allergenicity assessment of carrot roots harvested from Dau c 1.01 and Dau c 1.02–silenced transgenic carrot plants.

...weil die Welt einfach faszinierend ist!

Für meinen Mann

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 PR-PROTEINE.....	1
1.1.1 PR10-PROTEINE.....	3
1.1.2 DAU C 1.....	4
1.2 KREUZALLERGIE.....	6
1.3 RNA-INTERFERENZ.....	7
1.4 TOTIPOTENZ VON PFLANZENZELLEN.....	9
1.5 PILZLICHE PHYTOPATHOGENE.....	10
1.5.1 ABWEHRMECHANISMEN GEGEN NEKROTROPHE PILZE	10
1.5.2 NEKROTROPHE PILZE.....	10
1.6 SALIZYLSÄURE IN DER PFLANZENABWEHR.....	11
1.7 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....	13
2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	15
2.1 PFLANZENMATERIAL UND ANZUCHTBEDINGUNGEN.....	15
2.1.1 OBERFLÄCHENSTERILISATION DER MÖHRENSAMEN.....	15
2.1.2 <i>IN VITRO</i> KULTIVIERUNG VON MÖHREN.....	15
2.1.2.1 Herstellung von Möhrenkallus- und Zellkulturen.....	15
2.1.2.2 Kultivierung von Möhren-Kalluskulturen.....	16
2.1.2.3 Kultivierung von Möhrenzellkulturen.....	16
2.1.2.4 Kultivierung von frisch transformierten Möhrenzellen.....	17
2.1.3 HERSTELLUNG VON PFLANZEN AUS DER ZELLKULTUR.....	18
2.1.4 KULTIVIERUNG DER TRANSGENEN PFLANZEN.....	18
2.2 ANZUCHTMATERIAL UND KULTIVIERUNG VON PHYTOPATHOGENEN PILZEN.....	19
2.2.1 PHYTOPATHOGENE PILZE.....	19
2.2.1.1 Kultivierung der pilzlichen Pathogene.....	20
2.2.1.2 Herstellung des Pilzsporeninokulats.....	20
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	21
2.3.1 RNA EXTRAKTION.....	21
2.3.1.1 RNA Extraktion mit RNeasy Kit.....	21
2.3.1.2 RNA Extraktion mit TRIZOL.....	21

2.3.2	DNA EXTRAKTION.....	22
2.3.3	cDNA SYNTHESE.....	22
2.3.3.1	cDNA-Synthese mit SuperScript II.....	22
2.3.3.2	cDNA-Synthese mit QuantiTect® Reverse Transcription.....	22
2.3.4	STANDARD POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) und QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (qPCR).....	23
2.3.4.1	STANDARD-PCR.....	23
2.3.4.2	qPCR.....	23
2.3.5	GELELEKTROPHORESE.....	24
2.3.5.1	TAE-GELE.....	24
2.3.5.2	MOPS-GELE.....	24
2.3.6	AUFREINIGUNG DER PCR-PRODUKTE AUS EINEM TAE-GEL.....	25
2.3.7	KONZENTRATIONS- UND REINHEITSBESTIMMUNG VON RNA- UND DNA-PROBEN.....	25
2.3.8	SEQUENZIERUNG.....	25
2.4	RNA-INTERFERENZ (RNAi).....	25
2.4.1	SYNTHESE DER RNAi-KONSTRUKTE.....	25
2.4.2	KLONIERUNG DER RNAi-KONSTRUKTE.....	26
2.4.2.1	TOPO-Klonierungsreaktion.....	27
2.4.2.2	LR-Reaktion.....	28
2.5	PLASMIDISOLIERUNG.....	28
2.6	VERDAU.....	28
2.7	BAKTERIEN-TRANSFORMATION.....	29
2.7.1	<i>E. COLI</i> -TRANSFORMATION.....	29
2.7.2	<i>A. TUMEFACIENS</i> -TRANSFORMATION.....	29
2.8	HERSTELLUNG VON ELEKTROKOMPETENTEN <i>AGROBACTERIUM</i> - ZELLEN.....	30
2.9	HERSTELLUNG VON BAKTERIEN-DAUERKULTUREN.....	31
2.10	AGROBAKTERIUM-VERMITTELTE TRANSFORMATION VON MÖHREN.....	31
2.11	ANALYSE DER RNAi-PFLANZEN AUF TRANSGENITÄT.....	32
2.12	RESISTENZANALYSE DER HYPOALLERGENEN MÖHREN.....	33
2.12.1	<i>ALTERNARIA RADICINA</i> -KINETIK.....	33
2.12.2	RESISTENZPRÜFUNG VON NACHKOMMENSCHAFTEN (<i>IN</i> <i>VITRO</i> KLONE) TRANSGENER MÖHREN.....	34

2.13	SALIZYLSÄURE-KINETIK.....	36
2.14	PRIMERSEQUENZEN.....	37
2.15	ENZYME.....	37
3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	HERSTELLUNG HYPOALLERGENER MÖHREN (<i>DAUCUS CAROTA</i>).....	38
3.2	ERMITTLUNG DER SUPPRESSIONSSTÄRKE.....	41
3.3	BLATT-MORPHOLOGIE.....	44
3.4	RESISTENZANALYSEN VON MÖHRENWURZELSCHLEIBEN.....	45
3.4.1	RESISTENZANALYSEN MIT <i>ALTERNARIA RADICINA</i>	45
3.4.2	RESISTENZANALYSEN TRANSGENER MÖHRENWURZEL- SCHLEIBEN MIT <i>ALTERNARIA RADICINA</i>	47
3.4.2.1	Relative Expression von <i>Dau c 1.01</i> -Gens.....	49
3.4.2.2	Relative Expression des <i>Dau c 1.02</i> -Gens.....	51
3.4.2.3	Relative Expression des <i>DcPRPlike1</i> -Gens.....	53
3.4.2.4	Relative Expression des <i>PR3</i> -Gens.....	55
3.5	RESISTENZANALYSE DER MÖHREN.....	57
3.5.1	RESISTENZANALYSE DER MÖHRENBLÄTTER.....	57
3.5.2	RESISTENZANALYSE DER MÖHRENPETIOLEN.....	58
3.5.3	RESISTENZANALYSE DER MÖHRENWURZELN.....	59
3.6	SALIZYLSÄURE-ANALYSEN AN MÖHRENBLÄTTERN.....	61
3.6.1	RELATIVE EXPRESSION DES <i>DAU C 1.01</i> -GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG.....	62
3.6.2	RELATIVE EXPRESSION DES <i>DAU C 1.02</i> -GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG.....	63
3.6.3	RELATIVE EXPRESSION DES <i>DCPRPLIKE1</i> -GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG.....	65
3.6.4	RELATIVE EXPRESSION DES <i>PR3</i> -GENS NACH SALIZYLSÄURE- BEHANDLUNG.....	67
3.7	SKIN-PRICK-TESTS AN PATIENTEN MIT MÖHRENALLERGIE.....	68
3.8	IgE-REAKTIVITÄTSANALYSE.....	70
4	DISKUSSION.....	72
4.1	HYPOALLERGENE MÖHREN.....	72

4.1.1	SUPPRESSIONSTÄRKE IN DEN TRANSGENEN LINIEN.....	73
4.1.1.1	Ermittlung der Suppressionsstärke auf Transkriptebene.....	73
4.1.1.2	Ermittlung der Suppressionsstärke auf Protein-Ebene.....	74
4.1.2	MORPHOLOGIE DER TRANSGENEN MÖHRENBLÄTTER.....	77
4.2	RESISTENZ DER HYPOALLERGENEN MÖHREN.....	79
4.2.1	RESISTENZANALYSEN AN WILDTYP-MÖHREN MIT <i>ALTERNARIA RADICINA</i>	79
4.2.2	RESISTENZANALYSEN AN DAU C 1.01- UND DAU C 1.02- SUPPRIMIERTEN-MÖHRENWURZELSCHLEIBEN MIT <i>ALTERNARIA RADICINA</i>	82
4.2.2.1	Relative <i>Dau c 1.01</i> -Expression.....	83
4.2.2.2	Relative <i>Dau c 1.02</i> -Expression.....	85
4.2.2.3	Relative <i>DcPRPLike1</i> -Expression.....	86
4.2.2.4	Relative <i>PR3</i> -Expression.....	88
4.2.3	VISUELLE RESISTENZANALYSEN DER HYPOALLERGENEN MÖHREN.....	89
4.2.3.1	Visuelle Resistenzanalyse der Möhrenblätter.....	89
4.2.3.2	Visuelle Resistenzanalyse der Petiolen.....	90
4.2.3.3	Visuelle Resistenzanalyse der Wurzeln.....	91
4.3	SALIZYLSÄURE-ANALYSEN AN MÖHRENBLÄTTERN.....	92
4.3.1	RELATIVE EXPRESSION DES <i>DAU C 1.01</i> -GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG.....	93
4.3.2	RELATIVE EXPRESSION DES <i>DAU C 1.02</i> -GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG.....	93
4.3.3	RELATIVE EXPRESSION DES <i>DcPRPLIKE1</i> -GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG.....	94
4.3.4	RELATIVE EXPRESSION DES <i>PR3</i> -GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG.....	95
4.4	SKIN-PRICK-TEST AN PATIENTEN MIT HÖHRENALLERGIE.....	96
4.5	IgE-REAKTIVITÄTSANALYSE.....	98
5	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY.....	101
5.1	ZUSAMMENFASSUNG.....	101
5.2	SUMMARY.....	103

6	LITERATURVERZEICHNIS.....	105
7	ANHANG.....	117
	7.1 SEQUENZEN UND VEKTORKARTEN.....	117
	7.1.1 SEQUENZEN DER RNAi-KONSTRUKTE.....	117
	7.1.2 VEKTORKARTEN.....	117
	7.2 AUFLISTUNG DER QPCR-ERMITTELTEN EXPRESSIONSWERE AUS MÖHRENBLÄTTERN.....	119
	7.3 SEQUENZVERGLEICHE.....	120
	7.4 AUFLISTUNG DER qPCR-ERMITTELTEN EXPRESSIONSWERTE IN WURZELSCHNITTEN NACH DER <i>ALTERNARIA RADICINA</i> - INFEKTION.....	124
	7.5 AUFLISTUNG DER qPCR-ERMITTELTEN EXPRESSIONSWERTE IN BLÄTTERN NACH DER SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG.....	125
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	127
	DANKSAGUNG.....	128

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	Basenpaar
B5-Medium ^{2,4-D}	B5-Medium mit dem Hormon 2,4-D
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CmR	Chloramphenicol
cv.	Kultivar (<i>cultivar</i>)
dai	Tage nach Inokulation (<i>day(s) after inoculation</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dsRNA	doppelstrangige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET	Ethylen
EtOH	Ethanol
Gm	Gentamycin
hai	Stunden nach Inokulation (<i>hour(s) after inoculation</i>)
hat	Stunden nach Behandlung (<i>hour(s) after treatment</i>)
hpRNA	Haarnadel-RNA (<i>hairpin RNA</i>)
HR	Hypersensitivitätsreaktion (<i>hypersensitive response</i>)
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
IgE	Immunoglobulin E
JA	Jasmonsäure
Kan	Kanamycin
LB	Luria Bertani
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
miRNA	Mikro-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorid
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
OAS	orale Allergie-Syndrom
PR	Pathogenese-assoziiert (<i>pathogenesis-related</i>)
PTGS	post-transkriptionale Gen-Unterdrückung (<i>post-transcriptional gene silencing</i>)
qPCR	quantitative Real-Time PCR
Rif	Rifampicin
RISC	RNA-induzierten <i>silencing</i> Komplex (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Runden pro Minute
s	Sekunde
SA	Salizylsäure (<i>salicylic acid</i>)
SAR	systemisch ausgelöste Resistenz (<i>systemic acquired resistance</i>)
siRNA	kleine RNA Stücke (<i>short interfering RNA</i>)
Sp	Spectomycin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA

TE	Tris-HCl + Na ₂ -EDTA
Tet	Tetracyclin
tDNA	transferierte DNA
Tic	Ticarcillin
YEB	Hefe Extrakt Fleischbrühe (<i>yeast extract broth</i>)
#12	Dau c 1.02-unterdrückt
#20	Dau c 1.01-unterdrückt
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

1 EINLEITUNG

Im zentral- und nordeuropäischen Raum leiden ungefähr 20% der Bevölkerung an pollenassoziierten Nahrungsmittelallergien. Die Häufigkeit dieser Pollen-Kreuzallergie hat sich in den vergangenen 20 Jahren etwa verdoppelt. Ein Viertel der Pollen-Kreuzallergiker leidet unter einer Möhrenallergie. Dadurch sind sie gezwungen, auf möhrenhaltige Frischkost zu verzichten. Die Kreuzallergie kommt durch eine große Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen, d.h. der Proteinstrukturen, von Pollen (besonders Birkenpollen) mit einigen Aminosäuresequenzen der Möhre zustande. Die Überempfindlichkeitsreaktionen bei betroffenen Menschen werden in den meisten Fällen durch das Protein „*Pathogenesis-related-protein 10*“ (PR10) hervorgerufen, das als das Hauptallergen der Möhre bekannt ist. Es wird vermutet, dass dieses Protein auch eine wichtige Rolle im pflanzlichen Immunsystem spielt. Zurzeit gibt es kein therapeutisches Mittel gegen diese Allergien.

1.1 PR-PROTEINE

Pflanzen aktivieren eine Vielzahl an physiologischen Prozessen als Antwort auf einen Befall von potentiellen Pflanzenpathogenen. Diese Prozesse führen zu vielfältigen Abwehrmechanismen, beispielsweise zur Induzierung von antimikrobiellen Sekundärmetaboliten und antimikrobiellen Proteinen wie auch zum lokal begrenzten programmierten Zelltod als eine Hypersensitivitäts-Reaktion (*hypersensitive response*: HR) (Greenberg 1997; Staskawicz et al. 1995). Eine Gruppe der durch Pathogenbefall und durch ähnliche Stresssituationen aktivierten Proteine ist die Gruppe der Pathogenese-assoziierten Proteine (PR-Proteine; *pathogenesis-related proteins*). Die PR-Proteine sind definiert als Proteine, die von der Pflanze kodiert werden, aber nur durch Pathogenese oder in ähnlichen Situationen induziert werden (Antoniw et al. 1980). Die Abwehr-assoziierten Proteine wurden zuerst im Jahr 1970 in Tabak-Blättern (*Nicotiana tabacum*) nach einem Tabakmosaikvirus-Befall (TMV) als hypersensitiv reagierende Proteine entdeckt (Van Loon and Van Kammen 1970). Später wurde ihr Vorkommen in mindestens 13 Pflanzenfamilien nach Pilz-, Bakterien- und Virus-Infektionen sowie nach Nematoden- und Insektenbefall entdeckt. Heute sind 17 Familien der PR-Proteine in monokotylen und in dikotylen Pflanzen bekannt (Abb. 1.2) (Christensen et al. 2002; Van Loon et al. 2006). Die PR-Proteine sind nach ihrer Sequenzhomologie, serologischen, immunologischen und enzymatischen Eigenschaften in die verschiedenen PR-Familien eingeteilt (Van Loon et al. 1994; Van Loon and Van Strien 1999). Die PR-Proteine werden in erster Linie durch biotischen Stress wie z.B. Pathogenbefall

induziert (Lo et al. 1999; Ruiz-Lozano et al. 1999; McGee et al. 2001; Hashimoto et al. 2004; Guo et al. 2008; El-kereamy et al. 2009; Katilé et al. 2010). Die PR-Proteine werden zusätzlich zu den Pathogenen durch umgebungsbedingte Stressfaktoren wie Trockenheit, Salzhaltigkeit, Verletzung des Pflanzengewebes, Schwermetalle, durch endo- und exogene Elizitor-Behandlungen und durch Pflanzenwachstumsregulatoren induziert (Dubos and Plomion 2001; Liu et al. 2003; Hashimoto et al. 2004; Jellouli et al. 2010). Durch diese Eigenschaften spielen die PR-Proteine eine wichtige Rolle bei pflanzlichen Abwehrmechanismen. Die PR-Proteine haben eine niedrige Molekulargröße, sie sind stabil bei niedrigen pH-Werten, sie sind wärmebeständig und resistent gegen Proteasen (Hoffmann-Sommergruber 2000; 2002). PR-Proteine dienen als Marker von systemisch ausgelöster Resistenz (*systemic acquired resistance: SAR*) und die PR-Proteine gehören zu den so genannten SAR-Genen (Ward et al. 1991; Van Loon and Van Strien 1999). Viele der PR-Proteine werden durch die Phytohormone Jasmonsäure (JA), Salizylsäure (SA) und durch Ethylen (ET) induziert (Thomma et al. 1998; Spoel et al. 2003; Verberne et al. 2003; Liu et al. 2006; Mei et al. 2006; Xie et al. 2010). Die Funktionen der PR-Proteine sind noch nicht in ihrer Gesamtheit bekannt, aber mehrere Funktionen konnten bereits festgestellt werden. Unter anderem weisen die PR3 Proteine eine Chitinaseaktivität auf (Legrand et al. 1987) und die PR2 Proteine zeigen eine β -1,3-Glukanaseaktivität (Kauffmann et al. 1987). Für die PR10 Proteine wurde eine ribonuklease Aktivität in manchen Pflanzen nachgewiesen (Srivastava et al. 2006; Yan et al. 2008). In mehreren Familien der PR-Proteine gibt es Proteine, die als pflanzliche Allergene nachgewiesen wurden. Solche allergene Proteine gibt es in den PR-Proteinfamilien 2, 3, 4, 5, 8, 10 und 14 (Hoffmann-Sommergruber 2000). Weitere Eigenschaften der PR-Proteine sind im Abbildung 1.1 angegeben.

Etwas weniger bekannte Proteine sind die PR-ähnlichen Proteine (*PR-like proteins*). Sie sind Proteine, die eine Homologie zu den PR-Proteinen aufweisen, die aber im Gegensatz zu den PR-Proteinen auch durch entwicklungsabhängige Ereignisse induziert werden (Van Loon et al. 1994).

Familie	Typ der Mitglieder	Eigenschaften
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II
PR-5	Tobacco S	Thaumatococcus-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like
PR-17	Tobacco PR _{D27}	Unknown

Abb. 1.1: Bekannte Familien der Pathogenese-assoziierten Proteine. Modifiziert nach Van Loon et al. (2006).

1.1.1 PR10-PROTEINE

Die PR10-Proteine wurden zuerst in Petersilienzellen von Somssich et al. (1988) nach einer Elizitor-Behandlung entdeckt und wurden zunächst als PR1-Proteine gekennzeichnet. Ein Jahr später wurde das Birkenpollenallergen Bet v 1 als ein PR10-Protein von Breiteneder et al. (1989) entdeckt, das bei den Kreuzreaktionen zwischen den Birkenpollenallergie und Möhrenallergie eine Hauptrolle spielt (Gomez et al. 1996; Hoffmann-Sommergruber et al. 1999; Moneo et al. 1999; Ballmer-Weber et al. 2001). Die PR10-Proteine sind generell saure, proteaseresistente Proteine mit einer Molekularmasse von 16-19 kDa (Walter et al. 1990). Sie sind im Gegensatz zu vielen PR-Proteinen intrazelluläre Proteine, die eine strukturelle Homologie zu Ribonukleasen aufweisen (Moiseyev et al. 1994). Manche PR10-Proteine zeigen pathogenunabhängige konstitutive Expressionsmuster an. Es wurde nachgewiesen, dass PR10-Proteine entwicklungsbedingt in verschiedenen Pflanzengeweben und Organen reguliert werden (Liu and Ekramoddoullah 2003). Eine konstitutive Akkumulation von PR10-Proteinen wurde während des Pflanzenwachstums und der Entwicklung unter anderem in Blütenorganen (Constabel and Brisson 1995), in Blättern (Pinto et al. 2005) und in Wurzeln (Walter et al. 1996; Sikorski et al. 1999) beobachtet. Für die PR10-Proteine sind wichtige Aufgaben im pflanzlichen Immunsystem in verschiedenen Pflanzenarten festgestellt worden.

Es gibt Berichte über vielfältige Funktionen des PR10-Proteins in verschiedenen Pflanzenarten, wie z.B. antimikrobielle Aktivität (Flores et al. 2002; Chen et al. 2010; Xie et al. 2010), Ribonukleaseaktivität (Park et al. 2004; Srivastava et al. 2006; Yan et al. 2008; Zubini et al. 2009), antifungale Aktivität (Chadha and Das 2006), enzymatische Aktivitäten in pflanzlichem Sekundärmetabolismus bis hin zu Funktionen in abiotischen Stresssituationen (Moiseyev et al., 1997; Samanani et al. 2004; Liu and Ekramoddoullah, 2006). Auch eine Rolle als ein Steroidcarrier wurde diskutiert (Neudecker et al., 2001; Markovic-Housley et al. 2003). Eine ganz neue Funktion für das PR10-Protein wurde in der Erdbeere entdeckt. In der Erdbeere spielt das PR10-Protein Fra a eine wichtige Rolle bei der Flavonoidbiosynthese (Muñoz et al. 2010). Die Expression von PR10-Proteinen wird in vielen Pflanzenarten durch Viren (Park et al. 2004), Bakterien (Breda et al. 1996; Flores et al. 2002; Xu et al. 2003) und Pilzen (Lo et al. 1999; Ruiz-Lozano et al. 1999; McGee et al. 2001; Liu et al. 2003; Hashimoto et al. 2004; El-kereamy et al. 2009; Katilé et al. 2010) induziert. Eine Verletzung des Pflanzengewebes (Liu et al. 2005) sowie Trockenheit (Dubos and Plomion 2001) rufen eine Hochregulation der PR10-Proteine in einigen Pflanzenarten hervor. Die genauen biologischen Funktionen der PR10 Proteine sind allerdings noch weitgehend unbekannt (Liu and Ekramoddoullah, 2003). Die PR10-Genexpression wird durch die Phytohormone Jasmonsäure (McGee et al 2001; Liu et al. 2003), Abscisinsäure (Wang et al. 1999) und Salizylsäure (McGee et al. 2001) reguliert. Viele der PR10-Proteine sind bekannt als allergene Proteine in Pflanzen. So sind beispielsweise das Pru p 1 der Pfirsiche (Zubini et al. 2009), das Dau c 1 der Möhre (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999), das Mal d 1 des Apfels (Vanek-Krebitz et al. 1995) und das Api g 1 des Selleries (Breiteneder et al. 1995) als Hauptallergene der jeweiligen Pflanzenart bekannt und gehören den PR10-Proteinen an. Meistens sind die Bet v 1-homologen Proteine in Pflanzen thermolabil, d.h. ihre 3-dimensionale Struktur ändert sich beim Erwärmen. Die wärmebedingte Strukturänderung reduziert das allergische Potenzial, aber die T-Zellepitopen bleiben bestehen und können weiterhin T-Zellen-vermittelt zu allergischen Reaktionen führen (Bohle et al. 2006).

1.1.2 DAUC 1

Die Möhre (*Daucus carota* spp. *sativus* [Hoffm.]) gehört zu der Familie der Doldenblütler (Apiaceae). In Deutschland war die Möhrenanbaufläche im Jahr 2005 die viertgrößte Anbaufläche für Gemüse nach Kohlgemüse, Spargel und Salaten (Statistisches Bundesamt Deutschland, Pressemitteilung Nr.451 vom 26.10.2005). Nicht nur als wichtiges Nahrungsmittel ist die Möhre bekannt, sondern auch dadurch, dass bei Birkenpollen-

Allergikern häufig eine Kreuzallergie gegen Möhren im Erwachsenenalter auftritt. Zusammen mit Apfel und Haselnuss verursacht die Möhre die häufigsten Nahrungsmittelallergien bei nahrungsmittelallergieleidenden Berlinern (Zuberbier et al. 2004). Eine Kreuzallergie zwischen Pollen und Möhren kann auch in Zusammenhang mit Beifußpollen-Allergie auftreten, aber in Europa tritt die Möhrenallergie in erster Linie mit der Birkenpollen-Allergie auf. Für die Kreuzallergie ist das Protein Dau c 1 in der Möhre verantwortlich. Das Protein Dau c 1 ist das Hauptallergen der Möhre (*Daucus carota*) (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999). Etwa 98% der Möhrenallergiker reagieren auf dieses Protein allergisch und produzieren Dau c 1-spezifische Immunoglobulin E (IgE)-Antikörper (Ballmer-Weber et al. 2001; Hoffmann-Sommergruber et al. 1999). Das Dau c 1-Protein ist etwa 16 kDa groß (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999). Es besteht aus zwei Isoformen, die als Dau c 1.01 und Dau c 1.02 benannt wurden (Ballmer-Weber et al. 2005; Ballmer-Weber 2008). Die Aminosäuresequenzen dieser Isoformen weisen eine 50%ige Homologie zueinander auf (Ballmer-Weber et al. 2005). Etwa 65% der Möhrenallergikern zeigen eine allergische Reaktion gegen das Dau c 1.01-Protein und 38% gegen das Dau c 1.02-Protein (Ballmer-Weber et al. 2005). Die Isoform Dau c 1.01 kommt in fünf Varianten vor und die Varianten werden Dau c 1.0101, Dau c 1.0102, Dau c 1.0103, Dau c 1.0104 und Dau c 1.0105 genannt (Lin et al. 1996; Yamamoto et al. 1997; Hoffmann-Sommergruber et al. 1999). Die Varianten sind in ihren Aminosäuresequenzen sehr ähnlich zueinander. Zum Beispiel weisen Aminosäuresequenzen der Varianten Dau c 1.0103 und Dau c 1.0104 eine 97%ige Homologie zueinander auf (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999; Ballmer-Weber et al. 2005). Das Dau c 1 gehört den Pathogenese-assoziierten Proteinen (PR, „*pathogenesis-related*“ protein) der Familie 10 an (PR10; Hoffmann-Sommergruber et al. 1999; Hoffmann-Sommergruber 2000). Das Dau c 1 ist ein Bet v 1-homologes Protein. Das Bet v 1 ist das Hauptallergen der Birke (Breiteneder et al. 1989) und seine Aminosäuresequenz ist zu 37-38% mit der Dau c 1 Aminosäuresequenz homolog (Ballmer-Weber et al. 2005). Das *Backbone* der kristallinen Strukturen von Bet v 1 und Dau c 1 ist in der Abbildung 1.2 zu sehen.

1.2 KREUZALLERGIE

Nahrungsmittelallergien bei Jugendlichen und Erwachsenen entwickeln sich häufig aus einer bereits vorhandenen allergischen Sensibilisierung zu respiratorischen Allergenen, d.h. aus einer Pollenallergie (Etesamifar and Wüthrich 1998; Bohle et al. 2006). Die meisten pollenassoziierten allergischen Reaktionen mit Früchten und Gemüse hängen häufig mit der Birkenpollenallergie zusammen (Etesamifar and Wüthrich 1998; Viehls et al. 2002). Das Hauptallergen der Birkenpollen, Bet v 1, ist ein respiratorisches Allergen. Es ist eines der relevanten sensibilisierenden Proteine, das zu einer pollenassoziierten Kreuzallergie führen kann und das sogenannte Birken-Frucht-Gemüse-Syndrom verursachen kann (Ebner et al. 1995; Wensing et al. 2002; Bohle et al. 2003). Etwa 70% der erwachsenen Birkenpollenallergiker bekommen eine pollenassoziierte Allergie gegen Steinfrüchte, Nüsse oder gegen bestimmte Gemüsesorten (Bohle 2007). Die meisten Kreuzallergien mit dem Birkenpollen-Allergen Bet v 1 entstehen mit Früchten der *Rosaceae* (z.B. Apfel) und mit dem Gemüse der *Apiaceae* (z.B. Möhre und Sellerie) (Viehls et al. 2002). Der immunologische Hintergrund der pollenassoziierten Nahrungsmittelallergie basiert auf der Kreuzreaktivität von humanem Immunglobulin E (IgE) mit verwandten Proteinen in Pollen (besonders Birkenpollen), Früchten und Gemüse. Die Aminosäuresequenzen dieser Proteine sind einander ähnlich (Ebner et al. 1995) und dadurch kommt es zu allergischen Kreuzreaktionen. Hierbei handelt es sich um eine Kreuzreaktion von humanen IgE-Antikörpern, die gegen Pollenallergene gerichtet sind, mit homologen Allergenen in pflanzlichen Nahrungsmitteln (Viehls et al. 2002). Das Bet v 1 gehört den Pathogenese-assoziierten Proteinen der Familie 10 (PR10) an (Breiteneder and Radauer 2004). Die Proteine aus Früchten und Gemüse, die zu einer Kreuzreaktion mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1 führen können, gehören ebenso den PR10-Proteinen an. Solche Bet v 1-homologen allergenen Proteine sind z.B. das Mal d 1 des Apfels (Vanek-Krebitz et al. 1995), das Api g 1 des Selleries (Breiteneder et al. 1995) und das Dau c 1 der Möhre (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999). Das *Backbone* der kristallinen Strukturen von Bet v 1, Dau c 1 und Api g 1 ist in der Abbildung 1.2 zu sehen.

In Europa gehört die pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie zu der häufigsten Form der Nahrungsmittelallergien bei Erwachsenen und eine therapeutische Hilfe gegen diese Allergie fehlt bis heute (Ballmer-Weber et al. 2005). Die Kreuzallergie zwischen Birkenpollen und Möhren verursacht eine Allergie des Typs 1, die eine Sofortallergie ist (Dreborg and Foucard 1983; Kazemi-Shirazi et al. 1999). Als eine der häufigsten allergischen Reaktionen tritt das orale Allergie-Syndrom (OAS) mit den typischen Symptomen wie Juckreiz und Schwellung der Mundschleimhaut, der Zunge und der Lippen auf. Etwa 70% der

Pollenallergiker zeigen eine OAS als allergische Reaktion (Sicherer 2001; Roehr et al. 2004; Yun and Katelaris 2009). Etwa ein Viertel der Birkenpollenallergiker leidet unter einer Möhrenallergie (Etesamifar and Wüthrich 1998).

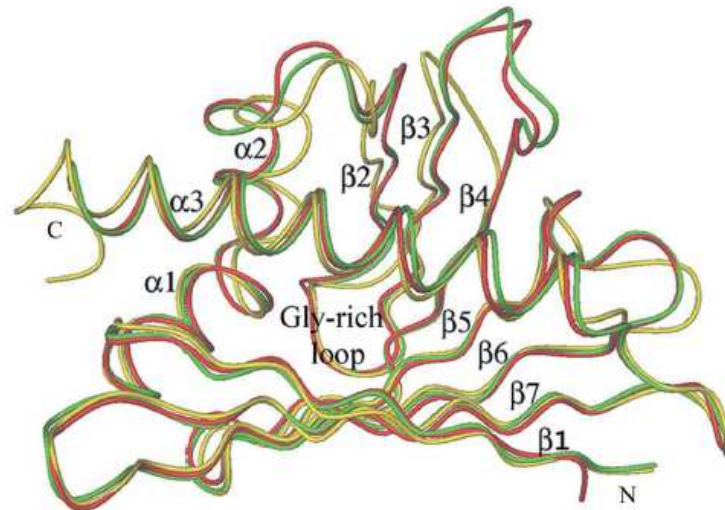


Abb. 1.2: Das *Backbone* der kristallinen Strukturen von **Bet v 1**, **Dau c 1** und **Api g 1**. Die kristallinen Strukturen der allergenen Proteine der Birke (Bet v 1: in gelb), der Möhre (Dau c 1: in rot) und Sellerie (Api g 1: in grün) sind aufeinander gezeichnet. Die sekundären Strukturelemente und die hoch konservierte Gly-reiche Schlaufe sind beschriftet (Markovic-Housley et al. 2009).

1.3 RNA-INTERFERENZ

Die Anwendung der RNA-Interferenz (RNAi) besitzt das Potenzial zur Herstellung von hypoallergenen Pflanzen. Das RNAi-Phänomen wurde zum ersten Mal von Fire et al. (1998) beschrieben, als sie in *Caenorhabditis elegans* doppelsträngige RNA injizierten und dies zu einem Abbau der transkribierten Boten-RNA (*messenger*-RNA: mRNA) und somit zur Reduktion der Proteinsynthese führte. Die ersten RNA-unterdrückungsähnlichen Ereignisse in Pflanzen wurde schon vorher in Petunien entdeckt, als man versucht hat, ein Schlüsselenzym der Anthozyanbiosynthese in den Petunienblüten zu überexprimieren. Ziel des Versuchs war es, die Blütenfarben zu verstärken, aber sie wurden durch das eingeführte Gen vermindert (Napoli et al. 1990; van der Krol et al. 1990). Vereinfacht ausgedrückt verbirgt sich hinter der RNAi ein Vorgang, in dem ein eingeführtes Gen das homologe endogene Gen einer Zelle unterdrückt und damit stilllegt. Dies wird *RNA silencing* genannt oder auch in Pflanzen als *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) bezeichnet. Als erster Schritt zum *RNA silencing* muss eine doppelsträngige RNA (dsRNA) in der Zelle vorhanden sein. Dies kann z.B. durch RNA Viren oder künstlich durch eine Transformation der Pflanzenzellen zu transient oder stabil transgenen Pflanzen erfolgen. Hierbei wird ein Gen in das Genom einer Zelle eingeführt, die bei der Transkription die dsRNA für die Gen-Unterdrückung bildet. Das eingeführte Gen muss homolog zu einem endogenen Gen sein,

dessen Funktion unterdrückt werden soll. Die dann transkribierte doppelsträngige RNA (dsRNA) wird durch ein Enzym namens Dicer erkannt und in kleine 21-25 Nukleotide (nt) lange Stücke geschnitten (Bernstein et al. 2001). Diese kleinen RNA Stücke werden *short interfering RNAs* genannt (siRNAs). Die siRNAs werden in eine Formation von argonautenhaltigen RNA-induzierten *silencing* Komplexen (*Agronaute-containing RNA-induced silencing complexes*: RISCs) integriert (Hammond et al. 2001). Der RISC-Komplex erkennt homologe mRNAs, die eine komplementäre Sequenz der siRNAs enthalten, und bindet sich an sie durch Basepaar-Interaktionen (Hammond et al. 2000), zerschneidet sie und verhindert dadurch die Translation des mRNAs, was mit anderen Worten zur post-transkriptionalen Stilllegung der mRNAs führt. In Pflanzen gibt es drei verschiedene RNA-Unterdrückungswege (Baulcombe 2004). Der erste RNA-Unterdrückungsweg umfasst die durch ~21 nt kleine RNA Stücke (*small interfering RNA*: siRNA) vermittelte post-transkriptionale Gen-Unterdrückung (PTGS). Hierbei kann die dsRNA aus RNA-Viren oder aus transferierten RNAi-Konstrukten stammen. Der zweite RNA-Unterdrückungsweg beruht auf einer Klasse von endogenen kleinen RNAs, den Mikro-RNAs (miRNAs). Sie werden durch das Enzym *Dicer-like 1* aus miRNA-Genen transkribierten miRNA-Vorläufern erzeugt. Die miRNA-Unterdrückung des Zielgenes führt durch eine Basenpaarung der miRNAs mit den Ziel-mRNAs entweder zur Hemmung der Translation oder zur Degradation der mRNAs. Der dritte RNA-Unterdrückungsweg beinhaltet eine transkriptionale Gen-Unterdrückung. Dabei führt eine siRNA-gelenkte Chromatin-Modifikation zu DNA- und Histon-Metylierung, wodurch die Transkription der betroffenen Gene unterdrückt wird.

In Pflanzen kann die RNAi-Unterdrückung durch ein doppelsträngiges (ds) RNA-Konstrukt in Form einer Haarnadel induziert werden (Wesley et al. 2001). Diese Form der Haarnadel-RNA wird *hairpin RNA* (hpRNA) genannt. Die hpRNA besteht aus zwei komplementären RNA-Strängen, die eine dsRNA bilden. Diese komplementären RNA-Stränge sind durch ein einsträngiges Intron voneinander getrennt. In der Abbildung 1.3 ist eine hpRNA schematisch abgebildet. Die effektivste RNA-Supprimierung wird mit hpRNAs in der Größe von 98 bis 853 Nukleotiden in vielen Pflanzenarten erreicht (Wesley et al. 2001) und die RNAi-Unterdrückung mittels hpRNA funktioniert über den viralen Abwehrweg (Fusaro et al. 2006). Ein RNAi-Konstrukt für die hpRNA kann unter anderem mit Hilfe von Agrobakterien in die Pflanzen eingeschleust werden. Hierfür wird die Information der komplementären RNA-Stränge, des Introns und einer Promotor-Region in das Agrobakterium kloniert. Bei einer Infektion einer Pflanze durch diese transgenen Agrobakterien wird ein Teil der transferierenden DNA in die Pflanze eingeschleust und in das pflanzliche Genom

integriert (Tinland 1996; Winkler et al. 1998). Nach diesem Prinzip entsteht eine stabil transgene Pflanze. Der verwendete Promotor verursacht dann die Transkription des RNAi-Konstrukts. Der in dieser Arbeit verwendete Blumenkohl-Mosaik-Virus 35S-Promotor (*cauliflower mosaic viral 35S promoter*; CaMV35S) sorgt für eine effektive konstitutive Transkription (Odell et al. 1985; Sanders et al. 1987).

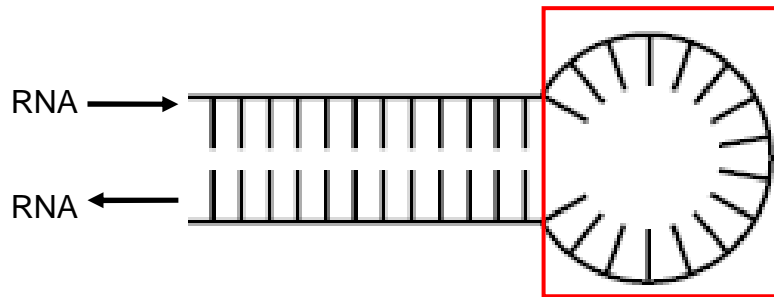


Abb. 1.3 Schematische Darstellung einer hairpin RNA. Bei der Haarnadel-RNA sind zwei komplementäre RNA-Stränge zu einer doppelsträngigen RNA zusammengelegt und sie werden durch ein einsträngiges Intron voneinander getrennt (rot umgeben), das dieses RNA-Konstrukt ihre Haarnadel-Form verleiht.

Im Vergleich zur traditionellen Pflanzenzüchtung ermöglicht die RNAi-Methode die simultane Ausschaltung von Proteinen in multigenen Familien (auf Sequenzhomologie basierend). In Kombination mit spezifischen Promotorelementen kann RNAi auf das Zielgewebe eingeschränkt werden, wobei die negativen Effekte des Proteinfunktionsverlusts minimiert werden (Le et al., 2006). Mit der RNAi-Technologie wurden bereits in mehreren Pflanzen allergene Proteine supprimiert. Es gibt Berichte über die RNAi-vermittelte Suppression des Mal d 1-Proteins in Apfel (Gilissen et al. 2005), der Lyc e 1- und Lyc e 3-Proteine in Tomaten (Le et al. 2006; Lorenz et al. 2006) und des Ara h 2 in Erdnuss (Dodo et al. 2008). Bei diesen Allergen-supprimierten Pflanzen wurde eine deutliche Reduktion der Allergenität der Früchte nachgewiesen.

1.4 TOTIPOTENZ VON PFLANZENZELLEN

Die Totipotenz beschreibt die Fähigkeit einer Zelle, sich unter geeigneten Bedingungen zu einem vollständigen Organismus zu entwickeln (Wagenitz 2003). Die Zellen der Möhre (*Daucus carota*) besitzen diese Fähigkeit. Es gibt viele Berichte über die *in vitro* Vermehrung von Möhren (Steward et al. 1970; Imani et al. 2002; Pant and Manandhar 2007; Mikschofsky et al. 2009). Die Totipotenz der Möhrenzellen wird auch bei der Transformation der Möhrenzellen genutzt. Dabei werden einzelne Möhrenzellen transformiert (Imani et al.

2002) und aus diesen einzelnen transgenen Zellen wächst eine Möhrenpflanze über die somatische Embryogenese heran (Li und Neumann 1985).

1.5 PILZLICHE PHYTOPATHOGENE

1.5.1 ABWEHRMECHANISMEN GEGEN NEKROTROPHE PILZE

Pflanzen werden von zahlreichen Phytopathogenen befallen. Es gibt Pflanzenviren, Bakterien, Pilze sowie Insekten und Nematoden, denen die Pflanze als Wirt für ihr Überleben dient. Während der Koevolution von Pflanzen und Pathogenen haben Pflanzen Abwehrmechanismen entwickelt, die sie vor den Pathogenen schützen. Die Pflanzenabwehrmechanismen gegen nekrotrophe Pilze bestehen aus der Synthese von toxischen reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*: ROS), der Produktion von antimikrobiellen Metaboliten wie Phytoalexinen, Induzierung von phytohormon-regulierten Signalwegen und der Induzierung von PR-Proteinsynthese (Penninckx et al. 1998; Thomma et al. 1998; Van Wees et al. 2003; Glazebrook 2005). Diese Abwehrmechanismen dienen zur Eliminierung des Pathogens und zur Begrenzung des befallenen Gewebeareals. Der Gehalt an den Phytohormonen Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) steigt in der Pflanze nach dem Befall von nekrotrophen Pilzen (Thomma et al. 1998; Van Wees et al. 2003) an. Das Phytohormon Salizylsäure (SA) scheint keine große Rolle bei der Abwehr von nekrotrophen Pilzen zu spielen, aber es wirkt bei der Abwehr mit (Glazebrook 2005). Durch Jasmonsäure werden unter anderem die PR-Proteine PR3 und PR4 aktiviert (Thomma et al. 1998).

1.5.2 NEKROTROPHE PILZE

Die pilzlichen Phytopathogene *Alternaria dauci* ([Kühn] Groves & Skolko), *Alternaria radicina* (Meier, Drechsler & Eddy) und *Botrytis cinerea* ([de Bary] Whetzel) gehören der Klasse der Ascomycetes an (Sitte et al. 2002). Alle drei Pilze haben eine nekrotrophe Lebensweise, und wenn sie Pflanzen befallen, verursachen sie Nekrosen auf den Pflanzen.

Alternaria dauci (*A. dauci*) verursacht die Pflanzenkrankheit Möhrenschwärze und ist eine der schädlichsten Blattpathogene der Möhre (Farrar et al. 2004). *A. dauci* ist verantwortlich für gravierende pilzliche Schäden auf Möhren weltweit. Die Verluste durch *A. dauci* können 40 bis 60% erreichen (Ben-Noon et al. 2001). Die Krankheitssymptome sind auf den Blättern als dunkel werdende Stellen zu erkennen. Die Möhrenschwärze ist bei kultivierten und Wildtyp-Möhren bekannt (Simmons, 1995).

Alternaria radicina verursacht die Pflanzenkrankheit Schwarzfäule und ist in erster Stelle ein Möhrenpathogen (Pryor and Gilbertson 2001; Farrar et al. 2004). Neben der Möhre kann *A. radicina* auch Petersilie, Sellerie und Fenchel befallen. Dieser Pilz befällt die Wurzel, selten die Blätter (Farrar et al. 2004). Seit der Entdeckung von *A. radicina* gab es Meldungen über diese Pflanzenkrankheit von allen Hauptmöhrenwuchsregionen der Welt (Simmons, 1995). *A. radicina* produziert auf Möhren die Mykotoxine Radicinin, Epi-radicinol und Radicinol. Diese Mykotoxine stellen jedoch kein Risiko für Menschen dar (Solfrizzo et al. 2005). *A. radicina*-Sporen können durch Wind verbreitet werden, was den Schutz der geernteten Möhren erschwert (Pryor and Gilbertson 2001; Farrar et al. 2004). Die Größe der Schäden durch *A. radicina* sind nicht bekannt. Es sind bis jetzt keine resistenten Möhrensornten gegen diese beiden *Alternaria*-Krankheiten entdeckt worden (Farrar et al. 2004).

Botrytis cinerea (*B. cinerea*) besitzt ein sehr großes Wirtspflanzenspektrum und befällt von Bohnen bis zu Weinreben sehr viele Pflanzenarten (Börner 2009). *B. cinerea* verursacht die Pflanzenkrankheit Lagerfäule, besser unter den Namen Grauschimmel bekannt. Bei Lagerung von Möhren kommt es häufig zu *B. cinerea*-Infektionen (Goodliffe and Heale 1978). In erster Linie befällt *B. cinerea* geschwächte Pflanzen und bevorzugt wasserreiches Gewebe (Börner 2009).

Diese drei vorgestellten Pilze verursachen einen erheblichen agronomischen Schaden an Möhrenernten und sind die Hauptverursacher für die Möhrenernteverluste (Farrar et al. 2004; Baranski et al. 2006).

1.6 SALIZYLSÄURE IN DER PFLANZENABWEHR

Die Salizylsäure (SA) ist nicht nur als ein Phytohormon bekannt, sie ist auch in Form eines synthetischen Derivats der SA als das Schmerzmittel Aspirin bekannt. SA ist eine phenolische Verbindung und wird den sekundären Pflanzenstoffen zugeordnet. Die chemische Struktur der Salizylsäure ist in der Abbildung 1.4 (A) zu sehen. SA spielt unter anderem bei der pflanzlichen Keimung, dem Wachstum, der Respiration und bei der Abwehr gegen Phytopathogene eine Rolle. Die SA-abhängigen Signalwege werden durch die sogenannte Hypersensitiven Reaktion (HR) und durch den Befall bestimmter Phytopathogene ausgelöst (Glazebrook 2005). Die HR führt zum lokalen Absterben des Pflanzengewebes. Die Zunahme an SA führt zu systemisch ausgelöster Resistenz (*systemic acquired resistance*: SAR) (Gaffney et al. 1993; Delaney et al. 1994) und dadurch zur Aktivierung von mehreren antimikrobiellen Genen, wie z.B. den Pathogenese-assoziierten (*pathogenesis-related*: PR) Genen *PR1* und

PR10 (Uknes et al. 1992; McGee et al. 2001). Die systemisch ausgelöste Resistenz führt zu andauernder und ausgedehnter Resistenz gegen Infektionen von vielen Pathogenen (Vlot et al. 2009).

Der SA-Biosyntheseweg ist noch nicht lückenlos geklärt (Abb. 1.4 B). Es ist bekannt, dass L-Phenylalanin zu SA konvertiert werden kann. Dies erfolgt über mindestens zwei Schritte. Zuerst wird das L-Phenylalanin durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) in Zimtsäure umgewandelt und dann vermutlich in Benzoessäure. Anschließend wird die Benzoessäure durch die Benzoessäure-2-Hydroxylase katalysiert in Salizylsäure umgewandelt. Die Salizylsäure induziert anschließend die lokale und systemische Resistenz der Pflanze sowie die Synthese der PR-Proteine. Die Zimtsäure kann auch über weitere Synthesewege zu Flavonoiden und Lignin umgewandelt werden. Der größte Teil der synthetisierten Salizylsäure wird durch das Enzym Salizylsäure-Glykosyltransferase (SAGT) in SA O- β -Glukoside (SAG) umgewandelt (Lee and Raskin 1999; Dean et al. 2005). Die SA O- β -Glukoside werden aktiv aus dem Cytosol in die Vakuole transportiert, wo sie wahrscheinlich gelagert werden. Bei Bedarf können die SAGs zurück zu SA umgewandelt werden (Dean et al. 2005). Allerdings kann SA synthetisiert werden, wenn der Phenylalaninsignalweg inhibiert ist (Mauch-Mani and Slusarenko 1996; Coquoz et al. 1998). Daher muss es noch einen anderen SA-Syntheseweg geben. Ein weiterer SA-Syntheseweg wurde in *Arabidopsis* *sid2*-Mutanten (*sid2*: ein Abwehr assoziiertes Protein von *Arabidopsis*) entdeckt. Hierbei verläuft die SA-Synthese über den Shikimisäureweg. Im ersten Schritt wird das Chorismat durch die Isochorismatesynthase (ICS) in Isochorismat umgewandelt und anschließend durch eine Pyruvatlyase (PL) in Salizylsäure und Pyruvat gespalten (Abb. 1.5) (Wildermuth et al. 2001).

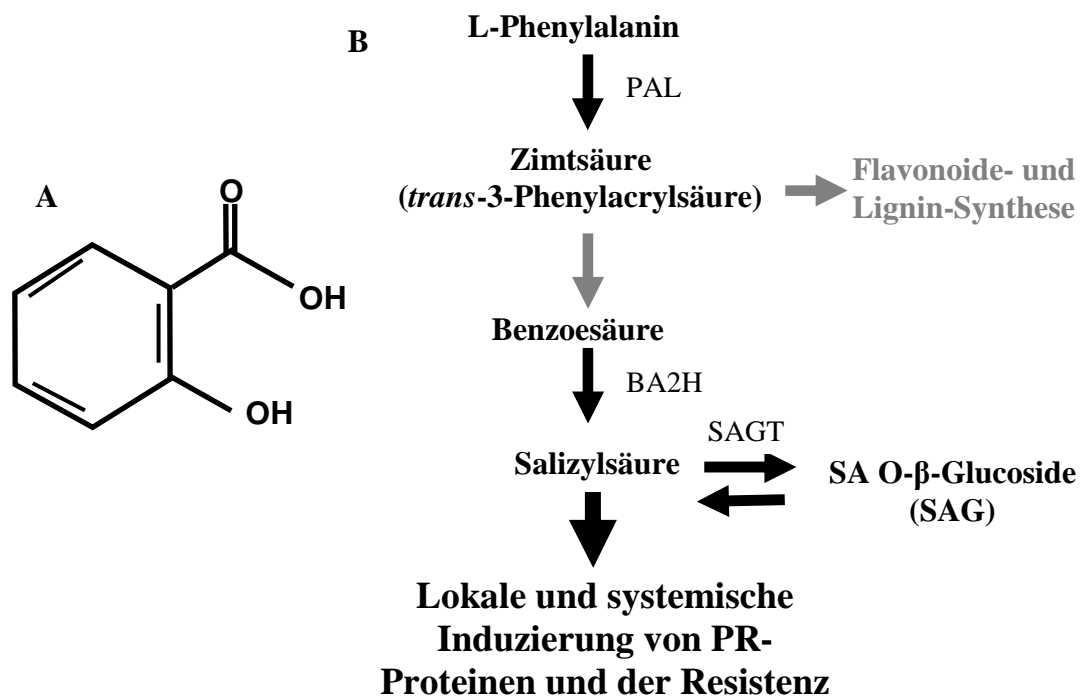


Abb. 1.4: Chemische Struktur und die Biosynthese von Salizylsäure. Die Salizylsäure ist eine phenolische Verbindung mit einem aromatischen Ring (A). Die SA-Biosynthese fängt bei L-Phenylalanin an und führt über Zimtsäure und Benzoessäure zu Salizylsäure. PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, BA2H: Benzoessäure-2-Hydroxylase, SAGT: SA-Glykosyltransferase. Modifiziert nach Lee et al. (1995).



Abb. 1.5: Die Biosynthese von Salizylsäure über den Shikimisäureweg. Im ersten Schritt wird das Chorismat von Isochorismatesynthase katalysiert in Isochorismat umgewandelt und anschließend durch die Pyruvatlyase in Salizylsäure und Pyruvat gespalten. ICS: Isochorismatesynthase, PL: Pyruvatlyase.

1.7 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Im Vordergrund dieser Arbeit steht das allergene Protein Dau c 1 der Möhre (*Daucus carota*). Es ist das Hauptallergen der Möhre, etwa 98% der Möhrenallergiker reagieren auf dieses Protein allergisch. Das Dau c 1 gehört zu den Pathogenese-assoziierten Proteinen der Pflanzen. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle im pflanzlichen Immunsystem, aber die Funktion des Dau c 1 ist in diesem Zusammenhang noch unbekannt. Ziel des Projektes ist einerseits die Herstellung von hypoallergenen Möhren mittels der RNA-Interferenz (RNAi)-Strategie, wobei die Dau c 1-Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 unabhängig voneinander in Möhren supprimiert werden sollen. Andererseits ist das Ziel, die Bedeutung dieses Proteins für das pflanzliche Immunsystem zu klären. Durch die Herstellung von hypoallergenen

Möhren kann erstmals die Funktion der allergenen Proteine für das Immunsystem der Möhre untersucht werden, indem man die Resistenz der hypoallergenen Möhren im Vergleich zu Wildtypmöhren analysiert. Da die Dau c 1-Isoformen unabhängig voneinander mittels RNAi unterdrückt werden, können die Auswirkungen des Fehlens jeweils einer Dau c 1-Isoform analysiert werden. Diese Analysen werden mit pilzlichen Phytopathogenen durchgeführt. Gleichzeitig schaffen die hypoallergenen Möhren eine Möglichkeit für die betroffenen Allergiker, frische Möhren zu verzehren. Daher werden Hautreaktionstests mit den hypoallergenen Möhren an Möhrenallergikern sowie IgE-Reaktivitätsanalysen mit Seren von Möhrenallergikern von unseren Kooperationspartnern durchgeführt.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Die bei dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Labormaterialien wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland (D)), Sigma-Aldrich (München, D), Roth (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D), Invitrogen (Karlsruhe, D), Qiagen (Hilden, D), Promega (Mannheim, D), Fermentas (St. Leon-Rot, D), Sarstedt (Nürnberg, D), Greiner (Solingen, D) und Duchefa (Haarlem, Niederlande) bezogen.

2.1 PFLANZENMATERIAL UND ANZUCHTBEDINGUNGEN

Diese Arbeit wurde mit Möhren (*Daucus carota* spp. *sativus* cv. Rodelika) durchgeführt. Die Samen stammten von der Bingenheimer Saatgut AG (G280A).

2.1.1 OBERFLÄCHENSTERILISATION DER MÖHRENSAMEN

Möhrensamen wurden zweimal mit H_2O_{dest} gewaschen und für eine Minute in 70%iges Ethanol gegeben. Anschließend wurden die Samen in ein Glas mit 3%igem NaOCl und einem Tropfen Tween 20 überführt und für 1,5 Stunden gerührt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Samen in ein Sieb gegeben und drei Mal für jeweils drei Minuten mit H_2O_{dest} gewaschen. Samen, die nicht sofort weiterbearbeitet wurden, wurden unter sterilen Bedingungen getrocknet und bei 4°C gelagert.

2.1.2 IN VITRO KULTIVIERUNG VON MÖHREN

2.1.2.1 Herstellung von Möhrenkallus- und Zellkulturen

Oberflächensterilisierte Möhrensamen wurden auf einem B5-Agar (Gamborg et al. 1968) in Babynahrungsgläsern unter sterilen Bedingungen im Gewebekultorraum (siehe Tab. 2.1) kultiviert. Die Petiolen gekeimter Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen in ca. ein cm lange Stücke geschnitten, um nachfolgend Kalluswachstum auf B5-Agar nach Zugabe des synthetischen Hormons 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D; B5-Agar^{2,4-D}) zu induzieren (Abb. 2.1 D). Der Kallus diente als Ausgangsmaterial für die flüssigen Zellkulturen (Abb. 2.1 A), die für die Transformation benötigt wurden. Hierfür wurde ein Kallus (Ø 1,5 cm) in 300 ml flüssiges B5-Medium^{2,4-D} gegeben und unter Schütteln (100 rpm) bei gleichen Anzuchtbedingungen kultiviert.

B5-Nährmedium oder –Agar

Saccharose	20 g/l
Caseinhydrolysat	250 mg/l
10x B5-Stammlsg.	100 ml/l
Fe-EDTA-lsg.	10 ml/l
Mg-Lsg.	7 ml/l
Vitamin-Lsg.	1 ml/l
Myo-Inosit-Lsg.	10 ml/l
optional: 2,4-D-Lsg.	5 ml/l
pH: 5,70-5,72	
optional: Gelrite	4 g/l

10x Stammlösung B5

Makroelemente	
NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	1,5 g/l
KNO ₃	30 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,34 g/l
MgSO ₄ •7 H ₂ O	
CaCl ₂ •2H ₂ O	1,5 g/l
Mikroelemente	
MnSO ₄ •H ₂ O	100 mg/l
H ₃ BO ₃	30 mg/l
ZnSO ₄ •7 H ₂ O	20 mg/l
Na ₂ MoO ₄ •H ₂ O	2,5 mg/l
CuSO ₄ •5 H ₂ O	0,25 mg/l
KI	7,5 mg/l

Fe-EDTA-Lösung

Fe-EDTA	4,63 g/l
---------	----------

Mg-Lösung

MgSO ₄ •7 H ₂ O	36 g/l
---------------------------------------	--------

Vitamin-Lösung 100mL

Nikotinsäure	50 mg
Thiamin	10 mg
Pyridotaxin	10 mg

Hormonlösungen

Myo-Inosit-Lösung	100 ml
Myo-Inosit	500 mg
2,4-D-Lösung	100 ml (100 ppm)
2,4-D	10 mg
(in 1-2 ml absolutes Ethanol vorlösen)	

2.1.2.2 Kultivierung von Möhren-Kalluskulturen

Die Wildtyp-Kalluskulturen wurden auf B5^{2,4-D}-Agarplatten (Ø 9,4 cm) im Gewebekulturraum kultiviert. Sie wurden alle 3 bis 4 Wochen auf frischen B5^{2,4-D}-Agarplatten subkultiviert.

Die transgenen Kalluskulturen waren durch die Transformation mit pK7GWIWG2(II)-Dau c 1.01- bzw. -Dau c 1.02 in die Möhrenzellen und durch den Einbau des RNAi-Konstruktes in das Genom der Möhrenzellen gegen das Antibiotikum Kanamycin resistent. Dadurch wurden sie auf B5^{2,4-D} Agarplatten kultiviert, welchen 100 mg Kanamycin pro Liter Medium zugeben wurde. Das Kanamycin verhinderte das Wachstum von nicht transgenen Möhrenzellen Die Kultivierung sowie die Subkultivierung erfolgte wie bei den Wildtyp-Kalluskulturen.

2.1.2.3 Kultivierung von Möhrenzellkulturen

Die Wildtyp-Zellkulturen wurden in 300 ml Erlenmeyerkolben (siehe Tab. 2.2) im B5-Medium^{2,4-D} kultiviert. Sie wurden alle zwei Wochen in einem neuen Erlenmeyerkolben mit frischem, flüssigem B5-Medium^{2,4-D} subkultiviert. Hierbei wurde die Zellsuspension in ein

Becherglas überführt, und, nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, der Überstand verworfen. Etwa 2 ml der Zellen wurden in den neuen Erlenmeyerkolben subkultiviert.

Die RNAi-Zellkulturen wurden ebenso alle zwei Wochen subkultiviert. Die Kultivierung erfolgte in 100 und 250 ml Erlenmeyerkolben (siehe Tab. 2.2). Zu dem B5-Medium^{2,4-D} wurde 100 mg/l Kanamycin zugegeben.

2.1.2.4 Kultivierung von frisch transformierten Möhrenzellen

Die frisch transformierten Möhrenzellen wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit frischem B5-Medium^{2,4-D} und Antibiotika (Kanamycin und Ticarcillin) im Gewebekulturraum (siehe Bedingungen in Tab. 2.1) kultiviert. Kanamycin verhinderte das Wachstum von nicht transgenen Zellen und Ticarcillin diente zur Eliminierung der zur Transformation verwendeten Agrobakterien.

Diese Zellkulturen wurden alle zwei Wochen gewaschen und subkultiviert. Hierbei wurde die Zellsuspension in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner, Solingen) überführt und, nach Absetzung der Zellen, der Überstand verworfen. Es wurden 30 ml frisches B5-Medium^{2,4-D} zu den Zellen geben und die Reaktionsgefäße wurden drei Minuten mit 3000 rpm bei RT zentrifugiert (Rotina 48R, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde abdekantiert und der Waschgang wiederholt. Anschließend wurden 1-2 ml der Zellsuspension in einem neuen Erlenmeyerkolben mit frischem B5-Medium^{2,4-D}_{Kan/Tic} subkultiviert.

Antibiotika

Kanamycin	1 ml/l (100 mg/ml in H ₂ O)
Ticarcillin	1 ml/l (150 mg/ml in H ₂ O)

Tab. 2.1: Kulturbedingungen der Möhrenkulturen. In der Tabelle sind die Kulturbedingungen der *in vitro* Möhrenkulturen sowie die Kultivierungsbedingungen der Möhrenpflanzen mit dem jeweiligen Tag/Nacht-Zyklus, Temperatur und Lichtintensität angegeben.

Anzuchtraum	Tag/Nacht-Zyklus (Std.)	Temperatur (Tag/Nacht)	Lichtintensität
Gewebekulturraum	16/8	24	ca. 47 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Kleiner Anzuchtraum	16/8	18	160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Anzuchtschrank (Vötsch, Balingen)	16/8	22/18	160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Gewächshaus	16/8	20/16	160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Tab. 2.2: Größe der Erlenmeyerkolben und das Volumen des eingesetzten Mediums der Möhrezellkulturen. In der Tabelle sind die Größen der verwendeten Erlenmeyerkolben und das Volumen des eingesetzten flüssigen B5-Mediums für die Zellsuspensionen angegeben.

Größe der Erlenmeyerkolben	Volumen des flüssigen B5-Mediums
100 ml	30 ml
250 ml	70 ml
300 ml	100 ml

2.1.3 HERSTELLUNG VON PFLANZEN AUS DER ZELLKULTUR

Für die Herstellung von Pflanzen aus der Zellkultur wurden Zellen bei der Subkultivierung mit B5-Medium ohne das 2,4-D-Hormon gewaschen (siehe Kapitel 2.10) und in ein 2,4-D-freies B5-Medium überführt. Das 2,4-D unterdrückt die Entwicklung der Zellen und durch das Fehlen des 2,4-D' konnten die Zellen sich über die somatische Embryogenese zu Embryonen (Abb. 2.1 B) und anschließend zu kleinen Pflanzen (Abb. 2.1 C) entwickeln. Nach der Überführung der Zellen in das B5-Medium wurden die kleinen Embryonen nach etwa vier Wochen auf B5-Agarplatten überführt. Auf diesen Agarplatten entwickelten sich aus den Embryonen kleine Pflanzen. Die kleinen Pflanzen wurden in Babynahrungsgläsern auf B5-Agar umgesetzt (Abb. 2.1 C). Nach Erreichen einer Blatthöhe von etwa 5 cm und nach der Entwicklung der Wurzeln, wurden sie in Seramis:Oildry-(2:1)-Gemisch getopft und für eine Woche in einem handelsüblichen Minigewächshaus akklimatisiert. Nach der Akklimatisierung und fortschreitendem Wachstum der Pflanzen (etwa ein Monat) wurden die Pflanzen in größere Töpfe (11x11x12 cm) in ein Gemisch aus Erde und Sand (5:1) umgetopft und in einem Anzuchtschrank (siehe Tab. 2.1) für einen weiteren Monat kultiviert und anschließend ins Gewächshaus umgesiedelt.

2.1.4 KULTIVIERUNG DER TRANSGENEN PFLANZEN

Die transgenen Pflanzen wurden nach dem gleichen Prinzip aus Möhrezellen erzeugt und kultiviert wie die Wildtyp-Pflanzen (siehe Kapitel 2.1.3). Bei den transgenen Linien wurde allerdings bis zur Kultivierung der einzelnen Pflanzen immer das Antibiotikum Kanamycin (100 mg/l) zum B5-Medium sowie dem Agar zugesetzt.

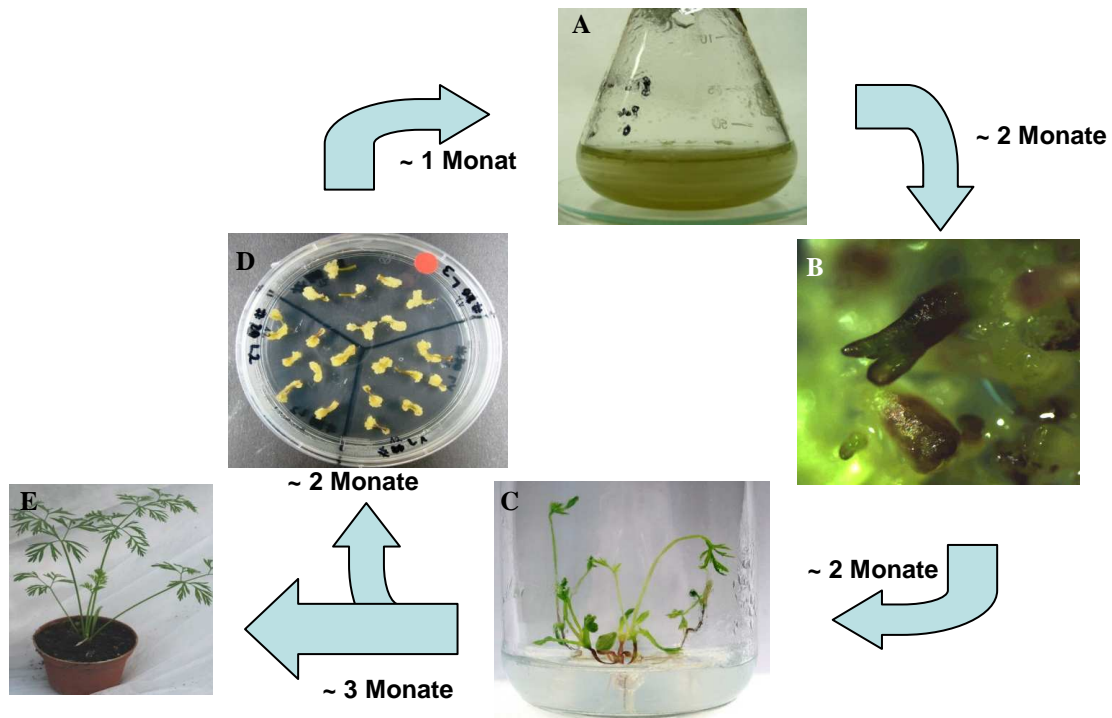


Abb. 2.1: Generierung transgener Möhren. In der Abbildung ist der Generierungszyklus transgener Möhren abgebildet. Die Zellen der Möhrensuspension (A) werden transformiert und nach der Eliminierung der zur Transformation benötigten Agrobakterien bilden sich die Zellen im 2,4-D-freien Medium zu kleinen Embryonen (B) um. Über die somatische Embryogenese wachsen aus den Zellen kleine Pflanzen heran (C), von denen ein Petiolus zur Kallusinduktion angeregt wird (D). Aus der restlichen Pflanze wächst eine ausgewachsene Möhre heran (E). Aus dem Kallus (D) kann eine neue Zellsuspension hergestellt werden.

2.2 ANZUCHTMATERIAL UND KULTIVIERUNG VON PHYTOPATHOGENEN PILZEN

2.2.1 PHYTOPATHOGENE PILZE

Es wurden drei pilzliche Phytopathogene *Alternaria radicina*, *Alternaria dauci* und *Botrytis cinerea* (Herkunft: siehe Tab. 2.3) für die Resistenzanalysen der hypoallergenen Möhren eingesetzt.

Tab. 2.3: Herkunft der verwendeten, pilzlichen Pflanzenpathogene. In der Tabelle sind die eingesetzten pilzlichen Pflanzenpathogene mit dazugehörigen Informationen über die hervorgerufene Krankheit, Zielorgan in der Möhre, Herkunft des Isolats sowie einige zusätzlichen Bemerkungen angegeben. Die Arbeit mit *Alternaria radicina* wurde am IPAZ, Gießen sowie am JKI, Quedlinburg (Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst) durchgeführt. Die Pathogene *Alternaria dauci* und *Botrytis cinerea* wurden nur am JKI, Quedlinburg eingesetzt.

Krankheit	Pathogen	Organ	Isolat	Bemerkung
Möhrenschwärze	<i>Alternaria dauci</i>	Blatt	Isolat „Bruno“, von Möhre, aus dem JKI, Braunschweig	Einsporlinien
Schwarzfäule	<i>Alternaria radicina</i>	Wurzel, Petiole, Blatt	Isolat von Möhre, von Herrn R. Baranski, Uni Krakow/Polen isoliert; aus dem Depot des JKI Quedlinburg (Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst)	
Lagerfäule: Grauschimmel	<i>Botrytis cinerea</i>	Wurzel, Petiole, Blatt	Isolat von Pelargonie/Möhre aus dem JKI, Quedlinburg	

2.2.1.1 Kultivierung der pilzlichen Pathogene

Die Pilze wurden in Petrischalen (Ø 9,4 cm) auf Möhrenlaub- und Gemüsesaft-Agar im Dunkeln bei 21°C für 6 Wochen kultiviert (Inkubationsschrank Memmert, Schwabach). Anschließend wurden die Pilzkulturen bei 4°C aufbewahrt und zum Überimpfen auf neue Agarplatten verwendet.

Für das Möhrenlaub-Agar wurde das Möhrenlaub für 16 Stunden in Wasser inkubiert und anschließend das Wasser ohne das Laub mit Agar-Agar gemischt, autoklaviert und in Petrischalen gegossen.

Für den Gemüsesaft-Agar wurden die unten aufgeführten Bestandteile zusammengegeben, autoklaviert und ebenfalls in Petrischalen gegossen.

Möhrenlaub-Agar

getrocknetes Möhrenlaub 25 g/l
Agar-Agar 23 g/l

Gemüsesaft-Agar

Gemüsesaft 200 ml/l
CaCO₃ 3 g/l
Agar-Agar 23 g/l

2.2.1.2 Herstellung des Pilzsporeninokulats

Die Sporen der jeweiligen Pilze wurden von etwa drei Wochen alten Agarplatten durch Zugabe von 3 ml H₂O_{dest} in die Petrischale und nach anschließendem Waschen mit der Pipettenspitze in 2 ml-Reaktionsgefäße übergeführt. Hierbei wurde das Wasser mit der Pipette aufgenommen und auf das Pilzmycel gespritzt, wobei die Pilzsporen frei im Wasser schwimmen konnten und so mit der Pipette in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt werden

konnten. Die Konzentration des Pilzsporeninokulats wurde mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und anschließend auf die gewünschte Konzentration (1×10^5) verdünnt.

2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.3.1 RNA EXTRAKTION

Für die RNA Extraktion wurde gefrorenes Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert.

2.3.1.1 RNA Extraktion mit RNeasy Kit

Die RNA für die Herstellung der RNAi-Konstrukte wurde aus gefrorenem Pulver der etwa einen Monat alten sterilen Möhrenpflanzen mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers extrahiert. Die Proben wurden mit jeweils 450 μ l RLT-Puffer versetzt, gevortext und für drei Minuten bei 56°C inkubiert. Die Proben wurden jeweils in eine QIAshredder-Säule transferiert, die sich in einem 2ml-Sammelgefäß befand. Die Ansätze wurden für zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert (Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand des Durchflusses wurde in ein neues Sammelgefäß überführt, 125 μ l 96%iges Ethanol wurde zu den Proben zugegeben und die Reaktionsgefäße leicht geschwenkt. Die Proben wurden in 2 ml-Sammelgefäßen sich befindenden RNeasy-Säulen überführt und für 15 Sekunden bei RT mit 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Es wurden 700 μ l RW1-Puffer in die Säulen pipettiert und erneut für 15 Sekunden mit 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde entfernt und in die Säulen wurden 500 μ l RPE-Puffer gegeben und wie eben beschrieben zentrifugiert. Nach der Entfernung des Durchlaufs wurden erneut 500 μ l RPE-Puffer in die Säulen gegeben und für zwei Minuten mit 10.000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden zuerst in neue 2 μ l Sammelgefäße gesteckt und für eine Minute zentrifugiert und anschließend in neue 1,5 μ l Sammelgefäße gegeben. Auf der Säulenmembran wurden 50 μ l RNase freies Wasser zum Lösen der RNA gegeben und sie wurden für eine Minute mit 1000 rpm zentrifugiert.

2.3.1.2 RNA Extraktion mit TRIZOL

Die Extraktion der Gesamt-RNA weiterer Proben wurde mittels des TRIZOL-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Es wurde 1ml TRIZOL-Reagenz zu ca. 200-300 mg gemörsertem, schockgefrorenem Pflanzenmaterial pipettiert und der Ansatz wurde gründlich gevortext. Nach einer 2-3 minütigen Inkubation bei RT wurden zur Abtrennung von Proteinen und DNA 200 μ l Chloroform zugegeben und der Ansatz wurde leicht geschüttelt. Darauf

folgte eine 2-3 minütige Inkubation bei RT und der Ansatz wurde für 20 Minuten mit 15.000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene RNA mit 500 µl Isopropanol für 10 Minuten bei RT gefällt. Die RNA wurde anschließend durch eine Zentrifugation (30 Minuten, 15.000 rpm, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 75%igen EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurden zu dem Pellet 30 µl RNase-freies Wasser pipettiert und die RNA durch eine fünfminütige Inkubation bei 65°C gelöst.

2.3.2 DNA EXTRAKTION

Die DNA wurde aus kleinen Blattstücken bzw. aus einer kleinen Menge Kallus extrahiert. Hierfür wurde das REExtract-N-AmpTM Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich, München) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils ein etwa 0,3 cm x 0,3 cm großes Stück vom Blatt oder ein Teil des Kallus in etwa der gleichen Größe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl Extraktionslösung gegeben. Der Ansatz wurde leicht gevortext und für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Dilutionslösung zu dem Ansatz pipettiert.

Für den anschließenden PCR-Ansatz wurden 4 µl der DNA-Lösung mit 7 µl REExtract-N-Amp PCR Ready Mix (Sigma-Aldrich, München), je 10 pmol der Primer und 5 µl H₂O zusammengegeben. Die PCR wurde wie in Kapitel 2.3.4.1 beschrieben durchgeführt.

2.3.3 cDNA SYNTHESE

2.3.3.1 cDNA-Synthese mit SuperScript II

Vor der cDNA-Synthese mit SuperScript II (Super-ScriptII cDNA Synthesis Kit, Invitrogen, Karlsruhe) wurden die RNA-Proben vor der cDNA-Synthese mit DNase I (Invitrogen) verdaut, um unerwünschte Rest-DNAs zu beseitigen und anschließend nach Angaben des Herstellers in cDNAs transkribiert. Für jede Reaktion wurden 0,5-1 µg Gesamt-RNA, 50 µM Oligod-T- und 50 ng Random-Hexamer-Primer eingesetzt. Nach der reversen Transkription wurden die Ansätze je mit 2 units RNase H (Fermentas, St. Leon-Rot) verdaut. Die cDNA wurde für die qPCR-Analysen auf 2,5 ng/µl Eingangs-RNA verdünnt.

2.3.3.2 cDNA-Synthese mit QuantiTect[®] Reverse Transcription

Die cDNA-Synthese mit QuantiTect[®] Reverse Transcription (Qiagen, Hilden) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für jede Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNA

eingesetzt und die cDNA wurde für die qPCR-Analysen auf 2,5 ng/µl Eingangs-RNA verdünnt.

2.3.4 STANDARD POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) und QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (qPCR)

2.3.4.1 STANDARD-PCR

Die Standard-PCR wurde in einem Volumen von 20 µl entweder mit 1,25 units DCSPol DNA-Polymerase (DNA Cloning Service, Hamburg), 2 µl 10 x Inkubationspuffer, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 10 pmol der entsprechenden Oligonukleotide (Primer) oder mit 1,25 u GoTag[®] DNA-Polymerase (Promega, Mannheim), 4 µl 5x GoTag[®] GreenFlexi-Inkubationspuffer, 2mM MgCl₂, 200 µM dNTPs und 10 pmol der ausgewählten Primer (siehe Tab. 2.5) durchgeführt. Als Templates dienten DNA-Mengen zwischen 7 und 100 ng. Die Amplifikation wurde wie unten angegeben (Tab. 2.4) im T_{Personal}-Cycler (Biometra, Göttingen) bzw. im GeneAmp[®] PCR System 2700 (Applied Biosystems, Inc., CA, USA) durchgeführt.

Tab. 2.4: Die Standard-PCR-Amplifikation. In der Tabelle sind die Schritte der Standard-PCR-Amplifikation angegeben.

1. Schritt	2. Schritt	3. Schritt	4. Schritt	5. Schritt	6. Schritt
95°C	95°C	AT*	72°C	72°C	8°C
4 min	30 s	30 s	30 s	10 min	unendlich
	35 - 42 Zyklen				

*Die Anlagerungstemperaturen (AT) der jeweiligen Primer sind in Tabelle 2.5 angegeben.

2.3.4.2 qPCR

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) wurde zur relativen Quantifizierung ausgesuchter Transkripte in cDNA-Proben aus Möhren-Kallus, -blättern und -wurzeln verwendet. Pro Reaktion wurden 7,5 ng umgeschriebene Gesamt-RNA (cDNA) in 7,5 µl SYBR Green JumpStart[™] Taq ReadyMix[™] (Sigma-Aldrich, München) mit 3,5 µl RNase-freiem und DNase-freiem Wasser und 350 nM Oligonukleotiden (Primern) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Jede Probe wurde als Triplikat angesetzt. Die Amplifikation erfolgte in einem Cycler von Stratagene (Stratagene 36 Mx3000P QPCR SystemMx3000P; Stratagene Research, La Jolla, CA, USA) oder von Applied Biosystems (Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR, Applied Biosystems Inc., CA, USA) mit gleichen PCR-Programmen. Nach einem ersten Denaturierungsschritt (95 °C, 4 Minuten) folgten 42 Amplifikationszyklen mit einer primerabhängigen Anlagerungstemperatur (AT, vgl. Tab. 2.5) und dem folgenden

Programm: 95°C 30 s, AT 30 s, 72°C 30 s. Am Ende jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen und im Anschluss an die PCR eine Dissoziationskurve im Bereich von 60-95°C in 0,5°C-Schritten aufgezeichnet.

Die Cyclethreshold (Ct)-Werte wurden von der zu den Instrumenten gehörigen Software bestimmt und die relativen Expressionswerte ($2^{-\Delta Ct}$) nach Livak & Schmittgen (2001) berechnet. Als Referenzgene wurden die konstitutiv exprimierten Gene Ubiquitin (Akzessionsnummer: DCU68751) oder Actin (Akzessionsnummer: X17525) eingesetzt. Die Sequenzen der verwendeten Primer finden sich in Tabelle 2.5.

2.3.5 GELELEKTROPHORESE

2.3.5.1 TAE-GELE

Eine Auftrennung der PCR-Amplifikate und Plasmide erfolgte nach Zugabe von 10 x DNA-Ladepuffer mittels Gelelektrophorese in mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegelen (1,5-2%-ige TAE-Gele, 0,7 Vol % Ethidiumbromid [Stammlösung: 10 mg/ml]). Die PCR-Amplifikate, die mit der GoTag[®] DNA-Polymerase unter der Verwendung des 5x GoTag[®] GreenFlexi-Inkubationspuffers (Promega, Mannheim) amplifiziert wurden, wurden ohne 10 x DNA-Ladepuffer aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe). Die Dokumentation der Gele erfolgte auf einem UV-Transluminator (Fröbel-Labortechnik, Lindau) bei einer Wellenlänge von 312 nm und mit einer Videodokumentationsanlage (digitStore, INTAS, Göttingen).

50 x TAE

242 g/l Tris
57,1 ml/l Essigsäure (Acetic acid)
100 ml/l 0,5 M EDTA
pH 8,5

10 x Probenpuffer

0,25% (w/v) Bromphenolblau
40% (w/v) Saccharose

2.3.5.2 MOPS-GELE

Die Auftrennung der RNA erfolgte nach Zugabe von 1:1 (v/v) 2x RNA-Ladepuffer zu 500 ng Gesamt-RNA. Die Probe wurde für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein 1,2%iges Agarose-Gel mit 5% (v/v) Formaldehyd in 1x MOPS-Puffer aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation der Gele erfolgte auf einem UV-Transluminator (Fröbel-Labortechnik, Lindau) und mit einer Videodokumentationsanlage (digitStore, INTAS, Göttingen).

10 x MOPS-Puffer

200 mM Morpholin-3-propansulfonsäure
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA (pH 7,0)
1% (v/v) DEPC

DEPC-Wasser 1l

1 ml DEPC (1 mg/ml)
12 h bei Raumtemperatur
inkubieren, autoklavieren

2.3.6 AUFREINIGUNG DER PCR-PRODUKTE AUS EINEM TAE-GEL

Aufreinigungen von aus TAE-Gelen ausgeschnittenen Banden erfolgten mit Hilfe des Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) oder mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) jeweils nach Angaben des Herstellers.

2.3.7 KONZENTRATIONS- UND REINHEITSBESTIMMUNG VON RNA- UND DNA-PROBEN

Standardmäßige Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von DNA- und RNA-Proben erfolgten auf dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (PeqLab Biotechnologie, Erlangen).

2.3.8 SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung wurde mit ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc., CA, USA) im IFZ-eigenen Sequenzierlabor durchgeführt.

2.4 RNA-INTERFERENZ (RNAi)

Das RNAi-Phänomen wurde zum ersten Mal von Fire et al. (1998) beschrieben, als sie doppelstrangige RNA in *Caenorhabditis elegans* injizierten und dies zur Gen-Unterdrückung führte. Im Vergleich zur traditionellen Züchtung ermöglicht die RNAi-Methode die simultane Unterdrückung von multigenen Familien (auf Homologie basierende Unterdrückung verwandter Gene) in Pflanzen.

2.4.1 SYNTHESE DER RNAi-KONSTRUKTE

Die RNA wurde aus einem Monat alten, sterilen Möhren-Pflanzen mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) wie im Kapitel 2.3.1.1 beschrieben extrahiert. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem SuperScript II RT Kit (Invitrogen, Karlsruhe, siehe Kapitel 2.3.3.1). Für die Synthese des Dau c 1.01-RNAi-Konstrukts wurde ein 253-bp cDNA-Fragment von Dau c 1.01 (Akzessionsnummer Z81362; nt 1-253; Kapitel 7.1.1) durch eine PCR mit den Primern Dau c 1.01-RNAi-fwd und Dau c 1.01-RNAi-rev amplifiziert (vgl. Tab. 2.5). Für die Synthese des Dau c 1.02-RNAi-Konstrukts wurde ein 267-bp cDNA-Fragment von Dau c 1.02

(Akzessionsnummer AF456481; nt 56-323; Kapitel 7.1.1) ebenso durch eine PCR mit den Primern Dau c 1.02-RNAi-fwd und Dau c 1.02-RNAi-rev amplifiziert (vgl. Tab. 2.5).

Die PCR wurde hierbei in einem Volumen von 50 µl mit 1,25 units *Pfu* DNA-Polymerase (Promega, Mannheim), 0,25 units TaKaRa Ex Taq™, 5 µl 10 x Ex Taq Inkubationspuffer, 200 µM dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 10 pmol der entsprechenden Oligonukleotide (Primer) durchgeführt. Die PCR wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt: 95°C für 3 Minuten, gefolgt von 34 Zyklen bei 95°C für 20 Sekunden; AT für Dau c 1.01 (60°C) und Dau c 1.02 (56°C) für 60 Sekunden und 68°C für 60 Sekunden; die finale Extension erfolgte bei 68°C für 10 Minuten.

Die Banden der PCR-Produkte wurden aus einem Agarosegel mit Hilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim; siehe Kapitel 2.3.6) aufgereinigt. Anschließend wurden diese RNAi-Konstrukte zur Überprüfung der Sequenz sequenziert (siehe Kapitel 2.3.8).

2.4.2 KLONIERUNG DER RNAi-KONSTRUKTE

Die Klonierung der RNAi-Konstrukte wurde nach dem Gateway-System (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt (Abb. 2.2). Dieses System besteht aus zwei wesentlichen Klonierungsschritten. Im ersten Schritt werden die aufgereinigten, frischen PCR-Produkte, sogenannte RNAi-Konstrukte, zwischen den attL-Rekombinationsstellen (att-sites) des „Eingangsvektors“ (hier: pENTR/D-TOPO) transferiert. Dies ermöglicht den zweiten Klonierungsschritt, in dem die RNAi-Konstrukte doppelt und komplementär aus dem „Eingangsvektor“ durch eine Lambda-Rekonstruktions- (LR) Rekombinationsreaktion zwischen den attR-Rekombinationsstellen des „Zielvektors“ bzw. „Transformationsvektors“ (hier: pK7GWIWG2(II)) kloniert werden. Hierbei wurden die endgültigen RNAi-Konstrukte, pK7GW_Dau c 1.01_RNAi und pK7GW_Dau c 1.02_RNAi, generiert. Hierbei erhielt der Vektor entweder das Dau c 1.01-RNAi-Konstrukt oder das Dau c 1.02-RNAi-Konstrukt, einmal in sense- und einmal in antisense-Richtung, getrennt durch ein Intron. Die Expression der Konstrukte erfolgte unter der Kontrolle des konstitutiven Blumenkohlmosaikvirus 35S-Promoters (cauliflower mosaic viral 35S promoter; CaMV35S).

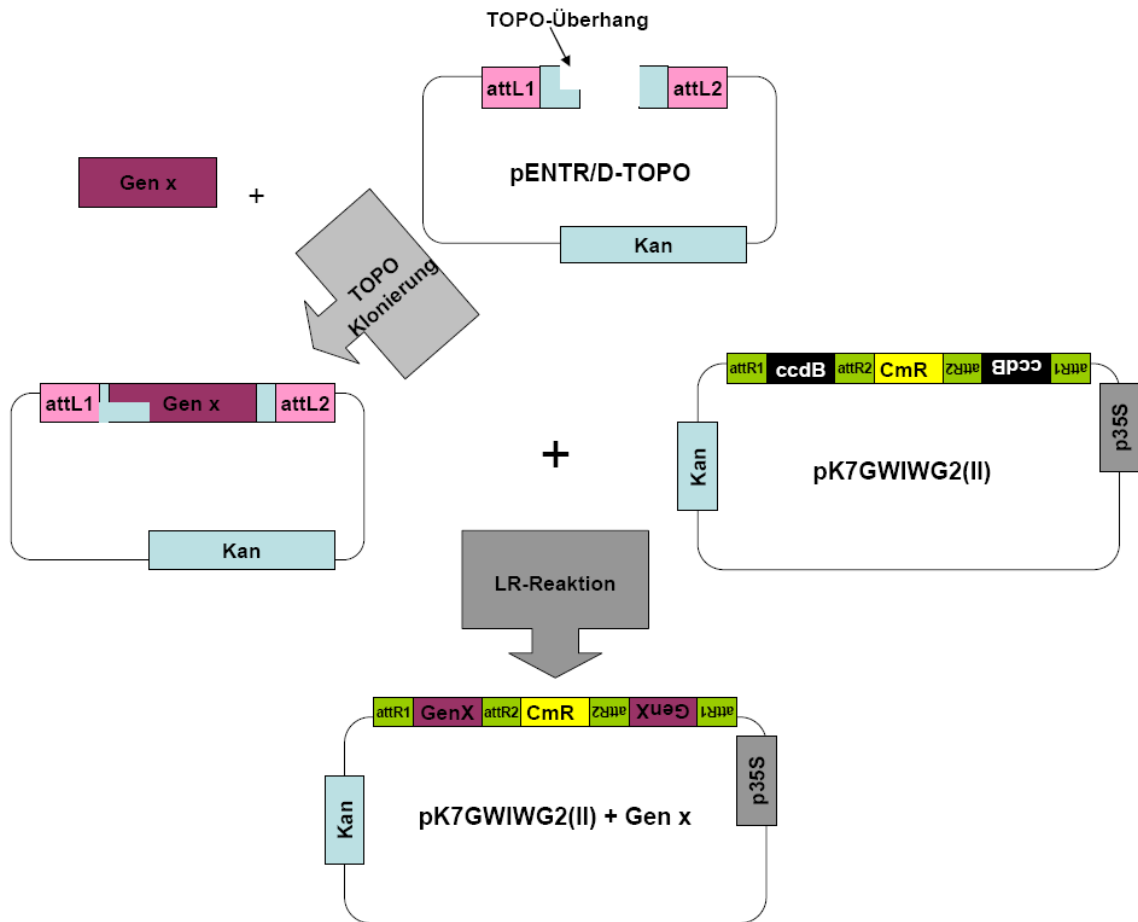


Abb. 2.2: Vereinfachte Darstellung der Gateway-Klonierungsstrategie für ein RNAi-Konstrukt eines GenX. Das nicht phosphorylierte PCR-Produkt eines Fragments X des zu untersuchenden Gens wird durch die TOPO-Klonierungsreaktion zwischen attL-Rekombinationsstellen des „Eingansvektors“ pENTR/D-TOPO transferiert. Anschließend wird das PCR-Fragment doppelt in den Zielvektor pK7GWIWG2(II) durch eine LR-Klonasreaktion kloniert. p35S: CaMV35S-Promotor; attL und attR: Rekombinationsstellen; Vektorkarten befinden sich im Anhang.

2.4.2.1 TOPO-Klonierungsreaktion

Die aus einem Agarosegel aufgereinigten (siehe Kapitel 2.3.6) cDNA-Fragmente für die RNAi-Unterdrückung wurden mit dem pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) in den Eingangsvektor pENTR/D-TOPO (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transferiert. 40 ng cDNA-Fragmente wurden mit 20 ng pENTR/D-TOPO-Vektor und 1 µl mit der im Kit enthaltenen Salz-Lösung zusammengeführt und mit H₂O_{dest} auf ein Endvolumen von 6 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei RT für 30 Minuten inkubiert und anschließend bis zum Transfer in Top10-Zellen (Invitrogen) auf Eis gestellt. Die Beschreibung der Top10-Zellen-Transformation findet sich im Kapitel 2.7.1. Die transformierten Zellen wurden auf LB_{Kan}-Platten ausplattiert und die Überprüfung des Transformationserfolgs wurde durch PCR, durch einen Verdau des Plasmids und mittels Sequenzierung durchgeführt. Die Überprüfungs-PCR erfolgte mit isolierten Plasmiden (siehe

Kapitel 2.5) mit den Primerpaaren Dau c 1.01-RNAi_fwd und -rev bzw. mit Dau c 1.02-RNAi_fwd und -rev (vgl. Tab. 2.5). Der Verdau erfolgte mit den Enzymen EcoRV und Not1 (Fermentas) (siehe Tab. 2.6 und Kapitel 2.6) wobei sie in dem Verhältnis 2:1 eingesetzt wurden.

2.4.2.2 LR-Reaktion

Das für die RNAi-Unterdrückung angefertigte cDNA-Fragment im pENTR/D-TOPO-Vektor (Invitrogen) wurde in den binären pK7GWIWG2(II)-Vektor (Karimi et al., 2002) in die RNAi-Kassette unter Verwendung des Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme Mix (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers transferiert. In den LR-Klonase-Mix wurden 150 ng des Konstruktes pENTR/D-TOPO-Dau c 1.01 bzw. -Dau c 1.02 und 150 ng des Zielvektors (pK7GWIWG2(II)) eingesetzt und der Ansatz wurde auf 8 µl mit TE-Puffer aufgefüllt. Der Ansatz wurde zwei bis vier Stunden bei RT inkubiert und anschließend zur Transformation hitzekompetenter Top10-Zellen (Invitrogen) verwendet. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte auf LB_{CmR}-Platten. Eine negative Selektion auf Zellen mit fragmentlosem pK7GWIWG2(II) erfolgte durch das *ccdB*-Killergen in der RNAi-Doppelkassette. Die Überprüfung des Transformationserfolgs erfolgte über einen Verdau des Plasmids mit dem Enzym Xba1 (siehe Tab. 2.6 und Kapitel 2.6) und mit einer PCR mit den Primerpaaren Dau c 1.01-RNAi_fwd und -rev bzw. mit Dau c 1.02-RNAi_fwd und -rev (vgl. Tab. 2.5).

<u>TE-Buffer, pH 8,0</u>		<u>Antibiotikum</u>	
Tris-HCl pH 8,0	5 mM	Chloramphenicol	1 ml/l (34 mg/ml in EtOH)
EDTA	1 mM		

2.5 PLASMIDISOLIERUNG

Die Plasmidisolierung wurde mit dem Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Eluierung erfolgte in 50 µl RNase- und DNase-freiem Wasser.

2.6 VERDAU

Für den Verdau von 1000 ng pENTR/D-TOPO-Vektor wurden die Enzyme EcoRV und Not1 (2:1; Fermentas) eingesetzt (siehe Tab. 2.6). Als Puffer diente der Buffer 0 (Fermentas). Der Ansatz wurde drei Stunden lang bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein 1,5%iges TAE-Agarose-Gel aufgetragen.

Für den Verdau von 1000 ng pK7GWIWG2(II) wurde das Enzym XbaI mit dem Puffer Tango 1x verwendet. Der Ansatz wurde vier Stunden lang bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

2.7 BAKTERIEN-TRANSFORMATION

2.7.1 E. COLI-TRANSFORMATION

Hitzeschock-Transformation

Hitzekompetente TOP10-*E. coli* Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) wurden durch einen Hitzeschock transformiert. Diese wurden aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl Zellen wurden 6µl der TOPO-Plasmidlösung oder 8 µl der LR-Reaktion zugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgend wurden diese Ansätze für 60 Sekunden bei 42°C hitzegeschockt. Zur Erholung der Zellen wurden die Ansätze zurück aufs Eis gestellt und nach zwei Minuten erfolgte eine Zugabe von 800 µl SOC-Medium. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze für 15 Sekunden mit 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis zu 100 µl entfernt. Die Zellen wurden auf LB_{Kan} bzw. C_{mR} -Agarplatten ausgestrichen.

LB-Medium oder –Agar

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
optional: Agar	5 g/l

SOC-Medium

Trypton	20 g/l
NaCl	0,58 g/l
KCl	0,185 g/l
7xH ₂ O MgCl ₂	2,03 g/l
7xH ₂ O MgSO ₄	2,46 g/l
Glukose	3,6 g/l

Antibiotika

TOPO-Klonierungsreaktion:

Kanamycin 1 ml/l (50 mg/ml in H₂O)

LR-Reaktion:

Chloramphenicol 1 ml/l (34 mg/ml in EtOH)

2.7.2 A. TUMEFACIENS-TRANSFORMATION

Transformation durch Elektroporation

Die *A. tumefaciens* Zellen wurden durch Elektroporation nach Mersereau et al. (1990) transformiert. Die Plastikschiene der *E. coli* Pulser (*E. coli* Pulser[®], Bio-Rad, München) sowie die 0,2 cm Elektroporationsküvetten (*E. coli* Pulser[®] Cuvette 0,2 cm, Bio-Rad) wurden auf Eis vorgekühlt. Die elektrokompenten Zellen *A. tumefaciens* GV3101pMP90RK

(GV3101) und LBA4404pSB1 (LBA4404; das hypervirulenten Helferplasmid pSB1 wurde freundlicherweise von Japan Tobacco Inc. [Tokyo, Japan] zur Verfügung gestellt) wurden aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl *A. tumefaciens*-Zellen wurden 100 ng des Destinationvektors (pK7GWIWG2(II)-Dau c 1.01 oder pK7GWIWG2(II)-Dau c 1.02) gegeben, gut gemischt und anschließend in die Elektroporationsküvetten überführt. Diese wurden im *E. coli*-Pulser mit zwei aufeinander folgenden Elektroimpulsen in der Höhe von 2,5 KV ausgesetzt. Anschließend wurde 1 ml SOC-Medium zu den Zellen gegeben und sie wurden für 1,5 Stunden bei 28°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze für 15 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis zu 100 µl entfernt. Die Zellen wurden auf YEB_{Rif/Gm/Sp}- oder auf YEB_{Rif/Tet/Sp}- Agarplatten ausplattiert (*yeast extract broth*: YEB; Vervliet et al. 1975).

YEB-Medium oder -Agar

Fleischextrakt	5 g/l
Hefeextrakt	1 g/l
Caseinhydrolysat	5 g/l
Saccharose	5 g/l
1M MgCl ₂	2 ml/l
optional: Agar	20 g/l

Antibiotika

Für GV3101 pMP90RK:

Rifampicillin	1 ml/l (100 mg/ml in Methanol)
Gentamycin	1 ml/l (25 mg/ml in H ₂ O)
Spectomycin	1 ml/l (100 mg/ml in H ₂ O)

Für LBA4404pSB1:

Rifampicillin	1 ml/l (25 mg/ml in Methanol)
Tetrazyklin	1 ml/l (5 mg/ml in Ethanol)
Spectomycin	1 ml/l (50 mg/ml in H ₂ O)

2.8 HERSTELLUNG VON ELEKTROKOMPETENTEN AGROBACTERIUM-ZELLEN

Eine Einzelkolonie von *A. tumefaciens* wurde in 5 ml YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 28°C mit 220 rpm für 16 Stunden kultiviert. Die Bakterien wurden in 100 ml YEB-Medium überführt und für weitere fünf Stunden kultiviert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1-1,5 wurden die Bakterien in Reaktionsgefäßen (Greiner, Solingen) überführt und für 10 Minuten bei 4.500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im 45 ml sterilem, eiskalten 10%igen Glycerol resuspendiert und anschließend für 10 Minuten bei 4.500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Dieser Waschgang wurde wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml sterilem, eiskaltem 10%igen Glycerol resuspendiert. Diese Bakterienzellsuspension wurde aliquotiert (je 40 µl), im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.9 HERSTELLUNG VON BAKTERIEN-DAUERKULTUREN

Zur Herstellung von *E.coli*-Dauerkulturen wurden 2 ml flüssiger Übernachtskultur in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für fünf Minuten mit 5.000 rpm bei RT zentrifugiert (Zentrifuge: Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde bis auf 600 µl entfernt und das Pellet in das verbliebene Medium genommen. Dies wurde in neue 500 µl Reaktionsgefäße je 200 µl Bakterienkultur aufgeteilt. Dazu wurden 100 µl Glycerol gegeben, gut resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der Dauerkulturen erfolgte bei -80°C.

Die Herstellung von *A. tumefaciens*-Dauerkulturen erfolgte ebenso wie die Herstellung der *E. coli*-Dauerkulturen. Hierbei wurden jedoch 200 µl Glycerol zu 200 µl Bakterienkultur zugegeben. Diese Dauerkulturen wurden ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

2.10 AGROBAKTERIUM-VERMITTELTE TRANSFORMATION VON MÖHREN

Die Agrobakterium-vermittelte Transformation wurde nach Imani et al. (2002) durchgeführt.

Fünf Tage vor Versuchsbeginn wurden Möhrenstammzellen aus einem Erlenmeyerkolben (300 ml vgl. Tab. 2.2; Abb. 2.1 A) in ein Becherglas überführt und es wurde Zeit gegeben, bis sie sich abgesetzt hatten. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde der Überstand verworfen und ca. 5 ml der verbliebenen Zellsuspension in einen 250 ml Erlenmeyerkolben mit B5-Medium^{2,4-D} (vgl. Tab. 2.2) überführt. Die Zellsuspensionen wurden im Gewebekulturraum (vgl. Tab. 2.1) bei 100 rpm kultiviert. Nach fünf Tagen Subkultur befanden sich die Zellen in einer hohen Wachstumsphase.

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde ein 50 ml Erlenmeyerkolben mit je 10 ml YEB-Medium, RNAi-Konstrukte tragenden *A. tumefaciens* Zellen (RNAi-GV3101 oder RNAi-LBA4404) und mit den dazugehörigen Antibiotika angeimpft. Die Bakterienkulturen wurden bei 28°C und 220 rpm für 24 Stunden im Inkubationsschrank (Binder, Tuttlingen) kultiviert. Nach der Anzahl der vorgesehenen Transformationen wurden in die entsprechende Anzahl vorbereiteter Möhrensuspensionen je 75 µl 5-Fluoro-2-deoxyuridine (FDU) (Blaschke et al. 1978, Froese und Neumann 1997, Capesius und Bopp 1974) zugegeben. Die Zellsuspensionen wurden 24 Stunden lang mit 100 rpm im Gewebekulturraum (vgl. Tab. 2.1) kultiviert.

Am Versuchsbeginn wurden die mit FDU versetzten Möhrenzellsuspensionen in Bechergläser überführt und, nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, der Überstand bis auf 40 ml verworfen. Die verbliebene Zellsuspension wurde zum Entfernen der FDU in 50 ml Reaktionsgefäße (Greiner, Solingen) verteilt und für zwei Minuten mit 1.000 rpm bei RT

zentrifugiert (Rotina 48R, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde verworfen und der Waschgang wurde unter Zugabe von frischem B5-Medium^{2,4-D} wiederholt. Die vorbereiteten Agrobakterien wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und für fünf Minuten bei 5.000 rpm bei RT zentrifugiert (Zentrifuge: Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien wurden in 500 ml B5-Medium^{2,4-D} aufgenommen. Die Möhrenzellen wurden in ein 90 µm Sieb überführt und Bakterien sowie 75 µl Thymidine wurden dazu pipettiert. Die Möhrenzellen wurden mit Hilfe eines Glasstabes durch das Sieb in ein Becherglas gedrückt. Bei Bedarf wurde B5-Medium^{2,4-D} dazu gegeben. Die Zellen wurden für eine Stunde im Dunkeln bei 60 rpm und 24°C kultiviert. Nachdem sich die Zellen wieder abgesetzt hatten, wurde der Überstand verworfen. Die Möhrenzellen wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben (vgl. Tab. 2.2) mit B5-Medium^{2,4-D} überführt und zwei Tage lang im Dunkeln bei 60 rpm und 24°C kultiviert.

Zwei Tage nach Versuchsbeginn wurden die transformierten Möhrenzellsuspensionen in je ein Becherglas überführt. Der Überstand wurde verworfen, die verbliebene Zellsuspension wurde in 50 ml Reaktionsgefäße gegeben und 30 ml frisches B5-Medium^{2,4-D} zugegeben. Die Ansätze wurden bei 1.000 rpm für drei Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschgang wurde unter erneuter Zugabe von B5-Medium^{2,4-D} zwei Mal wiederholt. Die Zellen wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit frischem B5-Medium^{2,4-D} (vgl. Tab. 2.2) überführt und Ticarcillin oder Cefotaxim zugegeben.

Nach weiteren zwei Tagen wurde Kanamycin dazugegeben. Die Zellsuspensionen wurden alle zwei Wochen subkultiviert.

<u>5'Fluoro-2'deoxyuridine (FDU)</u>	<u>Thymidine</u>
FDU 2,5 mg/ml (in H ₂ O)	Thymidine 1,42 mg/ml (in H ₂ O)

Antibiotika

GV3101:

Kanamycin	1 ml/l (100 mg/ml in H ₂ O)
Cefotaxim	1 ml/l (250 mg/ml in H ₂ O)

LBA4404:

Kanamycin	1 ml/l (100 mg/ml in H ₂ O)
Ticarcillin	1 ml/l (150 mg/ml in H ₂ O)

2.11 ANALYSE DER RNAi-PFLANZEN AUF TRANSGENITÄT

Die Keimlinge aus den transformierten Möhrenzellen wurden hinsichtlich der Aufnahme des RNAi-Konstruktes auf DNA-Ebene überprüft. Die DNA-Isolierung aus Blättern oder aus dem Kallus wurde mit REDEExtract-N-AmpTM Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich, München; siehe Kapitel 2.3.2) durchgeführt. Das Vorliegen der jeweiligen RNAi-

Kassette im Genom der Möhren wurde mit einer PCR nach Angaben des Herstellers und mit den Primern 35S_fwd und 35S_rev bzw. mit den Primern Kan_fwd und Kan_rev (siehe Tab. 2.5) überprüft.

2.12 RESISTENZANALYSE DER HYPOALLERGENEN MÖHREN

2.12.1 ALTERNARIA RADICINA-KINETIK

Inokulation von Möhrenscheiben

Für die Möhrenscheibeninokulation wurden etwa fünf Monate alte ausgewachsene Möhren geerntet, gewaschen und der mittlere Teil der Wurzel in ca. 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten. Die Möhrenscheiben wurden in Petrischalen (Ø 14 cm) auf ein feuchtes Filterpapier gelegt und mit 10 µl des *Alternaria radicina*-Sporeninokulats (siehe Kapitel 2.2.1.3) in einem Bereich der Parenchymzellen inokuliert. Die Petrischalen wurden in einem dunklen und relativ luftdichten Plastikbehälter bei RT inkubiert.

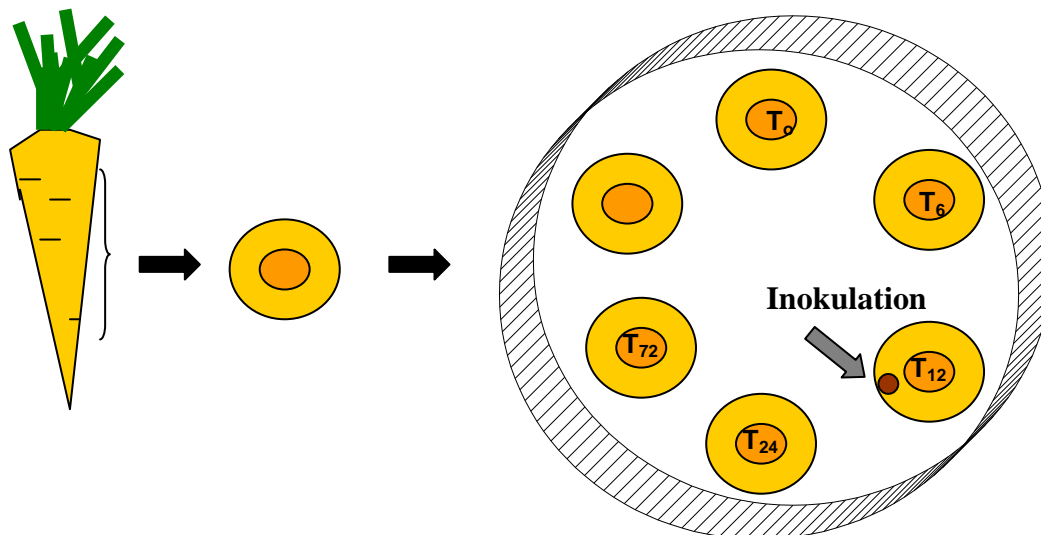


Abb. 2.3: Vereinfachte Darstellung der Möhrenscheibeninokulation. Der mittlere Teil einer etwa 5 Monate alten ausgewachsenen Möhre wurde in ~ 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten und in eine Petrischale auf ein feuchtes Filterpapier gelegt. Die Inokulation mit dem Pilzsporeninokulat erfolgte in dem parenchymatischen Teil der Wurzelscheibe. Für die Resistenzkinetik wurden Scheiben 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach der Inokulation geerntet und schockgefroren.

Die *A. radicina*-Kinetik wurde an Möhrenscheiben durchgeführt. Für die Kinetik wurden Wildtyp-Möhren und transgene Möhren der Linien #20L35, #20L39 und #12L10 eingesetzt. Es wurden jeweils fünf Möhren eingesetzt. Es wurden jeweils vier Petrischalen pro Linie und Wildtyp-Möhrenscheiben angefertigt (vgl. Abb. 2.3). Je zwei Petrischalen wurden mit dem Pilzisolat inokuliert und die anderen zwei als Kontrolle mit H₂O_{dest.} Zu den Zeitpunkten 0, 6, 12 und 24 Stunden nach der Inokulation (hai) wurde aus allen Petrischalen je eine Möhrenscheibe entnommen (bei der Kinetik mit Wildtyp-Möhren, die auf dem Feld des

Dottenfelder Hofs angebaut waren, wurde mit 72 hai ein zusätzlicher Zeitpunkt entnommen), klein geschnitten und in Reaktionsgefäße gegeben. Die Proben wurden bis zur Weiterbearbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. In jeder Petrischale blieb eine Möhrenscheibe, die bis sieben Tage nach der Inokulation (dai) inkubiert wurde. Zu diesem Zeitpunkt war die Pilz-Infektion auf den Möhrenscheiben deutlich zu sehen und so konnte der Infektionserfolg überprüft werden.

Die Proben wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert, die Gesamt-RNA wurde extrahiert (siehe Kapitel 2.3.1.2) und in cDNA transkribiert (siehe Kapitel 2.3.3.2). Die relative Expression von den Zielgenen wurde mittels der qPCR ermittelt (siehe Kapitel 2.3.4.2).

2.12.2 RESISTENZPRÜFUNG VON NACHKOMMENSCHAFTEN (IN VITRO KLONE) TRANSGENER MÖHREN

Die transgenen Pflanzen wurden mit verschiedenen am Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst des Julius Kühn-Instituts (JKI-ZGO) (Erwin-Baur-Str. 27, D-06484 Quedlinburg) etablierten Resistenzprüfmethoden gegen *Alternaria dauci* (Ad), *Alternaria radicina* (Ar) und *Botrytis cinerea* (Bc) in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Nothnagel und Dr. Reiner Krämer in Quedlinburg getestet.

***Botrytis cinerea* – Petiolentest**

Der Biotest mit Petiolen erfolgte in Anlehnung an Baranski et al. (2006). Dazu wurden von jeder Pflanze vier Petiolen entnommen und vom Stängelgrund ausgehend je ein ca. 4 cm langes Stück abgeschnitten. Zur Inokulation wurde jedes einzelne Petiolenstück mit der basalen Schnittfläche kurz in den Konidienrasen einer mit *Botrytis cinerea* bewachsenen Agar-Platte gedrückt. Zur Inkubation wurden von jeder Pflanze vier Petiolenstücke in eine Petrischale (Ø 14,5 cm) mit feuchtem Filterpapier gelegt. Die Petrischalen mit den Petiolen wurden anschließend in nahezu luftdichte Plastikboxen gestellt und bei 22°C in einer Klimakammer inkubiert. Der Infektionsverlauf wurde nach 2, 4, 7 und 9 Tagen (dai) erfasst

***Botrytis cinerea* - Wurzelscheibentest**

Für den Wurzelscheibentest wurden Möhren in ca. 4 mm dicke Scheiben geschnitten und in Petrischalen (Ø 14,5 cm) mit feuchtem Filterpapier gelegt. Anschließend erfolgte eine Punktinokulation jeder einzelnen Wurzelscheibe mit einem Mycel-Konidien-Gemisch von *Botrytis cinerea*. Dazu wurde mit der Impföse ein ca. 2-3 mm großes Mycelstück mit

Konidien von einer *Botrytis cinerea* bewachsenen Agarplatte entnommen und auf das Phloem jeder einzelnen Wurzelscheibe gelegt. Die Petrischalen mit den Wurzelscheiben wurden anschließend in nahezu luftdichte Plastikboxen gestellt und bei 22°C in einer Klimakammer inkubiert. Der Infektionsverlauf wurde nach 3, 6, 9, 12 und 15 Tagen erfasst.

***Alternaria dauci* – Blattsegmenttest**

Von jeder Pflanze wurde von 4 ausgewachsenen Blättern je ein Blattsegment abgeschnitten und nach der Inokulation in einer Petrischale (Ø 14,5 cm) auf feuchtem Filterpapier platziert. Die Inokulation erfolgte mit einem automatischen Inokulator (BIM Lab, Bio-Oz, Il), mit einem hoch virulenten Isolat I 89001 der JKI-Kollektion. Das Inokulum war auf 10^5 Konidien/ml eingestellt. Mittels Inokulator wurden ca. 0,03 ml Inokulum gleichmäßig mit einem Anpressdruck von 4 bar auf dem Blattsegment verteilt. Zur Inkubation wurden die Petrischalen in nahezu luftdichte Plastikboxen gestellt und anschließend in einem klimatisierbaren Raum bei 22°C gelagert. Die Luftfeuchtigkeit in den Petrischalen betrug ca. 90-95%.

Der Infektionsverlauf wurde nach 3, 7 und 9 Tagen (dai) erfasst. Die notwendige Adaption und Kalibrierung des Geräts wurde in umfangreichen Voruntersuchungen erarbeitet (Nothnagel and Baranski 2005; Nothnagel and Krämer 2007; Krämer et al. 2007, 2008, 2009).

***Alternaria radicina* – Petiolentest**

Der Biotest mit Petiolen erfolgte in Anlehnung an Grzebelus et al. (2003). Dazu wurden von jeder Pflanze vier Petiolen entnommen und vom Stängelgrund ausgehend je ein ca. 4 cm langes Stück abgeschnitten. Von jeder Pflanze wurden vier Petiolenstücke in eine Petrischale (Ø 14,5 cm) mit feuchtem Filterpapier gelegt. Anschließend wurde jedes einzelne Petiolenstück am unteren Ende mit jeweils einem 3 µl Tropfen punktinokuliert. Die Konzentration der auf die unverletzten Petiolen aufgetropften Konidien suspension betrug $4,5 \times 10^5$ Konidien/ml. Die Petrischalen mit den Petiolen wurden anschließend in nahezu luftdichte Plastikboxen gestellt und bei 22°C in einer Klimakammer inkubiert. Der Infektionsverlauf wurde nach 2, 4, 7 und 9 Tagen (dai) erfasst.

***Alternaria radicina* - Wurzelscheibentest**

Für den Wurzelscheibentest wurden Möhren in ca. 4 mm dicke Scheiben geschnitten und in Petrischalen (Ø 14,5 cm) mit feuchtem Filterpapier gelegt. Anschließend wurde jede einzelne Wurzelscheibe mit einem 4 µl Tropfen auf dem Phloem punktinokuliert. Die Konzentration

der auf die unverletzten Petiolen aufgetropften Konidiensuspension betrug 5×10^5 Konidien/ml. Die Petrischalen mit den Wurzelscheiben wurden anschließend in nahezu luftdichte Plastikboxen gestellt und bei 22°C in einer Klimakammer inkubiert. Der Infektionsverlauf wurde nach 3, 6, 9 und 13 Tagen erfasst.

Der Infektionsverlauf wurde nach angegebenen Zeitpunkten nach der Inokulation mittels DIAS (Digitales Analyse System) der Fa. LemnaTec erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Softwarepaket SYSTAT 9.0 (Wilkinson 1998).

2.13 SALIZYLSÄURE-KINETIK

Für die Salizylsäure-Kinetik wurden 10 Wildtyp-Pflanzen, 10 Pflanzen der Linie #12L10 und acht Pflanzen der Linie #20L35 aus dem Gewächshaus eingesetzt. Die Kinetik wurde im Gewächshaus durchgeführt (siehe Tab. 2.1). Jeweils die Hälfte der Pflanzen diente als Kontrolle und ihre Blätter wurden mit H_2O_{dest} besprüht. Die Blätter der anderen Hälfte der Pflanzen wurden mit 1mM Salizylsäure-Lösung besprüht. In den Zeitpunkten 0, 9, 24 und 48 Stunden nach der Besprühung wurde jeweils ein Blatt abgetrennt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Blätter wurden je nach Behandlung und Linie zusammen in einem Behältnis gefroren und als Mischung der je 5 bzw. 4 Pflanzen bearbeitet. Die Blätter wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert, die Gesamt-RNA (siehe Kapitel 2.3.1.2) wurde mit TRIZOL extrahiert und in cDNA mit der QuantiTect[®] Reverse Transcription transkribiert (siehe Kapitel 2.3.3.2). Die cDNA wurde mit der Standard-PCR (siehe Kapitel 2.3.4.1) überprüft und die relative Expression von den Zielgenen wurde mittels der qPCR ermittelt (siehe Kapitel 2.3.4.2).

Salizylsäure-Lösung
Salizylsäure 138 mg/l
pH 7 mit NaOH

2.14 PRIMERSEQUENZEN

Tab. 2.5: Primersequenzen. In der Tabelle sind alle verwendeten Primersequenzen (Oligonukleotidsequenzen), deren Akzessionsnummern, die Anlagerungstemperaturen, die Produktlänge, die Richtung sowie die Sequenz angegeben. AT: Anlagerungstemperatur

Bezeichnung; Akzessionsnummer	AT; Produktlänge (bp)	Richtung	Sequenz (5'-3')
Dau c 1.01-RNAi; GenBank Z81362	60°C; 253	fwd	caccatgggtgccagagccattc
		rev	cggtggagtcgtatgcaag
Dau c 1.02-RNAi; GenBank AF456481	55°C; 267	fwd	caccgtatcagggattctccttgatag
		rev	gtggcacaacaagaattg
qpcr1.01; GenBank Z81362	56°C; 124	fwd	cttgacatacactccaccg
		rev	tatggccgtggcttgta
qpcr1.02; GenBank AF456481	55°C; 147	fwd	tgaggttgaggctcctcc
		rev	ctgacggttccaaccac
p35S; GenBank V00140	65°C; 501	fwd	cgcggcaggtctcatcaagacg
		rev	gatgaagtgcagatagctgggcaatgg
qpcrPRPlike1; GenBank AB127984	60°C; 147	fwd	tgtccagaagcacgaacaag
		rev	ccaactccaccatcaccttt
qpcrPR3; GenBank AY271253	60°C; 104	fwd	agacagccttggtgactgga
		rev	gctccactgtgcaactcaa
qpcrActin; GenBank X17525	54°C; 169	fwd	ccactgaacccaaaagcaa
		rev	ccgtgtggtaaacaccatc
qpcrUbiquitin; GenBank DCU68751	51°C; 151	fwd	aagcccaagaagatcaagca
		rev	tcaaatgattggccatgaa
Kan; GenBank GU589573	56°C; 422	fwd	aatatcacggtagccaacg
		rev	gaagggactggctgctattg

2.15 ENZYME

Tab. 2.6: Enzyme. In der Tabelle sind alle verwendeten Enzyme, deren Puffer, Schnittstellen und die mit diesen Enzymen verdauten Vektoren angegeben. Alle Enzyme und Puffer für den Verdau der Vektoren bzw. der Plasmide wurden von der Firma Fermentas bezogen.

Name des Enzyms	Schnittsstelle (bp)	Puffer	Vektor
EcoRV	133	Buffer 0	pENTR/D-TOPO
NotI	2571	Buffer 0	pENTR/D-TOPO
XbaI	1 und 1464	Tango 1x	pK7GWIWG2(II)

3 ERGEBNISSE

3.1 HERSTELLUNG HYPOALLERGENER MÖHREN (*DAUCUS CAROTA*)

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von hypoallergenen Möhren (*Daucus carota* spp. *sativus* cv. Rodelika). Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die Sequenzen der zwei Isoformen des Möhrenhauptallergens Dau c 1 aus der offiziellen Allergen-Datenbank der Internationalen Union der Immunologischen Gesellschaft (www.allergen.org) für die Synthese der RNAi-Konstrukte verwendet. Die beiden Isoformen, Dau c 1.01 (Akzessionsnummer: Z81362) und Dau c 1.02 (Akzessionsnummer: AF456481) weisen eine ~50%ige Homologie zueinander auf (Ballmer-Weber et al. 2005). Es gibt jedoch keine ausreichend langen homologen Abschnitte in den Sequenzen der beiden Isoformen, die eine gleichzeitige Unterdrückung mit einem RNAi-Konstrukt ermöglichen würden.

Da die Isoform Dau c 1.01 in fünf Varianten (Dau c 1.0101, 1.0102, 1.0103, 1.0104 und 1.0105) vorhanden ist und diese eine sehr hohe Homologie (>90%) zueinander aufweisen (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999; Ballmer-Weber et al. 2005) und mehrere homologe Abschnitte (>21bp) besitzen, konnten alle diese Varianten mit einem RNAi-Konstrukt gleichzeitig unterdrückt werden (Abb. 3.1). Das synthetisierte Dau c 1.01-RNAi-Konstrukt war identisch mit der Variante Dau c 1.0102 (Abb. 3.1, Kapitel 7.1.1). Für die zweite Isoform, Dau c 1.02, wurde ein eigenes RNAi-Konstrukt synthetisiert (Abb. 3.2, Kapitel 7.1.1).

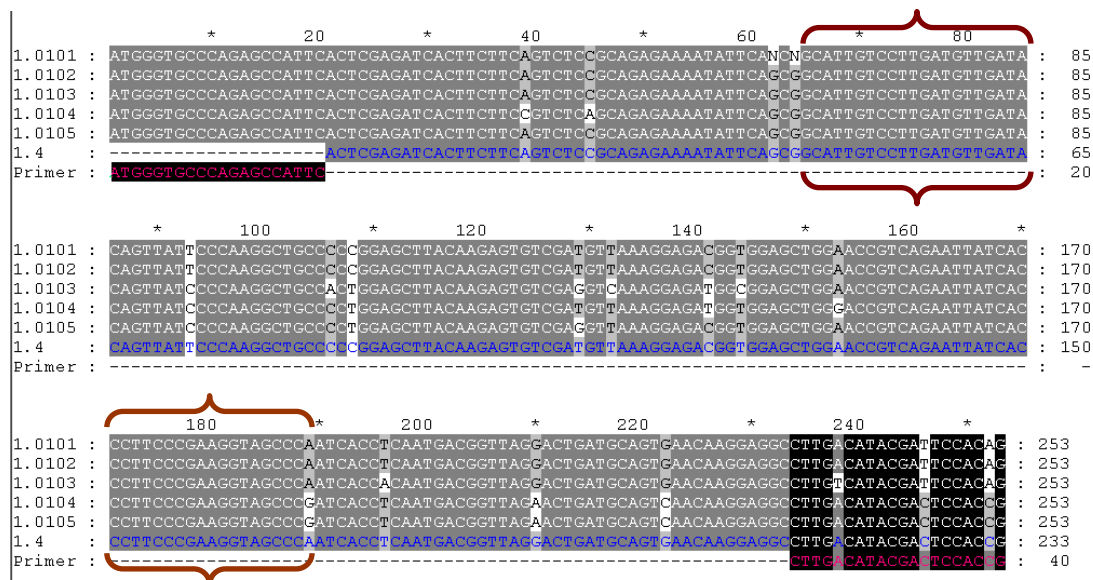


Abb. 3.1: Sequenz des RNAi-Konstrukts der Dau c 1.01 Varianten. Die Sequenz des RNAi-Konstrukts (blaue Buchstaben; Kennzeichnung 1.4 links in der Abbildung) der Dau c 1.01 Varianten wurde mit dem Primerpaar Dau c 1.01-RNAi synthetisiert (rote Buchstaben) und mit den Sequenzen der Dau c 1.01 Varianten verglichen (weiße Buchstaben). Die Kennzeichen 1.0101, 1.0102 etc. auf der linken Seite der Abbildung geben die Variantennummern wieder. Zwei homologe Abschnitte der Sequenzen (dunkelrote Abschnittszeichen) sind beispielhaft abgebildet.

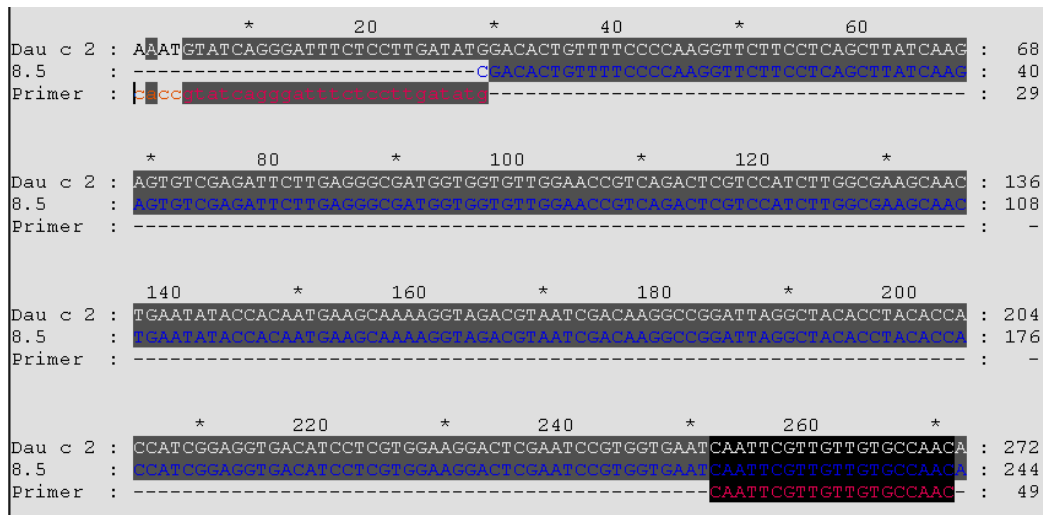


Abb. 3.2: Sequenz des Dau c 1.02 RNAi-Konstrukts. Das RNAi-Konstrukt des Dau c 1.02 (blaue Buchstaben; Kennzeichnung 8.5 auf der linken Seite) wurde mit dem Primerpaar Dau c 1.02-RNAi (rote Buchstaben; Kennzeichnung Primer auf der linken Seite) synthetisiert und mit dem ausgesuchten Sequenzabschnitt des Dau c 1.02 aus der Datenbank (weiße Buchstaben; Kennzeichnung Dau c 2 auf der linken Seite) verglichen.

Diese RNAi-Konstrukte wurden vor ihrer Verwendung sequenziert. Anschließend wurden sie unabhängig voneinander mit dem Gateway-System (Invitrogen) zuerst in den „Eingangsvektor“ (pENTR/D-TOPO) und dann in den „Ziel-“ bzw. „Transformationsvektor“ (pK7GWIWG2(II)) transferiert. Das Vorhandensein des RNAi-Konstrukts im „Eingangsvektor“ (Abb. 3.3) sowie im „Zielvektor“ (Abb. 3.4 und 3.5) wurde überprüft. Bei der Überprüfung wurde festgestellt, dass die RNAi-Konstrukte in die Vektoren erfolgreich transferiert worden sind. Die exprimierten Bereiche der „Zielvektoren“ finden sich in Abbildung 3.6.

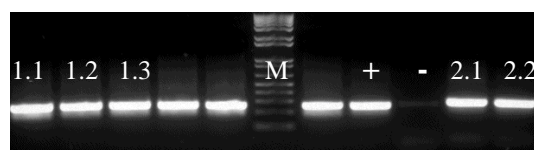


Abb. 3.3: PCR-Nachweis der RNAi-Konstrukte im „Eingangsvektor“ pENTR/D-TOPO. Zur Überprüfung des Transfererfolgs der RNAi-Konstrukte in den „Eingangsvektor“, wurde die DNA (Plasmide) aus den *E. coli* Zellen isoliert und mit dem Primerpaar Dau c 1.01-RNAi (253bp Banden 1.1, 1.2 und 1.3; Primer: siehe Tabelle 2.5) oder mit dem Primerpaar Dau c 1.02-RNAi (267bp Banden 2.1 und 2.2) amplifiziert und auf einem TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. M: Größenstandard (1 kb Plus DNA Ladder); +: Positivkontrolle (Dau c 1.01-RNAi-Konstrukt) -: Negativkontrolle (leeres Plasmid).

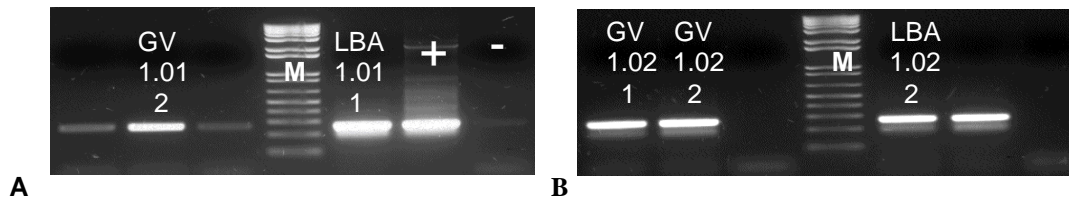


Abb. 3.4: PCR-Nachweis der RNAi-Konstrukte im „Zielvektor“-pK7GWIWG2(II). Für die Überprüfung des Transfererfolgs der RNAi-Konstrukte aus dem „Eingangsvektor“ in den „Zielvektor“ wurde die DNA (Plasmide) aus den zwei verwendeten *A. tumefaciens*-Linien (GV3101 und LBA4404) isoliert. Sie wurden mit dem Primerpaar Dau c 1.01-RNAi (A; 253 bp Banden GV 1.01-2, LBA 1.01-1; Primer: siehe Tabelle 2.5) oder mit dem Primerpaar Dau c 1.02-RNAi (B; 267 bp Banden GV 1.02-1, GV1.02-2 und LBA 1.02-2) amplifiziert und auf einem TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. M: Größenstandard (1 kb Plus DNA Ladder); +: Positivkontrolle (Dau c 1.01-RNAi-Konstrukt[A] und Dau c 1.02-RNAi-Konstrukt[B]); -: Negativkontrolle (leeres Plasmid).

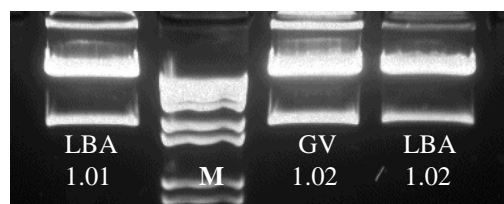


Abb.3.5: Verdau der „Zielvektoren“-pK7GWIWG2(II)-Dau c 1.01- und Dau c 1.02-RNAi. Zur Überprüfung des Vorhandenseins der RNAi-Konstrukte im „Zielvektor“ (pK7GWIWG2(II)) wurde die DNA (Plasmide) aus den verwendeten *A. tumefaciens* Zellen (LBA4404 und GV3101) isoliert. Sie wurden mit dem Enzym Xba1 verdaut (siehe Kapitel 2.6) und in einem TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das enzymatisch ausgeschnittene Fragment hat die Größe von ~1700 bp (jeweils die untere Bande) und beinhaltet somit das jeweilige RNAi-Konstrukt. LBA 1.01: Dau c 1.01-RNAi-Konstrukt; GV 1.02 und LBA 1.02: Dau c 1.02-RNAi-Konstrukt; M: Größenstandard (1 kb Plus DNA Ladder).

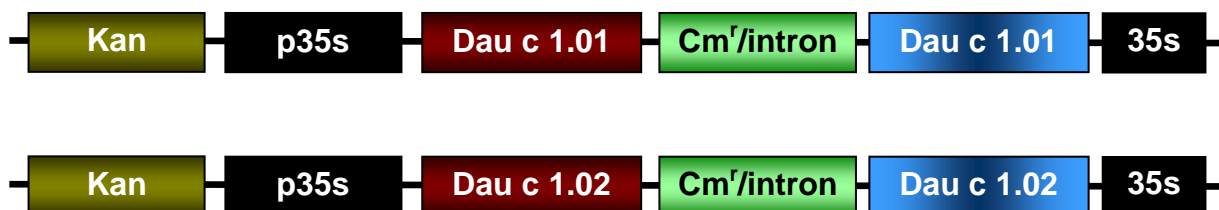


Abb. 3.6: Der exprimierte Bereich der „Zielvektoren“. Die RNAi-Konstrukte sind einmal in *sense* und *antisense* Richtung getrennt durch ein Intron im Zielvektor vorhanden. Die Expression der Konstrukte steht unter der Kontrolle des konstitutiven Blumenkohl-Mosaik-Virus 35S-Promotors (*cauliflower mosaic viral 35S promoter*; CaMV35S). Kan: Kanamycin, p35s: Blumenkohl-Mosaik-Virus 35S-Promotor, Dau c 1.01: Dau c 1.01-RNAi-Konstrukt, Dau c 1.02: Dau c 1.02-RNAi-Konstrukt, Cm^r/Intron: Chloramphenicol und Intron, 35s: Blumenkohl-Mosaik-Virus 35S-Terminator.

Durch die erfolgreiche Transferierung der RNAi-Konstrukte in den „Zielvektor“ konnte die Transformation der Möhrenzellen durchgeführt werden. Nach Erhalt der ersten Pflanzen wurden diese auf Transgenität überprüft. Anhand der Blätter sowie des Kallus konnte das Vorhandensein des RNAi-Konstrukts nachgewiesen werden (Abb. 3.7). Als zusätzliche Kontrolle wurden die Petiolenstücke transformierter Pflanzen auf kanamycinhaltigem B5-Agar kultiviert, auf dem nur die positiv transformierten Möhrenzellen

einen Kallus bilden konnten (Abb. 3.8 A). Zudem wurden die Kalluskulturen, die zur Erhaltung der transformierten Linie dienten, stets auf kanamycinhaltigem B5-Agar kultiviert.

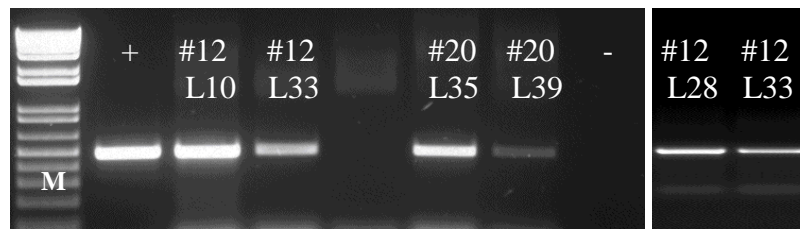


Abb. 3.7: PCR-Nachweis des RNAi-Konstrukts in Kallus. Das Vorhandensein des jeweiligen RNAi-Konstrukts im Kallus wurde mittels PCR mit DNA nachgewiesen. Hierbei wurde das Primerpaar p35S eingesetzt (501bp Bande). #12: *Dau c 1.02* unterdrückte Linien; #20: *Dau c 1.01* unterdrückte Linien; L:Linie; +:Positivkontrolle (leeres pK7GWIWG2(II)-Plasmid); -: Negativkontrolle H₂O; M: Größenstandard (1 kb Plus DNA Ladder).

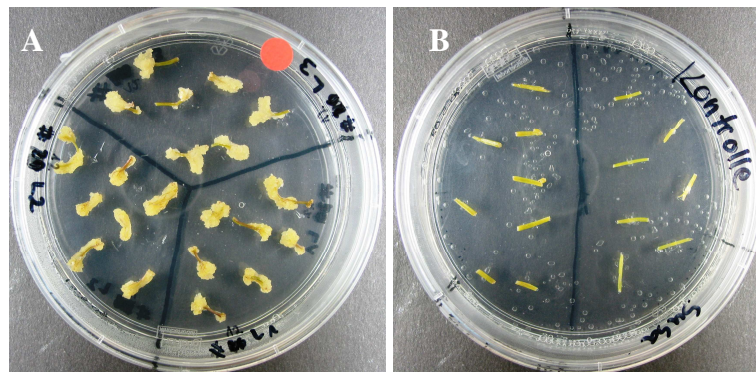


Abb. 3.8: Das Wachstum des transgenen Kallus auf B5-Agarplatten mit dem Antibiotikum Kanamycin. Etwa 1cm lange Petiolenstücke transformierter (A) und Wildtyp (B) Pflanzen wurden zur Kallusinduzierung auf B5-Agarplatten_{Kan100} gelegt. Aus den transformierten Petiolenstücken bildeten sich nach etwa 3 Wochen Kalli (A) während die Wildtyp-Petiole (B) unverändert blieben.

3.2 ERMITTLUNG DER SUPPRESSIONSSTÄRKE

Bei der RNAi-vermittelten Suppression des *Dau c 1*-Gens war die Unterdrückung unterschiedlich stark. Am Anfang existierte nur eine Pflanze pro transgener Linie, dadurch wurde die Ermittlung der Expressionsstärke der *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-Gene in einzelnen Pflanzen durchgeführt. Es wurden Blätter von vier Wildtyp-Pflanzen als Vergleich eingesetzt. Bei den Wildtyp-Pflanzen handelte es sich um aus der *in vitro*-Kultur in Erde überführte Klonpflanzen. Um feststellen zu können, in welchen transgenen Möhren die Unterdrückung am stärksten ausgeprägt war, wurden Blätter der ausgewachsenen transgenen Linien sowie der Wildtyp-Möhren gerntet, in Stickstoff eingefroren und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Die RNA wurde extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde in die Ermittlung der relativen Expression der *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-Gene mit der quantitativen Real Time PCR (qPCR) eingesetzt. Es wurden drei Linien je RNAi-Konstrukt mit der stärksten Unterdrückung des jeweiligen Gens ausgesucht und vermehrt. In den

Pflanzen mit der *Dau c 1.01*-Suppression wurden die Linien 25, 35 und 39 ausgewählt (Abb. 3.9 A). Die Linie 39 wies die deutlichste Unterdrückung in den Blättern auf. Die Linien 10, 28 und 33 der *Dau c 1.02*-unterdrückten Pflanzen zeigten die stärkste Suppression in den Blättern (Abb. 3.9 B). Die Linien 10 und 33 wiesen die deutlichste Unterdrückung auf. Die Auflistung der qPCR-ermittelten Expressionswerte befindet sich im Anhang (Kapitel 7.2, Tab. S1)

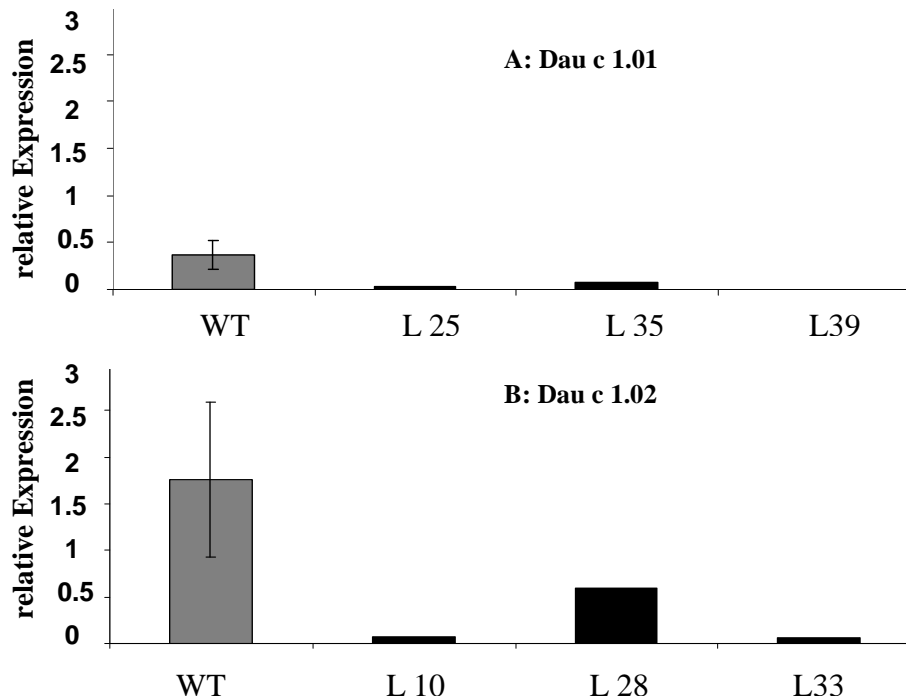


Abb. 3.9: Ermittlung der Suppressionsstärke des *Dau c 1.01* und *Dau c 1.02* in transgenen Möhrenblättern. Die relative Expression von *Dau c 1.01* (A) und *Dau c 1.02* (B) wurde mittels qPCR bestimmt. Die am stärksten ausgeprägte Unterdrückung des *Dau c 1.01* im Vergleich zu den Wildtyp-Möhrenblättern wurde in den Linien 25, 35 und 39 festgestellt. Die relative Expression des *Dau c 1.02* ist in den Linien 10, 28 und 33 am niedrigsten.

Die Möhren mit der stärksten Unterdrückung des *Dau c 1.01*- bzw. des *Dau c 1.02*-Gens wurden geerntet und die Wurzel wurde den Kooperationspartnern am Paul-Ehrlich-Institut Langen (AG Prof. S. Vieths, Abteilung Allergologie) zur Verfügung gestellt. Sie ermittelten den *Dau c 1.01* und *Dau c 1.02*-Proteingehalt in den Wurzeln der Möhren. Die Analyse des *Dau c 1.01* bzw. des *Dau c 1.02*-Proteingehalts wurde mit spezifischen Antikörpern immunologisch durchgeführt (Peters et al. eingereicht). Die *Dau c 1*-Proteingröße liegt bei ~16 kDa (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999). In den Immunoblots konnte in den ausgesuchten transgenen Linien keine Bande des *Dau c 1.01*- (Abb. 3.10 A) oder *Dau c 1.02*-Proteins (Abb. 3.10 B) (Proteingröße ~16 kDa) detektiert werden (Abb. 3.10). Bei dieser Analyse wurde eine zusätzliche Linie, Linie 8, der *Dau c 1.01*-supprimierten Möhren mit untersucht (Abb. 3.10, A, L 8). Eine Ausnahme stellte die *Dau c 1.02*-

unterdrückte Linie 33 dar, da in dieser Linie eine geringe Menge an Dau c 1.02 detektiert werden konnte.

In den ELISA-Analysen am Paul-Ehrlich-Institut konnte die prozentuale Unterdrückung im Vergleich zu Wildtyp-Möhrenwurzeln festgestellt werden (Tab. 3.1) (Fötisch, unveröffentlicht). Es wurde für die Dau c 1.01-supprimierten Linien (25, 35 und 39) eine Reduzierung des Dau c 1.01-Proteingehaltes von 70% bis 88% im Vergleich zu den Wildtyp-Möhrenwurzeln ermittelt (Tab. 3.1). In den Dau c 1.02-unterdrückten Linien (10, 28 und 33) konnte kein Dau c 1.02-Protein festgestellt werden (Tab. 3.1). Dies bedeutet, dass der Dau c 1.02-Proteingehalt unterhalb des messbaren Bereichs von 10 ng/ml liegt.

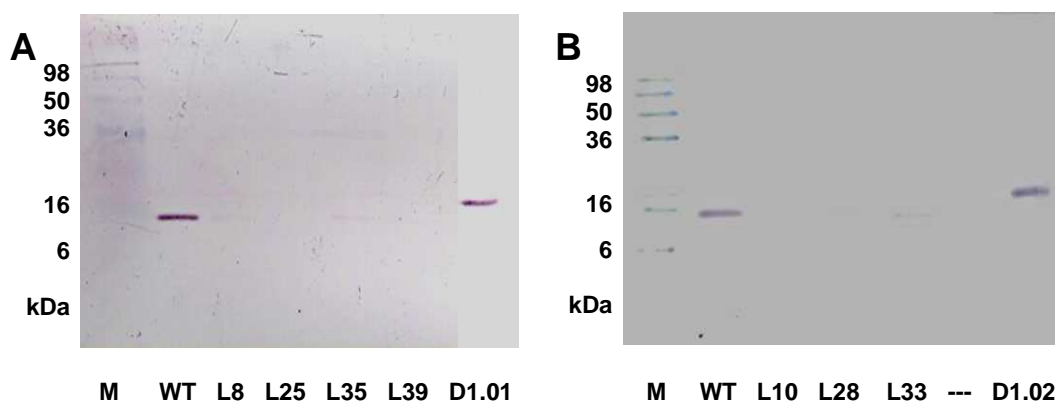


Abb.3.10: Immunologische Ermittlung der Dau c 1.01 und Dau c 1.02 Suppressionsstärke hypoallergener Möhrenwurzeln. Zur Ermittlung der Suppressionsstärke der hypoallergen Möhrenwurzeln wurden die Proteine der Möhren extrahiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Diese wurden geblottet und die Zielproteine Dau c 1.01 und Dau c 1.02 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Der Immunoblot mit Proteinen aus Wildtyp-Möhren und von den Dau c 1.01 supprimierten hypoallergenen Linien 8, 25, 35 und 39 ist in Abbildung A zu sehen. In Abbildung B ist der Immunoblot mit den Proteinextrakten aus den Dau c 1.02 supprimierten Linien 10, 28 und 33 und der Wildtyp-Möhre abgebildet. M: Größenstandard; D1.01: Das rekombinante Protein von Dau c 1.01; D1.02: Das rekombinante Protein von Dau c 1.02 (Durchführung und Bereitstellung Dr. Fötisch, Paul-Ehrlich-Institut Langen; Peters et al. eingereicht).

Tab. 3.1: ELISA-Analyse der Suppressionsstärke der Dau c 1.01 bzw. Dau c 1.02 in transgenen Möhren. Mit ELISA wurde die Suppressionsstärke der Dau c 1.01 und Dau c 1.02-Proteine in den transgenen Wurzeln ermittelt und mit der Dau c 1.01 bzw. Dau c 1.02-Proteinmenge der Wildtyp-Möhrenwurzeln verglichen. Die Reduktion der Zielproteine ist prozentual im Vergleich zur Wildtyp-Zielproteinmenge angegeben. ↓: Unterdrückung. *: Unterhalb der Detektionsgrenze von 10 ng/ml (Durchführung und Bereitstellung Dr. Fötisch, Paul-Ehrlich-Institut Langen; Fötisch, unveröffentlicht).

Linie	Dau c 1.01 Reduktion in %	Dau c 1.02 Reduktion in %
25 (Dau c 1.01↓)	87	-
35 (Dau c 1.01↓)	70	-
39 (Dau c 1.01↓)	88	-
10 (Dau c 1.02↓)	-	100*
28 (Dau c 1.02↓)	-	100*
33 (Dau c 1.02↓)	-	100*

3.3 BLATT-MORPHOLOGIE

Die Auswirkung der Unterdrückung der *Dau c 1*-Isoformen auf den Phänotyp der ausgewachsenen Möhren wurde anhand der Blätter untersucht. Die Wurzeln der Möhren aus der *in vitro*-Kultur unterschieden sich sehr stark in ihrer Form, dadurch war es nicht möglich eine Normalform der Wurzeln festzulegen. Aus diesem Grund wurde die Morphologieanalyse auf die Blätter begrenzt. Bei den untersuchten Möhren handelte es sich um aus *in vitro*-Kultur in Erde überführte Pflanzen, die bereits etwa 2,5 Monate im Gewächshaus kultiviert wurden. Das Erscheinungsbild der Möhren, Wildtyp oder transgener Möhren, unterschied sich nur geringfügig voneinander. Nur in einzelnen Linien der transgenen Möhren konnte eine morphologische Änderung der Blätter beobachtet werden.

In den Möhren mit der *Dau c 1.01*-Unterdrückung war bei der Linie 39 eine solche Änderung sichtbar (Abb. 3.11 A, zweite Pflanze von links; B, erste Blatt von rechts). Die Blätter dieser Linie waren kleiner und der Petiolus war kürzer als die Blätter anderer transgener Linien oder der Wildtyp-Möhre. Die Blattspreite der Fiederblätter war flächiger, die Fiederung war reduziert im Vergleich zu Wildtyp-Möhrenblättern.

In den Möhren mit der *Dau c 1.02*-Unterdrückung unterschieden sich die Blätter der Linie 33 (Abb. 3.12 A, erste Pflanze von rechts; B, das erste Blatt von rechts) gering von den Blättern anderer transgener und der Wildtyp-Pflanzen. Die Blattspreite der Fiederblätter der Linie 33 war flächiger als die der weiteren Pflanzen.

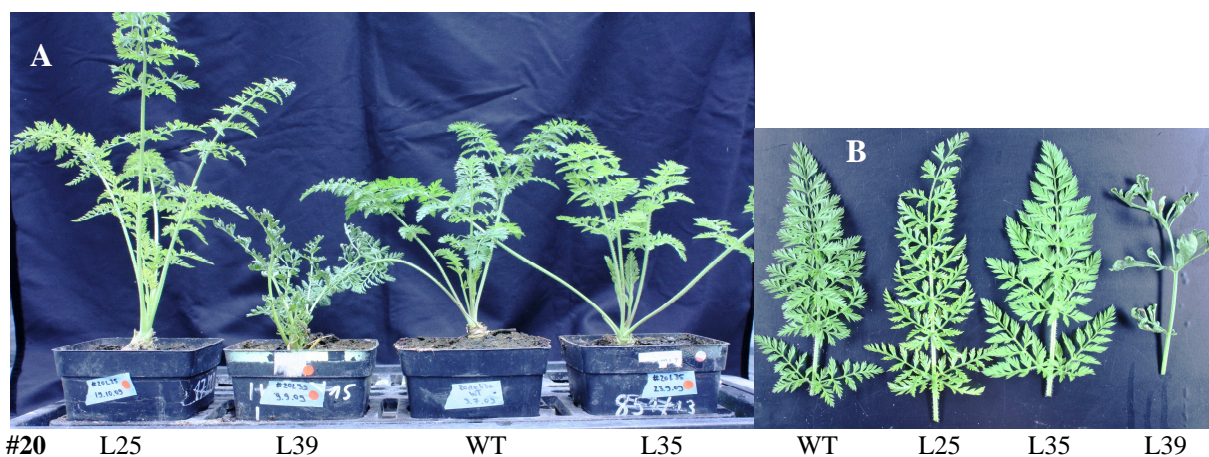


Abb. 3.11: Blatt-Morphologie der *Dau c 1.01*-supprimierten Linien. Die Blatt-Morphologie wurde an etwa 2,5 Monate alten, im Gewächshaus kultivierten, ausgewachsenen Möhren untersucht. Die *Dau c 1.01*-supprimierten Linien 25, 39 und 35 enthalten das pK7GWIWG2(II)-*Dau c 1.01*-RNAi-Konstrukt in ihrem Genom und ihre Blätter wurden mit den Blättern der Wildtyp-Möhre verglichen. Die Pflanzen wurden in Erde:Sand (5:1)-Gemisch kultiviert (A). Jeweils ein Blatt wurde von den Pflanzen zum Morphologievergleich abgetrennt (B).

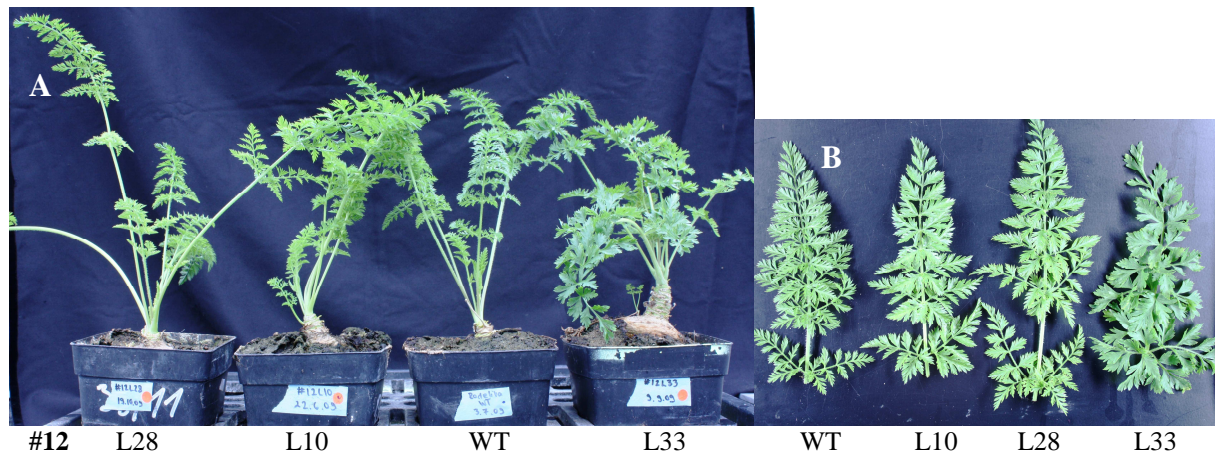


Abb. 3.12: Blatt-Morphologie der Dau c 1.02-supprimierten Linien. Für die Untersuchung der Blatt-Morphologie wurden an etwa 2,5 Monate alten, im Gewächshaus kultivierte Pflanzen genommen. Die Dau c 1.02 supprimierten Linien 28, 10 und 33 enthalten das pK7GWIWG2(II)-Dau c 1.02-RNAi-Konstrukt in ihrem Genom und ihre Blätter wurden mit den Blättern der Wildtyp-Möhre verglichen. Die Pflanzen wurden in Erde:Sand (5:1)-Gemisch kultiviert (A). Jeweils ein Blatt wurde von den Pflanzen zur Morphologievergleich abgetrennt (B).

3.4 RESISTENZANALYSEN VON MÖHRENWURZELSCHLEIBEN

Das zweite Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Auswirkung die Unterdrückung der Dau c 1-Isoformen für das pflanzliche Immunsystem hat, da das Dau c 1 Protein zu den Pathogenese-assoziierten Proteinen („*pathogenesis related-proteins*“, kurz PR) gehört. Es ist bekannt, dass die Expression der PR-Proteine direkt mit der Pflanzenresistenz korreliert (Van Loon und Van Strien, 1999). Genauer gesagt, gehört das Dau c 1 der Familie 10 der Pathogenese-assoziierten Proteine (PR10) an (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999; Hoffmann-Sommergruber 2000). Für die Resistenzanalysen wurde der möhrenpathogene Pilz *Alternaria radicina* (Meier et al. 1922) eingesetzt.

3.4.1 RESISTENZANALYSEN MIT *ALTERNARIA RADICINA*

Die Resistenz-Analysen an Wildtyp-Möhrenwurzelscheiben wurden mit auf dem Feld gewachsenen Wildtyp-Möhren (*Daucus carota* spp. *sativus* cv. Rodelika) vom Dottenfelder Hof durchgeführt.

Für die visuelle Analyse des Infektionsverlaufs wurde eine Wildtyp-Möhrenscheibe mit *Alternaria radicina*-Sporensuspension inokuliert und eine andere Möhrenscheibe mit H₂O behandelt (Abb. 3.13). Die Möhrenscheiben wurden 1, 3 und 7 Tage nach der *A. radicina*-Inokulation (dai) beobachtet und fotografiert. Die ersten Zeichen der Infektion sind drei Tage nach der *A. radicina*-Inokulation als eine dunkler werdende Stelle rechts auf der Möhrenwurzelscheibe zu sehen (E). 7 dai war die *A. radicina*-Infektion deutlich auf der

Möhrenwurzelscheibe als dunkle Stelle zu sehen (F). Auf den H₂O-behandelten Möhrenwurzelscheiben war keine Änderung sichtbar (A, B und C).

Bei der Transkriptions-Analyse mit quantitativer Real-Time PCR (qPCR) der beiden *Dau c 1*-Isoformen konnte eine Transkriptionsinduktion beider Isoformen bereits sechs Stunden nach der *A. radicina*-Inokulation (hai) festgestellt werden (Abb. 3.14). 24 hai waren beide Isoformen deutlich höher exprimiert in den *A. radicina*-inokulierten Wurzelscheiben als in den H₂O-behandelten Kontrollwurzelscheiben. Während die relative Expression von *Dau c 1.01* 72 hai steigt, geht die relative Expression des *Dau c 1.02* leicht zurück. Es war ein leichter Anstieg der relativen Expression von *Dau c 1.01* 6 hai auch in den H₂O-behandelten Kontrollwurzelscheiben festzustellen (Abb. 3.14 A). Diese sank 24 hai wieder ab. Die relative *Dau c 1.02*-Expression stieg ab 6 hai in den H₂O-behandelten Kontrollwurzelscheiben an (Abb. 3.14 B). Die relative *Dau c 1.02*-Expression stieg bis 24 hai an und begann anschließend zu sinken (72 hai). Wie man in Abbildung 3.14 sehen kann, lag der relative Expressionslevel der *Dau c 1*-Isoformen stets niedriger in den H₂O-behandelten Kontrollwurzelscheiben als in den mit *A. radicina*-inokulierten Wurzelscheiben.

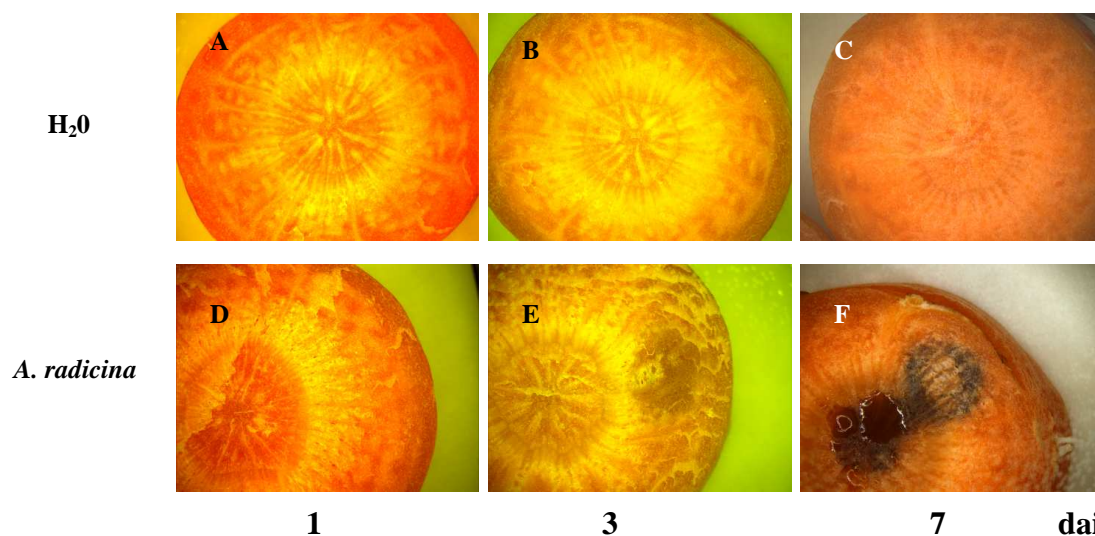


Abb. 3.13: Befallsablauf nach Inokulation der Wildtyp Wurzelscheiben mit *Alternaria radicina*. Der Infektionsverlauf wurde 1, 3, und 7 Tage der Inokulation mit *A. radicina* Sporensuspension (D, E und F) bzw. mit H₂O (A, B und C) ermittelt.

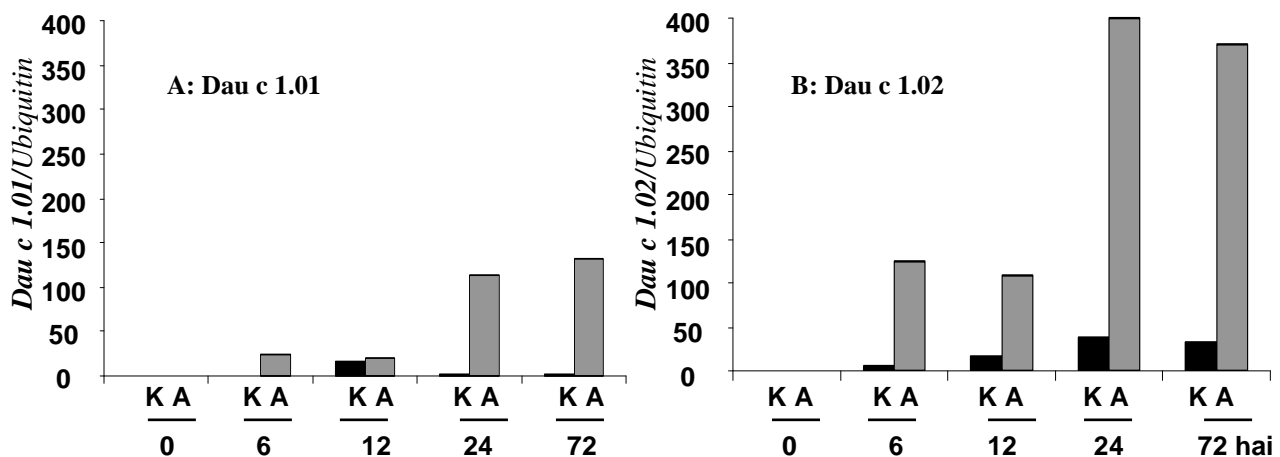


Abb. 3.14: Transkriptionskinetik der *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02* Gene nach Inokulation der Wildtyp Wurzelscheiben mit *Alternaria radicina*. Die eingesetzten Wildtyp-Möhren sind auf Feldern des Dottenfelder Hofes gewachsen. Dargestellt sind die mit qPCR ermittelten relativen Expressionen der *Dau c 1.01*- (A) und *Dau c 1.02*-Gene (B) in *A. radicina*-inokulierten und in nicht-inokulierten Wildtyp-Möhrenscheiben 0, 6, 12, 24 und 72 Stunden nach der Inokulation (hai). K: mit H₂O behandelte Kontrolle; A: mit *Alternaria radicina*-Sporensuspension inokuliert.

3.4.2 RESISTENZANALYSEN TRANSGENER MÖHRENWURZEL-SCHEIBEN MIT *ALTERNARIA RADICINA*

Um feststellen zu können, ob die Unterdrückung der *Dau c 1*-Isoformen eine verminderte Resistenz in den Wurzeln gegenüber pflanzlichen Pathogenen bewirkt, wurden Resistenzanalysen mit den Wurzeln der transgenen Linien 35, 39 (#20: *Dau c 1.01* unterdrückt) und 10 (#12: *Dau c 1.02* unterdrückt) durchgeführt. Wildtyp-Möhren wurden zur Kontrolle gleich mit den transgenen Möhren behandelt. Alle ausgewachsenen im Gewächshaus kultivierten Pflanzen stammten aus der *in vitro*-Kultur.

Es wurden vier Möhren je transgener Linie sowie vom Wildtyp für die *A. radicina*-Kinetik eingesetzt. Die Möhrenscheiben jeder Linie und des Wildtyps wurden jeweils heterogen auf vier Petrischalen verteilt, so dass pro Linie und Wildtyp vier Petrischalen vorlagen. Die Möhrenwurzelscheiben wurden jeweils in zwei Petrischalen mit der *A. radicina*-Sporensuspension inokuliert und die anderen mit H₂O behandelt. Die Möhrenwurzelscheiben wurden 0, 6, 12 und 24 Stunden (hai) nach der Inokulation geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Jeweils eine Möhrenwurzelscheibe blieb bis sieben Tage nach der Inokulation (dai) in den Petrischalen liegen. Anhand dieser Scheiben wurde der Infektionserfolg kontrolliert (Abb. 3.15, jeweils die zwei rechten Wurzelscheiben). Nach Feststellung des Infektionserfolgs wurden die Proben für die qPCR-Analysen verwendet.

7 dai war die *A. radicina*-Infektion als dunkler Bereich auf den Möhrenwurzelscheiben zu erkennen (Abb. 3.15). Auf den Wurzelscheiben von Wildtyppflanzen war nur auf einer Scheibe eine deutliche Infektion zu sehen (A). Auf den Wurzelscheiben der Linien 35 und 39

(*Dau c 1.01*-supprimiert) war die Infektion am deutlichsten zu sehen (B und C). Auf den Wurzelscheiben der Linie 10 (*Dau c 1.02*-Supprimiert) war die Infektion nur leicht ausgeprägt (D).

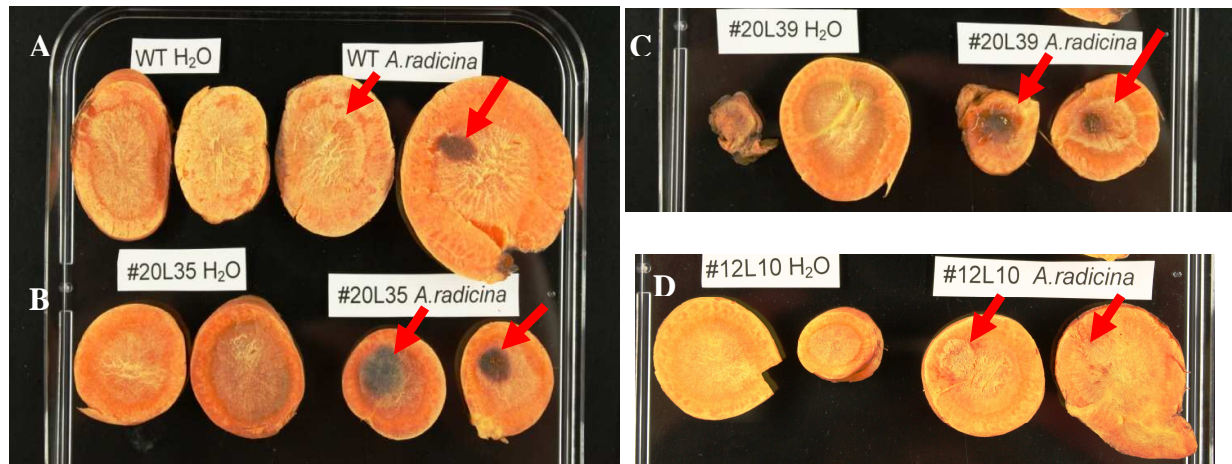


Abb. 3.15: Befall transgener- und Wildtyp-Möhrenscheiben 7 Tage nach der Inokulation mit *Alternaria radicina*-Sporensuspension. Sieben Tage nach der *A. radicina*-Inokulation war auf Wildtyp- sowie auf den transgenen Möhrenscheiben der Linien 35, 39 (*Dau c 1.01*↓) und 10 (*Dau c 1.02*↓) eine Infektion zu erkennen. Die mit H₂O-behandelten Möhrenscheiben zeigten keine Anzeichen von Infektionen. Rote Pfeile: zeigen auf die Infektionsstellen.

Durch qPCR-Analysen wurde in cDNA der Proben von Wildtyp und den Linien 35, 39 (#20: *Dau c 1.01*-supprimiert) und 10 (#12: *Dau c 1.02*-supprimiert) aus der *A. radicina*-Kinetik die relative Expression von *Dau c 1.01*, *Dau c 1.02*, *Daucus carota* PRPlike1 (*DcPRPlike1*) und *PR3* ermittelt.

Das *DcPRPlike1*-Gen wurde von Sano et al. (2004) zuerst beschrieben. Es weist eine 70-72%ige Homologie zum *Dau c 1*-Gen auf. Das *PR3*-Protein gehört zu einer weiteren Familie der pathogen-assoziierten Proteine (Van Loon und Van Strien 1999). Bei *PR3* handelt es sich um eine Chitinase (Van Loon und Van Strien 1999). Die hier verwendete Sequenz wurde von Wiweger et al. (2003) als *Daucus carota* Chitinase EP3 Gen publiziert.

Jede Probe bestand aus 4 Möhrenscheiben aus vier verschiedenen Möhrenklonen einer Linie, die zu einer heterogenen Probe für die qPCR-Analysen vorbereitet wurden. Dadurch gab es keine messbaren Abweichungen, da die gemessenen Werte bereits den Durchschnittswert wiedergeben.

3.4.2.1 Relative Expression von *Dau c 1.01*-Gens

Die relative Expression von *Dau c 1.01* stieg in allen Wurzelscheiben sowohl in mit Wasser behandelten wie auch in *A. radicina*-inokulierten Wurzelscheiben mit zunehmender Zeit an (Abb. 3.16). Auffallend hoch war die relative Expression in der mit Wasser behandelten Wildtyp-Probe 0 hai (Abb. 3.16, A). Es gab keinen deutlichen Zusammenhang zwischen der relativen Expression von *Dau c 1.01* und der *A. radicina*-Infektion wie es bei der Transkriptionsanalyse mit den auf dem Feld gewachsenen Wildtyp-Möhrenwurzeln festgestellt wurde (vgl. Kapitel 3.4.1). Die relative *Dau c 1.01*-Expression lag hier zu 6 hai in den *A. radicina*-inokulierten Wildtyp-Wurzelscheiben und in den Wurzelscheiben der Linie 39 (*Dau c 1.01*-supprimiert) niedriger als in deren H₂O-behandelten Kontrollwurzelscheiben (Abb. 3.16 A und C). In den inokulierten Wurzelscheiben der Linien 35 (*Dau c 1.01*-supprimiert) und 10 (*Dau c 1.02*-supprimiert) lag die relative *Dau c 1.01*-Expression leicht höher als in deren Kontrollwurzelscheiben (B und D). 12 hai lag der relative *Dau c 1.01*-Expressionslevel in den inokulierten Wurzeln der Linien 35 und 39 höher als in deren Kontrollwurzelscheiben. In den Wildtyp-Wurzelscheiben war die relative *Dau c 1.01*-Expression 12 hai in den inokulierten und nicht-inokulierten Wurzelscheiben gleich hoch. Nur in den inokulierten Wurzelscheiben der Linie 10 lag der relative *Dau c 1.01*-Expressionslevel 12 hai unterhalb dem der Kontrolle. 24 hai war die relative *Dau c 1.01*-Expression in den inokulierten Wurzeln der Linien 39 und 10 höher als in den H₂O-behandelten Wurzeln. Dies war in den Wurzelproben des Wildtyps und der Linie 35 24 hai umgekehrt. Hier lag die relative Expression des *Dau c 1.01* in den H₂O-behandelten Wurzelscheiben höher als in den inokulierten Scheiben.

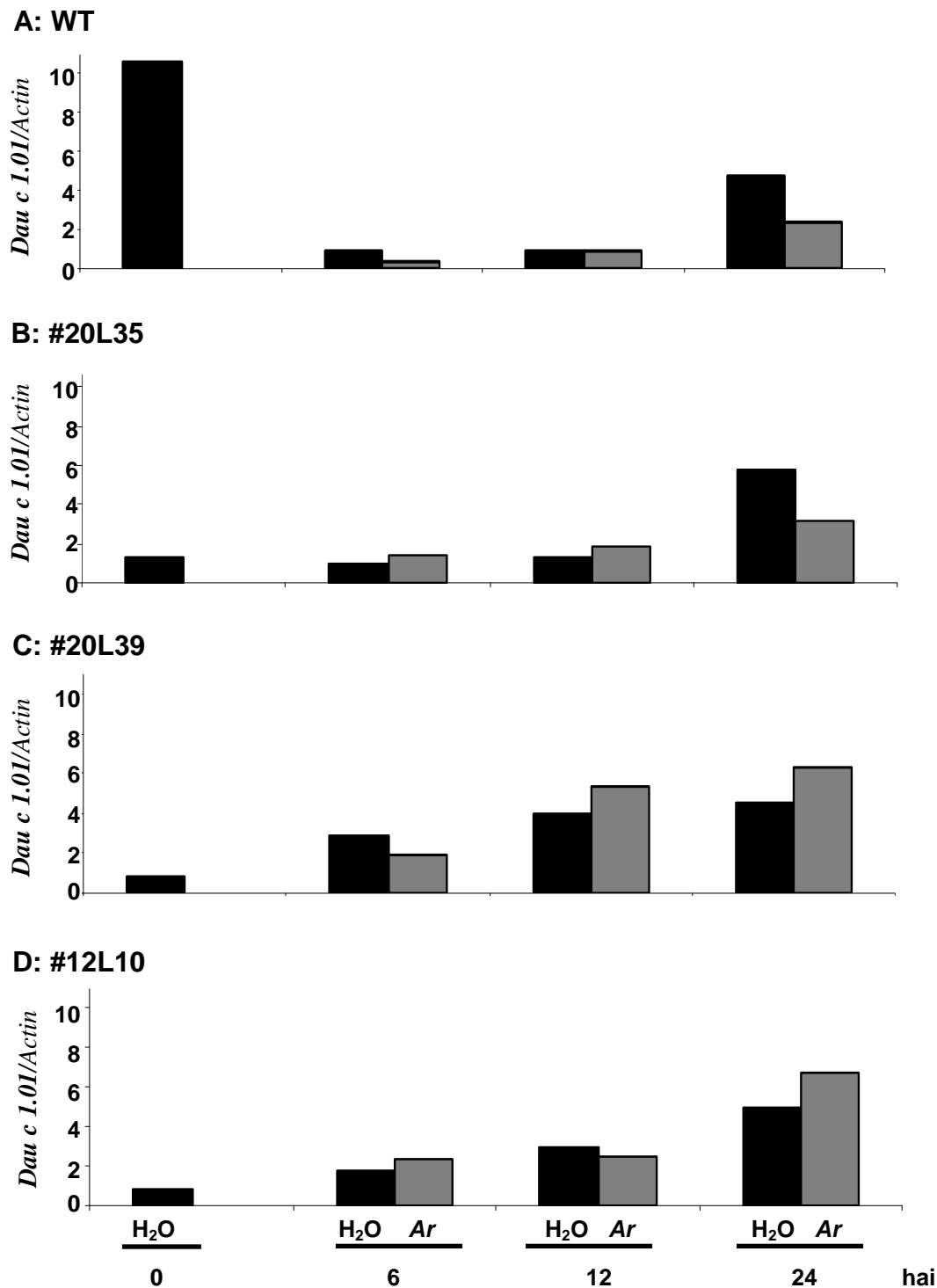


Abb. 3.16: Transkriptionskinetik des *Dau c 1.01*-Gens nach Inokulation der Wurzelscheiben mit *Alternaria radicina*. Die relative Expression von *Dau c 1.01* in den H₂O-behandelten (H₂O) und in den mit *A. radicina*-inokulierten (*Ar*) Möhrenwurzelscheiben-Proben wurde 0, 6, 12 und 24 Stunden nach Inokulation (hai) mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt. Eine Expression von *Dau c 1.01* wurde zu 0 hai nur in den H₂O-behandelten Möhrenwurzelscheiben festgestellt. #20L35: *Dau c 1.01* unterdrückte Linie 35; #20L39: *Dau c 1.01* unterdrückte Linie 39; #12L10: *Dau c 1.02* unterdrückte Linie 10, WT: Wildtyp.

3.4.2.2 Relative Expression des *Dau c 1.02*-Gens

Die relative Expression von *Dau c 1.02* stieg ebenso wie die relative Expression von *Dau c 1.01* mit der zunehmenden Zeit in allen Proben an (Abb. 3.17). Dies war sowohl in den *A. radicina*-inokulierten wie auch in den mit H₂O-behandelten Kontrollwurzelscheiben festzustellen. Der relative Expressionslevel von *Dau c 1.02* war höher als der von *Dau c 1.01* (vgl. Abb. 3.16 und 3.17). Am Anfang der *Dau c 1.02*-Kinetik lag die relative *Dau c 1.02*-Expression in allen Kontrollwurzelscheiben etwa gleich hoch. Nur in den Kontrollwurzelscheiben der Linie 10 (*Dau c 1.02*-supprimiert) lag der relative *Dau c 1.02*-Expressionslevel niedriger als in den anderen Kontrollwurzelscheiben (Abb. 3.17, Bemerkung: die Skalierung in D ist um 100-fach niedriger als in A, B und C). 6 hai konnte man keine *A. radicina*-induzierte *Dau c 1.02*-Hochregulation in den Wurzelscheiben erkennen. Nur in den inokulierten Wurzelscheiben der Linie 10 lag der relative *Dau c 1.02*-Expressionslevel leicht über dem der Kontrollwurzelscheiben. 12 hai wurde in den inokulierten Wurzelscheiben der Linie 35 (*Dau c 1.01*-supprimiert) eine niedrigere relative *Dau c 1.02*-Expression als in den zugehörigen Kontrollwurzelscheiben ermittelt. In den inokulierten Wurzelscheiben des Wildtyps und der Linie 10 lag die relative *Dau c 1.02*-Expression leicht über der der Kontrollwurzelscheiben. 12 hai zeigten die inokulierten Wurzelscheiben der Linie #20L39 (*Dau c 1.01*-supprimiert) den stärksten Anstieg des relativen *Dau c 1.02*-Expressionslevels. Bei dieser Linie war die relative *Dau c 1.02*-Expression ab 12 hai in den mit *A. radicina*-inokulierten Möhrenwurzelscheiben höher als in den H₂O-behandelten Kontrollwurzelscheiben (Abb. 3.17 C, 12 und 24 hai). Diese Linie war die einzige, die dieses Expressionsmuster zeigt. Bei allen anderen der drei getesteten Linien war der relative Expressionslevel des *Dau c 1.02* in den *A. radicina*-inokulierten Möhrenwurzelscheiben niedriger als in den H₂O-behandelten Kontrollwurzelscheiben (24 hai) (Abb. 3.17, A, B und D). Den deutlich niedrigsten relativen Expression von *Dau c 1.02* zeigten die Möhrenwurzelscheiben der Linie #12L10 an.

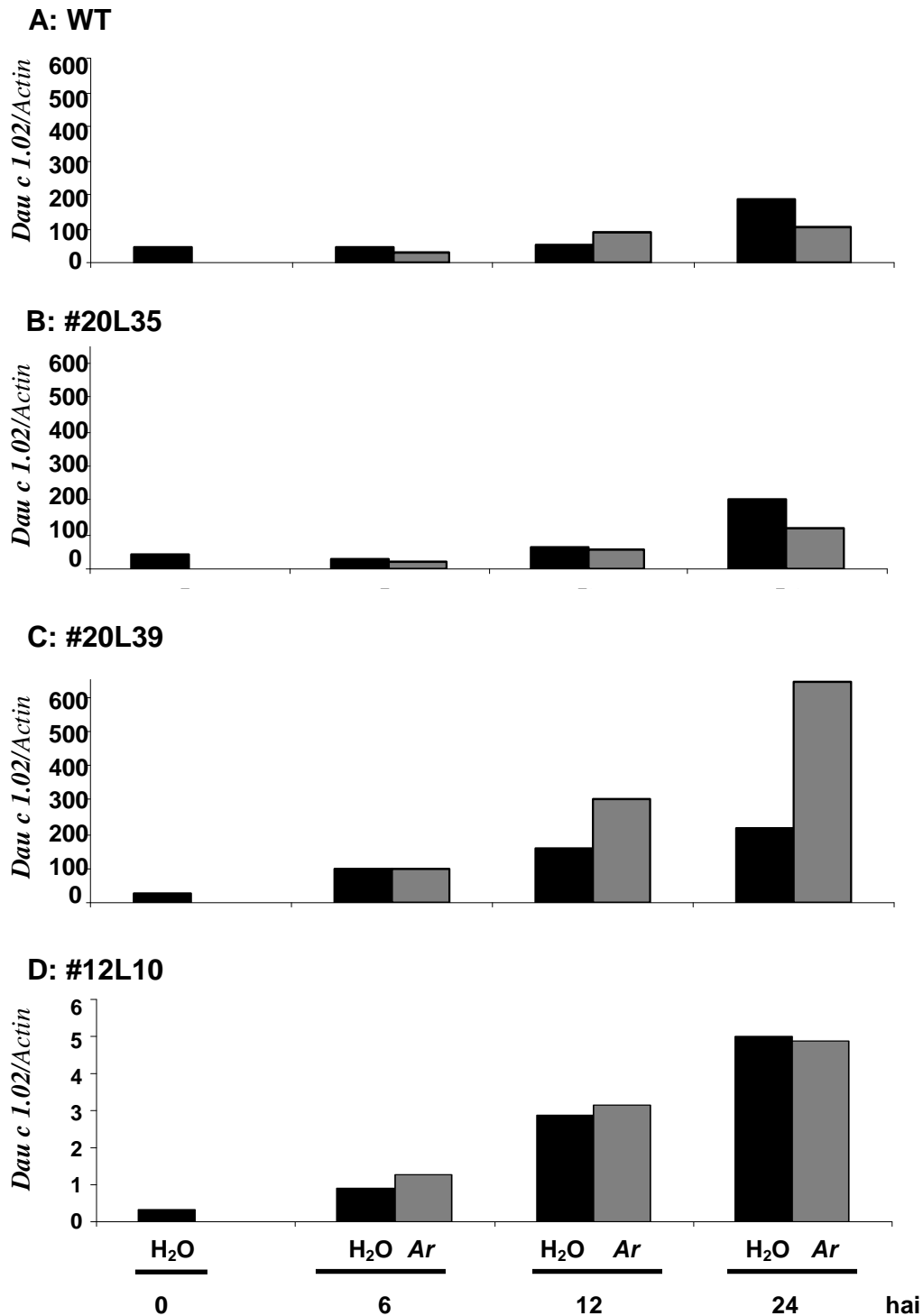


Abb. 3.17: Transkriptionskinetik des *Dau c 1.02*-Gens nach Inokulation der Wurzelscheiben mit *Alternaria radicina*. Die relative Expression des *Dau c 1.02*-Gens wurde 0, 6, 12 und 24 Stunden nach der *A. radicina*-Inokulation (hai) oder H₂O-Behandlung (H₂O) der Möhrenwurzelscheiben von Wildtyp-Möhren sowie in den Linien 35, 39 (*Dau c 1.01*↓) und 10 (*Dau c 1.02*↓) mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt. Der relative *Dau c 1.02*-Expressionslevel wurde 0 hai nur in den H₂O-behandelten Möhrenwurzelscheiben festgestellt. Die Skalierung der Abbildung D ist 100-fach niedriger. ↓: Suppression; #20: *Dau c 1.01*-supprimiert; #12: *Dau c 1.02*-supprimiert, WT: Wildtyp.

3.4.2.3 Relative Expression des *DcPRlike1*-Gens

Die relative Expression des *DcPRLIKE1*-Gens stieg wie auch die der *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-Gene mit zunehmender Zeit in allen Proben an (Abb. 3.18). Der relative *DcPRlike1*-Expressionslevel bewegte sich im gleichen Bereich wie der des *Dau c 1.02*-Gens (vgl. Abb. 3.17). Am Anfang der *DcPRlike1*-Transkription-Analyse lag der relative *DcPRlike1*-Expressionslevel in allen Wurzelscheiben niedrig. In den Wurzelscheiben der Linie 35 (#20L35, *Dau c 1.01*-unterdrückt) war die relative Expression des *DcPRlike1*-Gens über die gesamte Analysezeit am niedrigsten (Abb. 3.18 A und B). Der relative *DcPRlike1*-Expressionslevel in den Wurzelscheiben der Linie 35 war etwas niedriger als in den Wildtyp-Wurzelscheiben. 6 hai stieg die relative *DcPRlike1*-Expression in allen Wurzelscheiben leicht an. In den inokulierten Wurzelscheiben des Wildtyps und der Linie 39 (*Dau c 1.01*-supprimiert) lag der relative *DcPRlike1*-Expressionslevel leicht unter der der Kontrollwurzelscheiben. Der relative *DcPRlike1*-Expressionslevel der inokulierten Wurzelscheiben der Linien 35 und 10 (*Dau c 1.02*-supprimiert) befand sich etwas über dem der Kontrollwurzelscheiben. Während die relative *DcPRlike1*-Expression in den Wurzelscheiben der Linie 35 12 hai relativ unverändert blieb, stieg der relative *DcPRlike1*-Expressionslevel in den anderen untersuchten Wurzelscheiben. In den inokulierten Wurzelscheiben des Wildtyps und der Linien 39 und 10 lag der relative *DcPRlike1*-Expressionslevel 12 hai unter dem der Kontrollwurzelscheiben. 24 hai stieg die relative *DcPRlike1*-Expression in den inokulierten Wurzelscheiben der Linien 39 und 10 über die dessen Kontrollwurzelscheiben an. Zu diesem Zeitpunkt wurde im Gegensatz zu den Ergebnissen der Linien 39 und 10, in den H₂O-behandelten Wurzelscheiben des Wildtyps und der Linie 35 ein höherer relative *DcPRlike1*-Expressionslevel festgestellt als in den *A. radicina*-inokulierten Wurzelscheiben (Abb. 3.18 A und B, 24 hai).

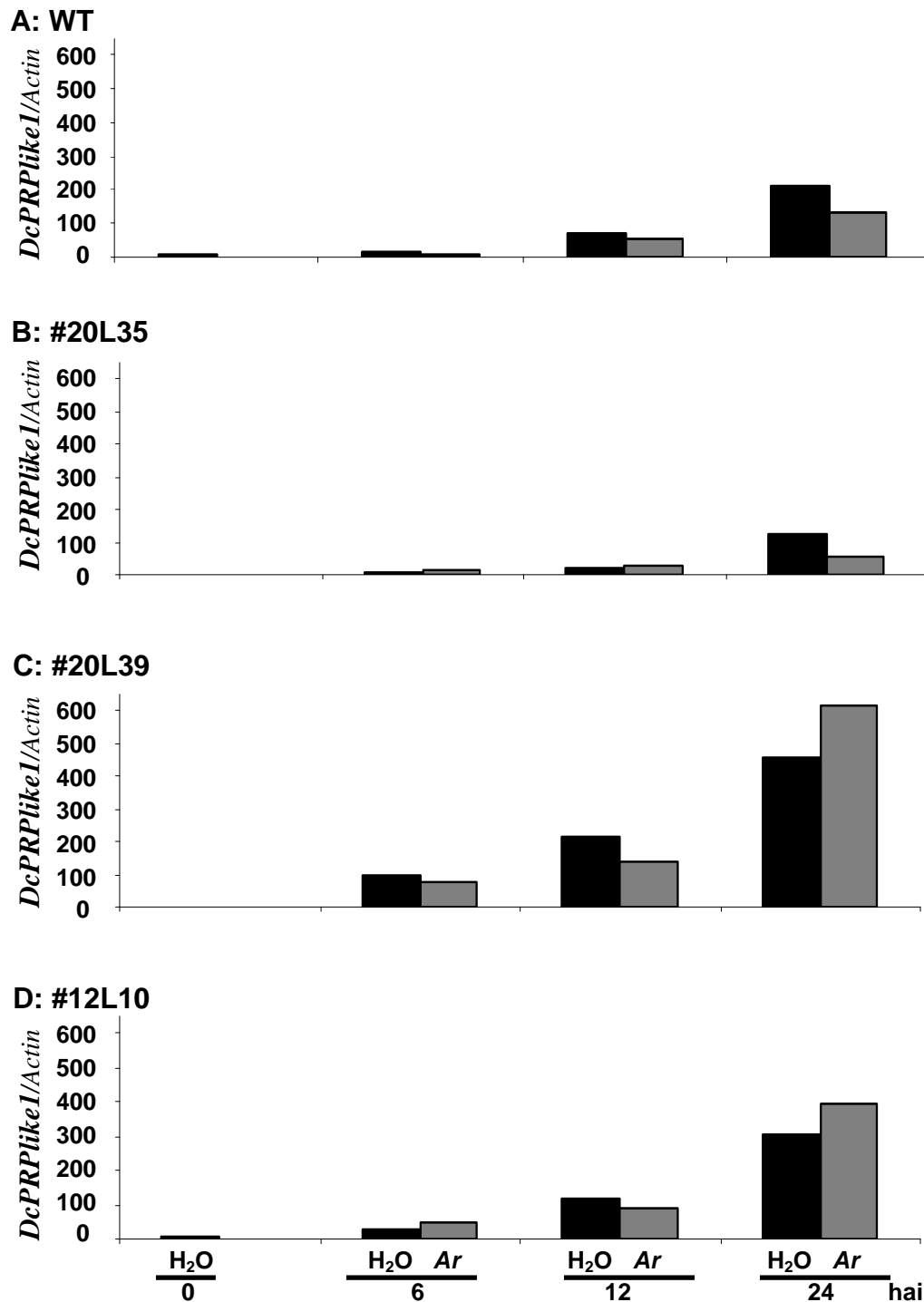


Abb. 3.18: Transkriptionskinetik des *DcPRPlike1*-Gens nach Inokulation der Wurzelscheiben mit *Alternaria radicina*. Die relative Expression des *DcPRPlike1*-Gens wurde 0, 6, 12 und 24 Stunden nach der *A. radicina*-Inokulation (hai) oder H₂O-Behandlung (H₂O) der Möhrenwurzelscheiben von Wildtyp-Möhren sowie in den Linien 35, 39 (Dau c 1.01↓) und 10 (Dau c 1.02↓) mit quantitativer Real-Time PCR ermittelt. Der relative *DcPRPlike1*-Expressionslevel wurde 0 hai nur in den H₂O-behandelten Möhrenwurzelscheiben festgestellt. ↓: Suppression; #20: Dau c 1.01-supprimiert; #12: Dau c 1.02-supprimiert, WT : Wildtyp.

3.4.2.4 Relative Expression des *PR3*-Gens

Die relative Expression des *PR3*-Genes stieg mit zunehmender Zeit in H₂O-behandelten Kontrollwurzelscheiben wie auch in den mit *A. radicina*-inokulierten Wurzelscheiben (Abb. 3.19) an, wie es auch für die relative Expression von *Dau c 1.01*-, *Dau c 1.02*- und *DcPRPlike1*-Gene beobachtet wurde (Abb. 3.16, 3.17 und 3.18). Am Anfang der *PR3*-Transkriptionsanalyse lag der relative *PR3*-Expressionslevel in den Wurzeln der transgenen Linien 35, 39 (beide *Dau c 1.01*-supprimiert) und 10 (*Dau c 1.02*-supprimiert) niedriger als in den Wildtyp-Wurzelscheiben (Abb. 3.19). 6 hai gab es keine *PR3*-Transkriptionsinduktion in den inokulierten Wurzelscheiben des Wildtyps und der Linie 35. Hier lag der relative *PR3*-Expressionslevel der inokulierten Wurzelscheiben unterhalb dem der Kontrollwurzelscheiben. In den Wurzelscheiben der Linien 39 und 10 stieg der relative *PR3*-Expressionslevel 6 hai in inokulierten und in nicht-inokulierten Wurzelscheiben an. Während in den inokulierten Wurzelscheiben der Linie 39 die relative *PR3*-Expression niedriger als in den Kontrollwurzelscheiben war, lag die relative *PR3*-Expression der inokulierten Wurzelscheiben der Linie 10 über dem der Kontrollwurzelscheiben. In den Wurzelscheiben des Wildtyps und der Linien 35 und 39 stieg die relative *PR3*-Expression 12 hai in inokulierten und in nicht-inokulierten Wurzelscheiben an, hier lag der relative *PR3*-Expressionslevel in den inokulierten Wurzelscheiben jeweils unterhalb dem der Kontrollwurzelscheiben. In den nicht-inokulierten Wurzelscheiben der Linie 10 stieg die relative *PR3*-Expression 12 hai an und lag über den relativen *PR3*-Expressionslevel der inokulierten Wurzelscheiben. Nur in den *A. radicina*-inokulierten Wurzelscheiben der Linie 39 konnte 24 hai ein deutlich höheres relatives Expressionslevel von *PR3* als in den H₂O-behandelten Wurzelscheiben ermittelt werden (Abb. 3.19 C, 24 hai). In den Proben von Wildtyp und der Linie 35 war die relative *PR3*-Expression in den H₂O-behandelten Kontrollwurzelscheiben höher als in den mit *A. radicina*-inokulierten Wurzelscheiben. 24 hai lag die relative *PR3*-Expression in nicht-inokulierten und inokulierten Wurzelscheiben der Linie 10 etwa auf dem gleichen Level.

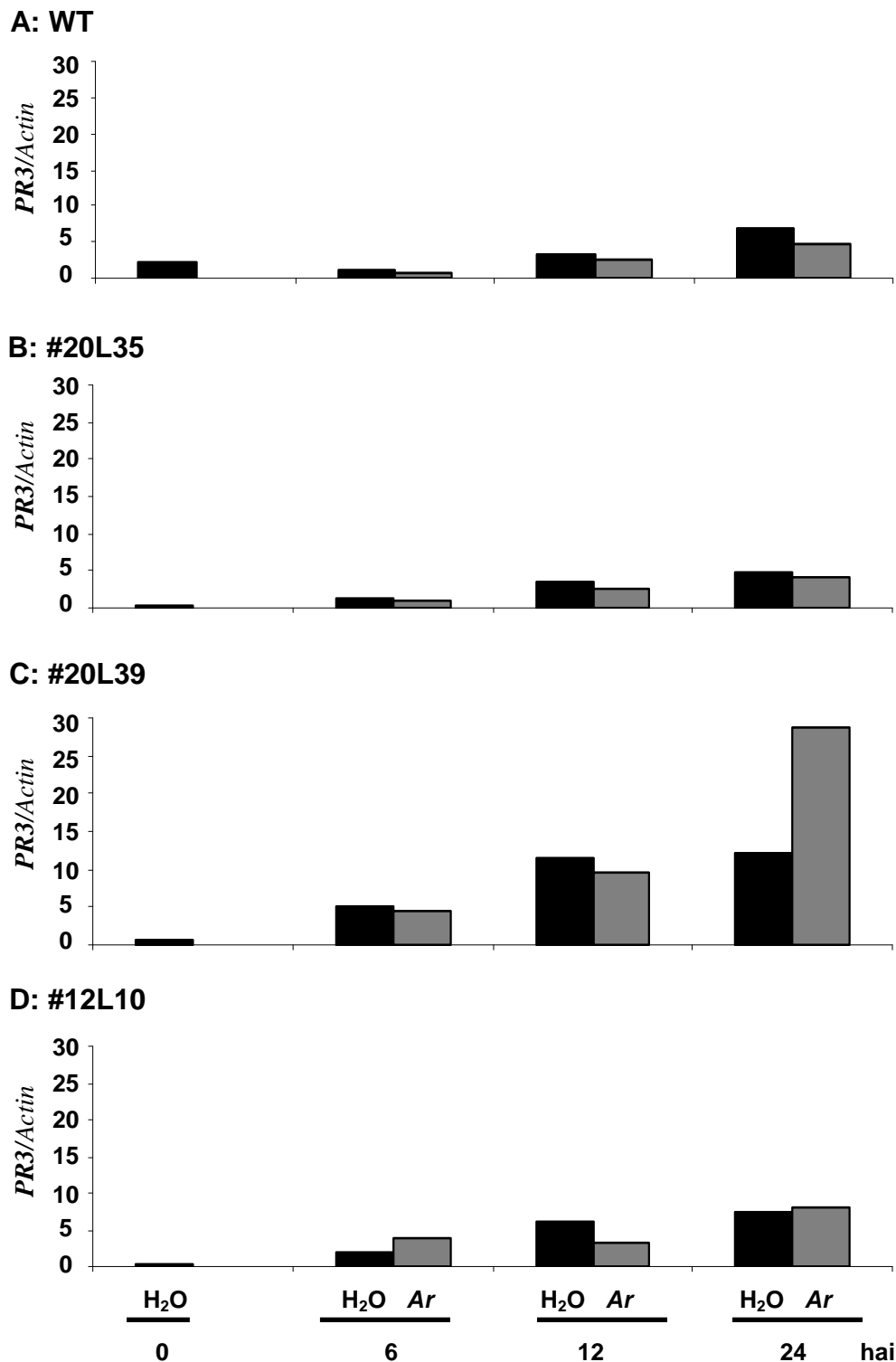


Abb. 3.19: Transkriptionskinetik des PR3 Gens nach Inokulation der Wurzelscheiben mit *Alternaria radicina*. Die relative Expression des PR3-Gens wurde 0, 6, 12 und 24 Stunden nach der *A. radicina*-Inokulation (hai) oder H₂O-Behandlung (H₂O) der Möhrenwurzelscheiben von Wildtyp-Möhren sowie in den Linien 35, 39 (Dau c 1.01↓) und 10 (Dau c 1.02↓) mit quantitativer Real-Time PCR ermittelt. Der relative PR3-Expressionslevel wurde 0 hai nur in den H₂O-behandelten Möhrenwurzelscheiben festgestellt. ↓: Suppression; #20: Dau c 1.01-supprimiert; #12: Dau c 1.02-supprimiert, WT: Wildtyp.

3.5 RESISTENZANALYSE DER MÖHREN

Die in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse wurden in Kooperation mit von der Autorin hergestellten Möhren am Julius-Kühn-Institut, Quedlinburg (Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst) durchgeführt.

Es wurden die Pflanzenteile Blatt, Petiolus und Wurzel analysiert. Jeweils 10 Pflanzen der transgenen Linien 35 (Dau c 1.01-supprimiert) und 10 (Dau c 1.02-supprimiert) und der Wildtyp-Pflanzen, die aus der *in vitro*-Kultur stammen und der Pflanzen, die aus Samen gewachsen sind, wurden untersucht. Die Möhrensamen waren die gleichen, die für die *in vitro*-Kulturherstellung verwendet wurden. Bei den Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur handelte es sich um in Erde überführte Klompflanzen. Die Pflanzen waren vor dem Versuchbeginn mit Mehltau befallen. Erst 12 Tage nach der Spritzung mit "Ortiva" zur Beseitigung des Mehltaus wurde mit den Resistenzanalysen begonnen, um eine Verfälschung der Daten zu vermeiden. Der Infektionsverlauf wurde zu festgelegten Zeitpunkten nach der Pilzinokulation mittels DIAS (Digitales Analyse System) der Fa. LemnaTec erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SYSTAT 9.0 (Wilkinson 1998).

3.5.1 RESISTENZANALYSE DER MÖHRENBLÄTTER

Um die Resistenz der transgenen Möhrenblätter gegen pilzliche Pflanzenpathogene zu analysieren, wurden diese mit einer *Alternaria dauci*-Sporensuspension (*A. dauci*) (Kühn) Groves & Skolko inokuliert. Der Infektionsverlauf wurde vor der Infektion (0) und 3, 7 und 9 Tage nach der Inokulation (dai) erfasst. Es wurden jeweils vier ausgewachsene Blätter von 10 Klompflanzen der Linien 35 (#20L35: Dau c 1.01-supprimiert) und 10 (#12L10: Dau c 1.02-supprimiert) sowie vier Wildtyp-Blätter von 10 aus der *in vitro*-Kultur stammender Klompflanzen (WTg) und Blätter aus Samen erzeugter Wildtyp-Pflanzen (WTs) eingesetzt.

Vor der Inokulation waren alle Blätter in nahezu gleichem Zustand (Abb. 3.20 (0)). Bereits 3 dai war zu sehen, dass die Blätter der Wildtyp-Möhren aus Samen (WTs) etwas resistenter gegen den *A. dauci*-Infektion waren als die Blätter der aus *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen (Abb. 3.20, 3 dai). Dies wurde 7 dai noch deutlicher. Alle Blätter der aus *in vitro*-Kultur stammender Pflanzen zeigten etwa die gleiche Infektionsintensität. Nur die Blätter der aus Samen stammender Möhren waren widerstandsfähiger gegen die *A. dauci*-Infektion (Abb. 3.20, 7 dai). 9 dai zeigten die Blätter der aus Samen stammenden Pflanzen eine deutlich niedrigere Infektionsintensität als die Blätter der aus *in vitro*-Kultur stammenden Wildtyp- und transgenen Pflanzen (Abb. 3.20, 9 dai). Bei diesem Messpunkt ergab die Varianzanalyse (ANOVA) signifikante Unterschiede. Im Tukey-Test gab es keine

signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und transgenen Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur. Signifikante Unterschiede ließen sich nur zwischen den Blättern der Pflanzen aus Samen (WTs) und den Blättern der Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur (WTg, #20L35 und #12L10) feststellen.

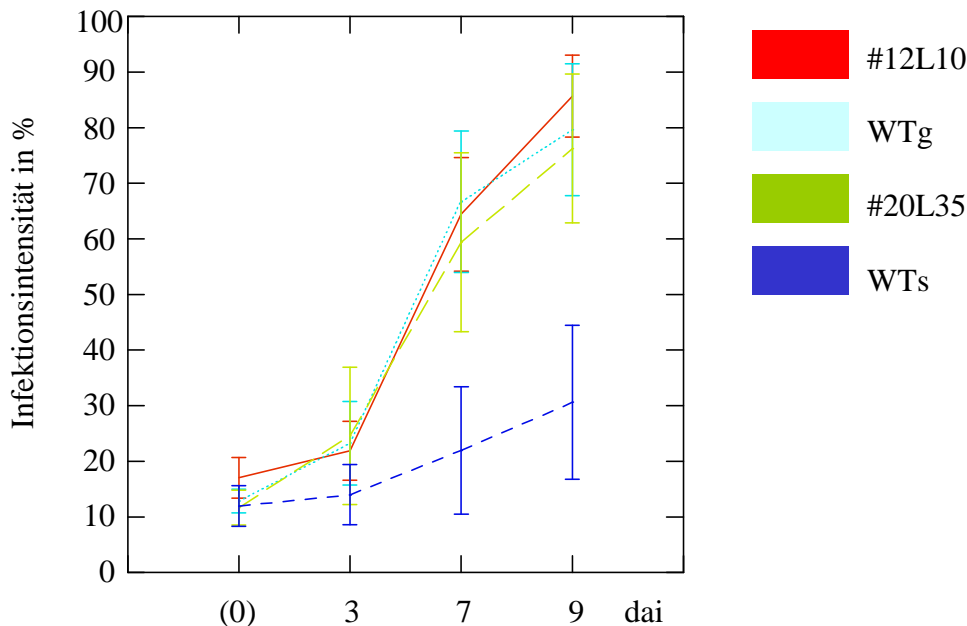


Abb.3.20: Resistenzanalyse der Blätter nach Inokulation mit *Alternaria dauci*. Der *A. dauci*-Infektionsverlauf auf den Möhrenblätter der transgenen Linien 35 (Dau c 1.01 ↓) und 10 (Dau c 1.02 ↓) und der Wildtyp-Möhrenblätter der aus *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen (WTg) und aus Samen (WTs) stammenden Pflanzen wurden mittels DIAS (Digitales Analyse System) der Fa. LemnaTec erfasst. Der Zustand der Blätter wurde vor der Inokulation (0) und 3, 7 und 9 Tage nach der Inokulation (dai) aufgezeichnet. ↓: Suppression; #20: Dau c 1.01-unterdrückt; #12: Dau c 1.02-unterdrückt.

3.5.2 RESISTENZANALYSE DER MÖHRENPETIOLEN

Für die Resistenzanalyse der Möhrenpetiolen wurden die pilzlichen Pflanzenpathogene *Alternaria radicina* (*A. radicina*) Meier, Drechsler & Eddy und *Botrytis cinerea* (de Bary) Whetzel (*B. cinerea*) eingesetzt. Jeweils 4 Petiolen jeder Pflanze wurden analysiert.

Bis zu 7 Tage nach der *A. radicina*-Inokulation (dai) gab es keine großen Unterschiede in der Infektionsintensität zwischen den transgenen und Wildtyp-Petiolen (Abb. 3.21 A). Nur die Wildtyp-Petiolen aus den aus Samen stammenden Pflanzen zeigten eine leicht verminderte Infektion. 9 dai war ein Unterschied zwischen den Petiolen aus den *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen und den Petiolen der aus Samen stammenden Pflanzen zu erkennen (Abb. 3.21 A, 9 dai). Dieser Unterschied war nach der Varianzanalyse (ANOVA) auch signifikant.

4 Tage nach der *B. cinerea*-Inokulation gab es keine erkennbaren Unterschiede in der Infektionsintensität zwischen den geprüften Petiolen (Abb. 3.21 B). Die ersten Unterschiede waren 7 dai erkennbar (Abb. 3.21 B 7 dai). Die Petiolen der transgenen Linie 10 (Dau c 1.02-supprimiert) zeigten die stärkste und die Wildtyp-Petiolen der aus Samen stammenden Pflanzen zeigen die schwächste Infektion. Der Unterschied zwischen diesen beiden Petiolen war 9 dai noch deutlicher zu erkennen (Abb. 3.21 B, 9 dai). Die Petiolen der Wildtyp-Möhren aus der *in vitro*-Kultur waren nahezu gleich stark wie die Petiolen der Linie 10 infiziert. Etwa 20 % niedrigere Infektionsintensität war bei den Petiolen der Linie 35 (Dau c 1.01-unterdrückt) und etwa 30 % niedrigeren Infektionsintensität war bei den Petiolen der aus Samen stammenden Pflanzen im Vergleich zu den Petiolen der Linie 10 zu sehen. Die ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den aus *in vitro*-Kultur stammenden und den aus Samen stammenden Petiolen.

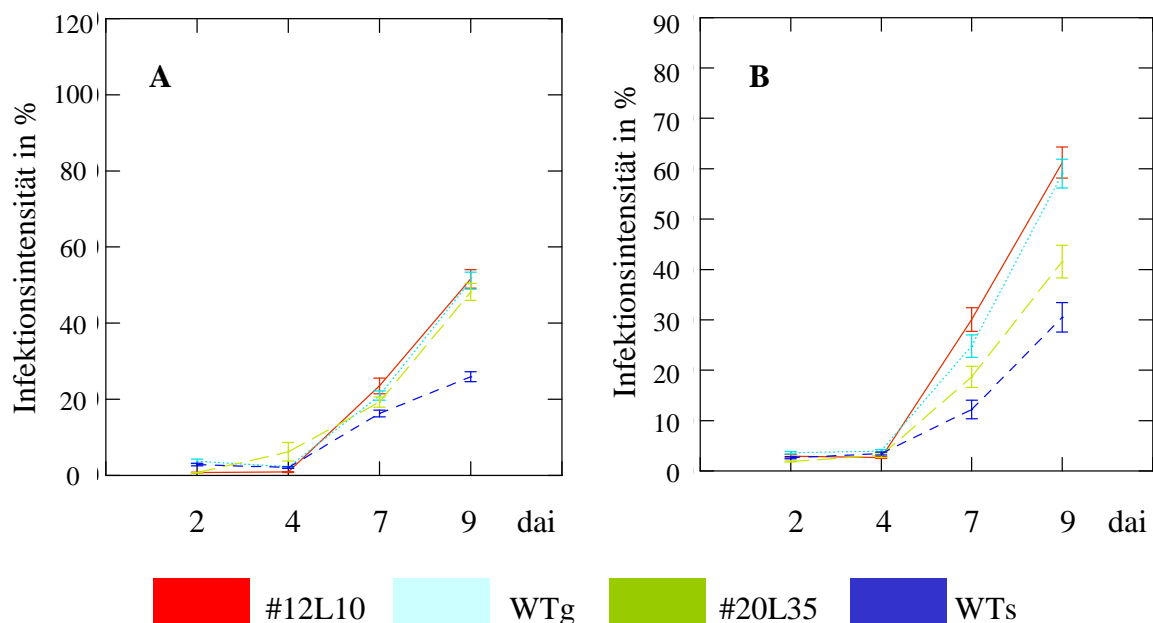


Abb.3.21: Resistenzanalyse der Petiolen nach Inokulation mit *Alternaria radicina* oder mit *Botrytis cinerea*. Der *A. radicina* (A) und der *B. cinerea*-Infektionsverlauf (B) auf den Möhrenpetiolen der transgenen Linien 35 (Dau c 1.01 ↓) und 10 (Dau c 1.02 ↓) und der Wildtyp-Möhrenpetiolen der aus *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen (WTg) und aus Samen (WTs) stammenden Pflanzen wurde mittels DIAS (Digitales Analyse System) der Fa. LemnaTec erfasst. Der Zustand der Blätter wurde 2, 4, 7 und 9 Tage nach der Inokulation (dai) aufgezeichnet. ↓: Suppression; #20: Dau c 1.01-unterdrückt; #12: Dau c 1.02-unterdrückt.

3.5.3 RESISTENZANALYSE DER MÖHRENWURZELN

Für die Resistenzanalysen der Möhrenwurzelscheiben wurden die gleichen pilzlichen Pflanzenpathogene *Alternaria radicina* (*A. radicina*) und *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) eingesetzt wie zur Analyse der Petiolen. Es wurden 4 Möhrenwurzelscheiben jeder Pflanze analysiert.

Der Zustand der Wurzelscheiben vor der Inokulation mit der *A. radicina*-Sporensuspension war etwa gleich (Abb. 3.22 A, (0)). 3 dai war die Infektionsintensität der Wurzelscheiben leicht angestiegen, aber es gab keine Unterscheide zwischen den transgenen- und den Wildtyp-Wurzelscheiben (Abb. 3.22 A 3 dai). 6 dai waren die Wildtyp-Wurzelscheiben der aus Samen stammenden Pflanzen stärker befallen als die aus *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen (Abb. 3.22 A, 6 dai). Dieses Befallsverhältnis bleibt auch 9 Tage nach der Inokulation gleich. 13 dai gab es nur geringfügige Unterschiede zwischen den analysierten Wurzelscheiben (Abb. 3.22 A 13 dai). Alle Wurzelscheiben zeigten etwa die gleiche Infektionsintensität zwischen 60 und 65% der Oberfläche auf. Bei diesem Messpunkt zeigte die Varianzanalyse (ANOVA) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wurzelscheiben auf.

3 und 6 Tage nach der *B. cinerea*-Inokulation waren die eingesetzten Wurzelscheiben alle gleich stark befallen (Abb. 3.22 B, 3 und 6 dai). 9 dai zeigten die Wildtyp-Wurzelscheiben der aus Samen stammenden Pflanzen eine geringere Infektionsintensität als Wurzelscheiben der aus *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen (Abb. 3.22 B 9 dai). Hierbei waren die Wildtyp-Wurzelscheiben der aus *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen am stärksten infiziert. Die Wurzelscheiben der transgenen Linien 35 (Dau c 1.01-supprimiert) und 10 (Dau c 1.02-supprimiert) hatten etwa die gleiche Infektionsintensität, diese lag zwischen der der beiden Wildtyp-Wurzelscheiben. 13 dai zeigten die Wurzelscheiben der aus Samen stammenden Pflanzen die höchste Resistenz gegen *B. cinerea* (Abb. 3.22 B 13 dai). Nur etwa 15% der Wurzelscheibenoberfläche war befallen. Die Wurzelscheiben der Linie 10 (Dau c 1.02-supprimiert) war zu ~26% befallen, die Wurzelscheiben der Linie 35 (Dau c 1.01-supprimiert) und die der aus *in vitro*-Kultur stammenden Wildtyp-Möhrenwurzelscheiben zeigten die stärkste Infektionsintensität mit etwa 35%. Die ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Infektionsintensität der Wurzelscheiben der aus *in vitro*-Kultur stammenden und den aus Samen stammenden Pflanzen an.

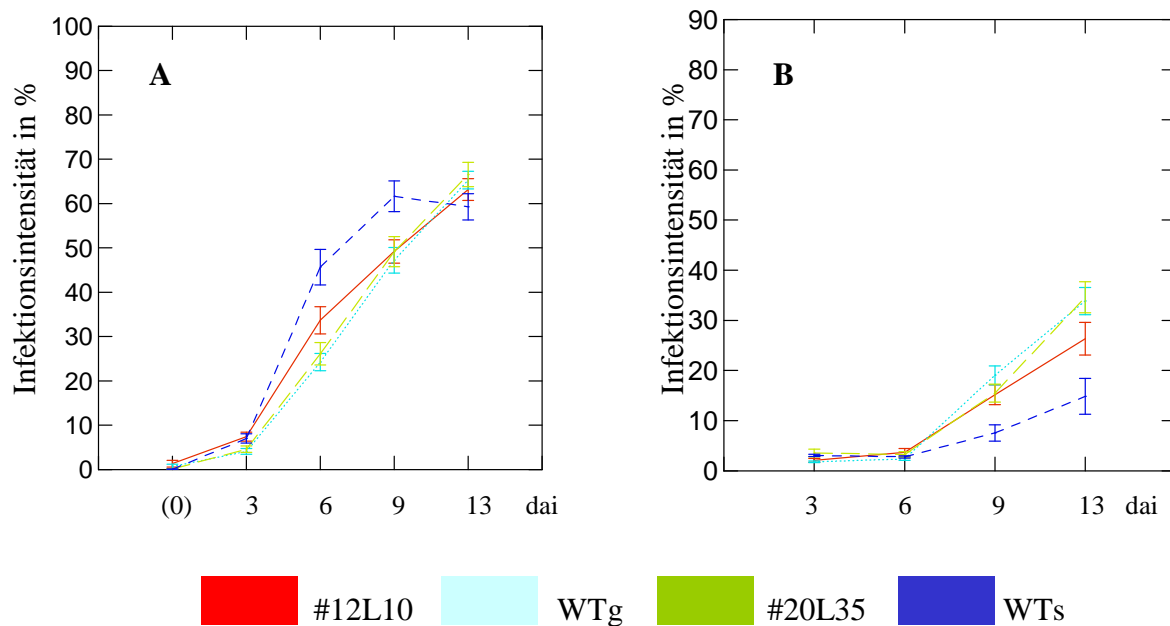


Abb.3.22: Resistenzanalyse der Wurzelscheiben nach Inokulation mit *Alternaria radicina* und *Botrytis cinerea*. Der *A. radicina* (A) und der *B. cinerea*-Infektionsverlauf (B) auf den Möhrenwurzelscheiben der transgenen Linien 35 (Dau c 1.01 ↓) und 10 (Dau c 1.02 ↓) und der Wildtyp-Möhrenwurzelscheiben der aus *in vitro*-Kultur (WTg) und aus Samen (WTs) stammenden Pflanzen wurden mittels DIAS (Digitales Analyse System) der Fa. LemnaTec erfasst. Der Zustand der Wurzelscheiben wurde 3, 6, 9 und 13 Tage nach der Inokulation (dai) aufgezeichnet. ↓: Suppression; #20: Dau c 1.01-unterdrückt; #12: Dau c 1.02-unterdrückt.

3.6 SALIZYLSÄURE-ANALYSEN AN MÖHRENBLÄTTERN

Um die Transkriptionsinduktion der *Dau c 1*-Isoformen in den Dau c 1.01- und Dau c 1.02-unterdrückten Linien zu überprüfen wurden Blätter der Linien 35 (Dau c 1.01-supprimiert) und 10 (Dau c 1.02-supprimiert) sowie die Blätter von Wildtyp-Pflanzen mit 1 mM Salizylsäurelösung besprüht. Salizylsäure (SA) induziert die PR10-Transkription (Liu et al. 2006; Xie et al. 2010). Für diese Analyse wurden 10 Wildtyp-Pflanzen und 10 Pflanzen der Linie 10 und 8 Pflanzen der Linie 35 eingesetzt. Bei allen verwendeten Pflanzen handelt es sich um aus *in vitro*-Kultur in Erde überführte Klonpflanzen. Es wurden 4 Blätter jeder Pflanze für diese Analyse verwendet. Die Blätter der Hälfte der Pflanzen wurden mit der Salizylsäurelösung besprüht und die Blätter der anderen Hälfte der Pflanzen wurden als Kontrolle mit H₂O besprüht. Von jeder Pflanze wurde ein Blatt für die Analysen der relativen Expression von *Dau c 1.01*, *Dau c 1.02*, *DcPRPlike1* und *PR3*-Genen 0, 9, 24 und 24 Stunden nach der Besprühung geerntet und für die Quantifizierung mit quantitativer Real-Time PCR (qPCR) vorbereitet und quantifiziert. Die Blätter einer Linie gleichen Messpunkts und einer Behandlung wurden zusammengelegt, so dass die Messwerte den Durchschnittswert der fünf bzw. vier Blätter wiedergeben. Diese Messzeitpunkte unterschieden sich von denen der Resistenzanalysen (vgl. Kapitel 3.4.2). Die Pflanzen befanden sich im Gewächshaus mit

bestimmtem Tag/Nacht-Zyklus. Um bei Licht die Proben nehmen zu können, wurden die Messzeitpunkte so wie vorher beschrieben gewählt.

3.6.1 RELATIVE EXPRESSION DES *DAU C 1.01*-GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG

Der relative *Dau c 1.01*-Expressionslevel war deutlich niedriger in Blättern als in den Wurzeln (vgl. Abb. 3.16). Am Beginn der Analyse lag die relative Expression des *Dau c 1.01* in den H₂O-behandelten Kontrollblättern sowie in den SA-besprühten Blättern der Linien 35 (*Dau c 1.01*-unterdrückt) und 10 (*Dau c 1.02*-unterdrückt) niedriger als in den Wildtyp-Blättern (Abb. 3.23). In den H₂O-behandelten Wildtyp-Kontrollblättern war die relative Expression von *Dau c 1.01* am höchsten (Abb. 3.23, 0 hat). In allen SA-behandelten Blättern lag der relative Expressionslevel des *Dau c 1.01* 9 Stunden nach der Besprühung (hat) leicht höher als in den Kontrollblättern. In den SA-besprühten Blättern der Wildtyp-Pflanzen und der Pflanzen der Linie 10 war die relative Expression des *Dau c 1.01* 24 hat deutlich höher als in den Kontrollblättern, die mit H₂O behandelt wurden (Abb. 3.23 A und C, 24 hat). Hierbei war die relative Expression von *Dau c 1.01* in den SA-behandelten Wildtyp-Blättern am höchsten. In den Blättern der Linie 35 war keine deutliche Änderung zu den gemessenen Anfangswerten zu diesem Zeitpunkt sichtbar. 48 hat zeigten die SA-behandelten Blätter des Wildtyps und der Linie 10 weiterhin eine deutlich höhere relative *Dau c 1.01*-Expression als die Kontrollblätter (Abb. 3.23 A und C 48 hat). Der relative *Dau c 1.01*-Expressionslevel war auch in den Kontrollblättern im Vergleich mit den Werten des vorherigen Messpunktes angestiegen. In den Blättern der Linie 35 war auch eine Erhöhung des relativen *Dau c 1.01*-Expressionslevels festzustellen, dies bezog sich jedoch auf die H₂O-behandelten Kontrollblätter.

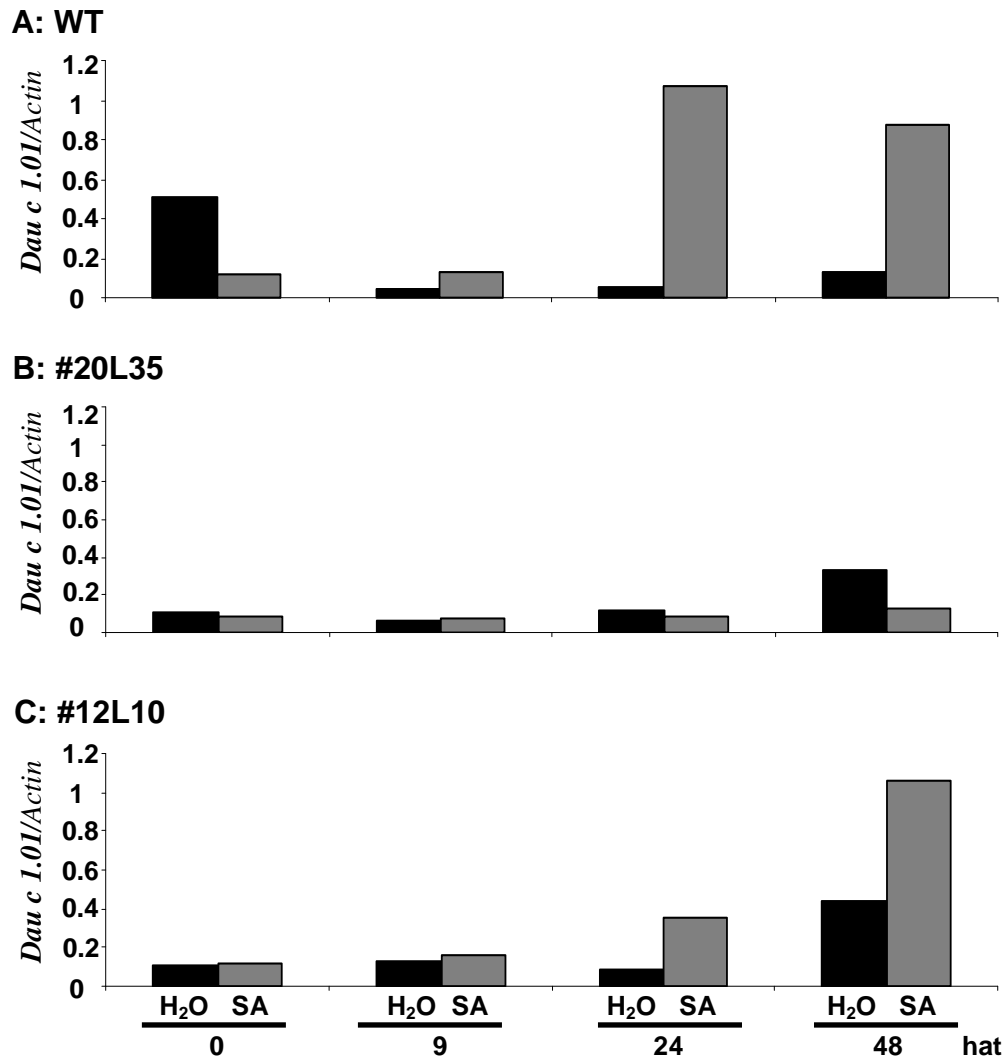


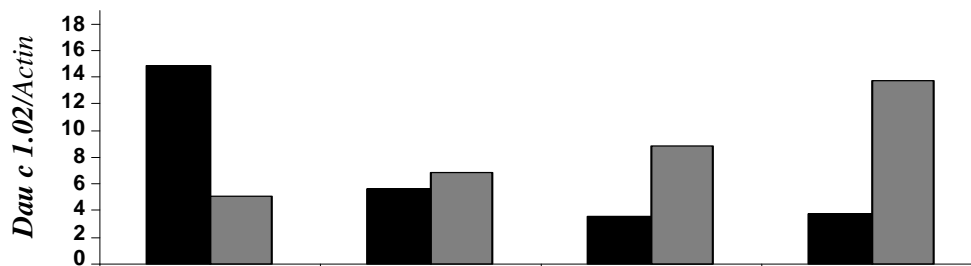
Abb. 3.23: Transkriptionskinetik des *Dau c 1.01*-Gens nach Besprühung der Blätter mit Salizylsäure. Die relative Expression des *Dau c 1.01*-Gens wurde 0, 9, 24 und 48 Stunden nach Besprühung mit SA oder H₂O in Möhrenblättern von Wildtyp-Möhren sowie den Linien 35 (*Dau c 1.01*↓) und 10 (*Dau c 1.02*↓) mit quantitativer Real-Time PCR ermittelt. Die H₂O-besprühten Blätter dienten als Kontrolle. ↓: Suppression; #20: *Dau c 1.01*-supprimiert; #12: *Dau c 1.02*-supprimiert, WT: Wildtyp.

3.6.2 RELATIVE EXPRESSION DES *DAU C 1.02*-GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG

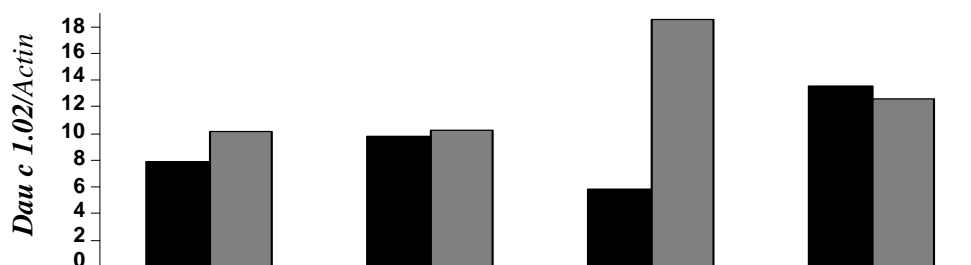
Der relative *Dau c 1.02*-Expressionslevel war in den Blättern deutlich niedriger als in den Wurzeln (vgl. Abb. 3.17), aber höher als die *Dau c 1.01*-Expression in den Blättern (vgl. Abb. 3.23). Am Anfang der Transkriptionsanalyse von *Dau c 1.02* war in den Blättern des Wildtyps und der Linie 35 (*Dau c 1.01*-supprimiert) der relative *Dau c 1.02*-Expressionslevel deutlich höher als in den Blättern der Linie 10 (*Dau c 1.02*-supprimiert). In den H₂O-behandelten Wildtyp-Blättern war die relative *Dau c 1.02*-Expression am höchsten (Abb. 3.24, 0 hat). 9 hat zeigten die SA-behandelten Blätter der Wildtyp-Möhren und der Linie 35 die höchste relative Expression von *Dau c 1.02*, während die relative *Dau c 1.02*-Expression in den Blättern der Linie 10 unverändert blieb (Abb. 3.24, 9 hat). Ab diesem Zeitpunkt blieb

die relative *Dau c 1.02*-Expression in den SA-behandelten Wildtyp-Blättern stets höher als die in den H₂O-behandelten Wildtyp-Kontrollblättern. 24 hat war in den SA-besprühten Blättern der Linie 35 ein deutlich höheres relatives Expressionslevel von *Dau c 1.02* nachzuweisen als in den Kontrollblättern (Abb. 3.24 B, 24 hat). Dies änderte sich 48 Stunden nach der SA-Besprühung. Hier war der relative Expressionslevel in den Kontrollblättern über den Wert der SA-besprühten Blättern gestiegen (Abb. 3.24 B, 48 hat). Der relative *Dau c 1.02*-Expressionslevel der Blätter der Linie 10 änderte sich während der gesamten Messzeit nur wenig. 48 hat konnte in den SA-behandelten Blättern ein etwas höherer relativer *Dau c 1.02*-Expressionslevel gemessen werden als in den Kontrollblättern (Abb. 3.24 C). Der relative *Dau c 1.02*-Expressionslevel dieser Blätter war über den gesamten Messzeitraum deutlich niedriger als in den Blättern der Linie 39 und des Wildtyps.

A: WT



B: #20L35



C: #12L10

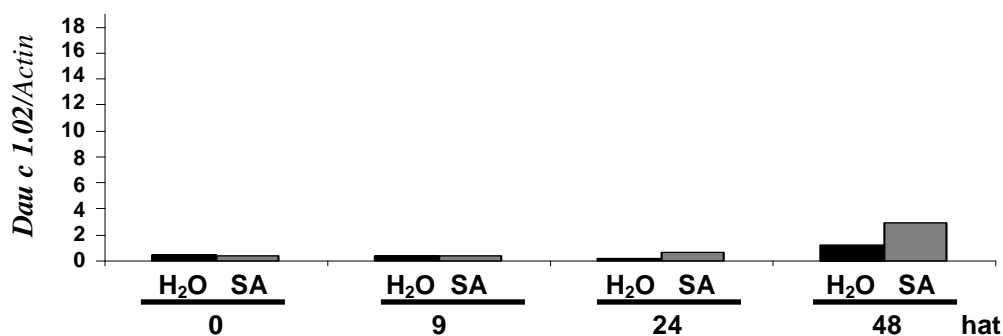


Abb. 3.24: Transkriptionskinetik des *Dau c 1.02*-Gens nach Besprühung der Blätter mit Salizylsäurelösung. Die relative Expression des *Dau c 1.02*-Gens wurde 0, 9, 24 und 48 Stunden nach der Besprühung mit SA oder H₂O in Möhrenblättern von Wildtyp-Möhren sowie in den Linien 35 (*Dau c 1.01*↓) und 10 (*Dau c 1.02*↓) mit quantitativer Real-Time PCR ermittelt. Die H₂O-besprühten Blätter dienten als Kontrolle. ↓: Suppression; #20: *Dau c 1.01*-supprimiert; #12: *Dau c 1.02*-supprimiert, WT: Wildtyp.

3.6.3 RELATIVE EXPRESSION DES *DcPRPLIKE1*-GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG

Die relative Expression des *DcPRlike1*-Gens war in den Blättern deutlich höher als die relative Expression von *Dau c 1.01* oder von *Dau c 1.02* (Abb. 3.25; vgl. Abb.3.23 und 3.24). Die relative *DcPRlike1*-Expression in den Blättern war niedriger als in den Wurzeln (vgl. Abb. 3.18). Es gab in der relativen *DcPRlike1*-Expression keine deutliche Erhöhung über die Zeit. Am Anfang der Transkriptionsanalyse von *DcPRlike1* nach der SA-Behandlung lag die relative *DcPRlike1*-Expression in allen Proben etwa in der gleichen Höhe (Abb. 3.25, 0 hat). Nur in den SA-besprühten Blättern der Linie 35 (*Dau c 1.01*-supprimiert) war die relative *DcPRlike1*-Expression höher als in den Kontrollblättern (Abb. 3.25 B, 0 hat). In diesen SA-behandelten Blättern gab es keine Veränderung in der relativen *DcPRlike1*-Expression 9 und 24 Stunden nach der Behandlung. Nur die relative *DcPRlike1*-Expression sank in den Kontrollblättern (Abb. 3.25 B, 9 und 24 hat). In dieser Zeitspanne gab es in den Wildtyp-Blättern auch keine großen Veränderungen. Der relative *DcPRlike1*-Expressionslevel blieb etwa in der gleichen Höhe (Abb. 3.25 A, 9 und 24 hat). In den SA-behandelten Blättern der Linie 10 (*Dau c 1.02*-supprimiert) stieg die relative *DcPRlike1*-Expression deutlich 9 hat an (Abb. 3.25 C, 9 hat). Hierbei blieb die relative *DcPRlike1*-Expression der Kontrollblätter unverändert. 24 hat sank die relative *DcPRlike1*-Expression in beiden behandelten und unbehandelten Blättern dieser Linie. Der relative *DcPRlike1*-Expressionslevel lag weiterhin in den SA-behandelten Blättern höher als in ihren H₂O-behandelten Kontrollblättern (Abb. 3.25 C, 24 hat). 48 hat war die relative *DcPRlike1*-Expression nur in den SA-behandelten Blättern des Wildtyps höher als in dessen Kontrollblättern. In den SA-behandelten Blättern der Linie 35 nahm die relative *DcPRlike1*-Expression stark ab, in den zugehörigen Kontrollblättern stieg die relative *DcPRlike1*-Expression an. Bei diesem Messzeitpunkt stieg die relative *DcPRlike1*-Expression in den behandelten und unbehandelten Blättern der Linie 10 an. Allerdings war die Steigung in den Kontrollblättern höher (Abb. 3.25, 48 hat).

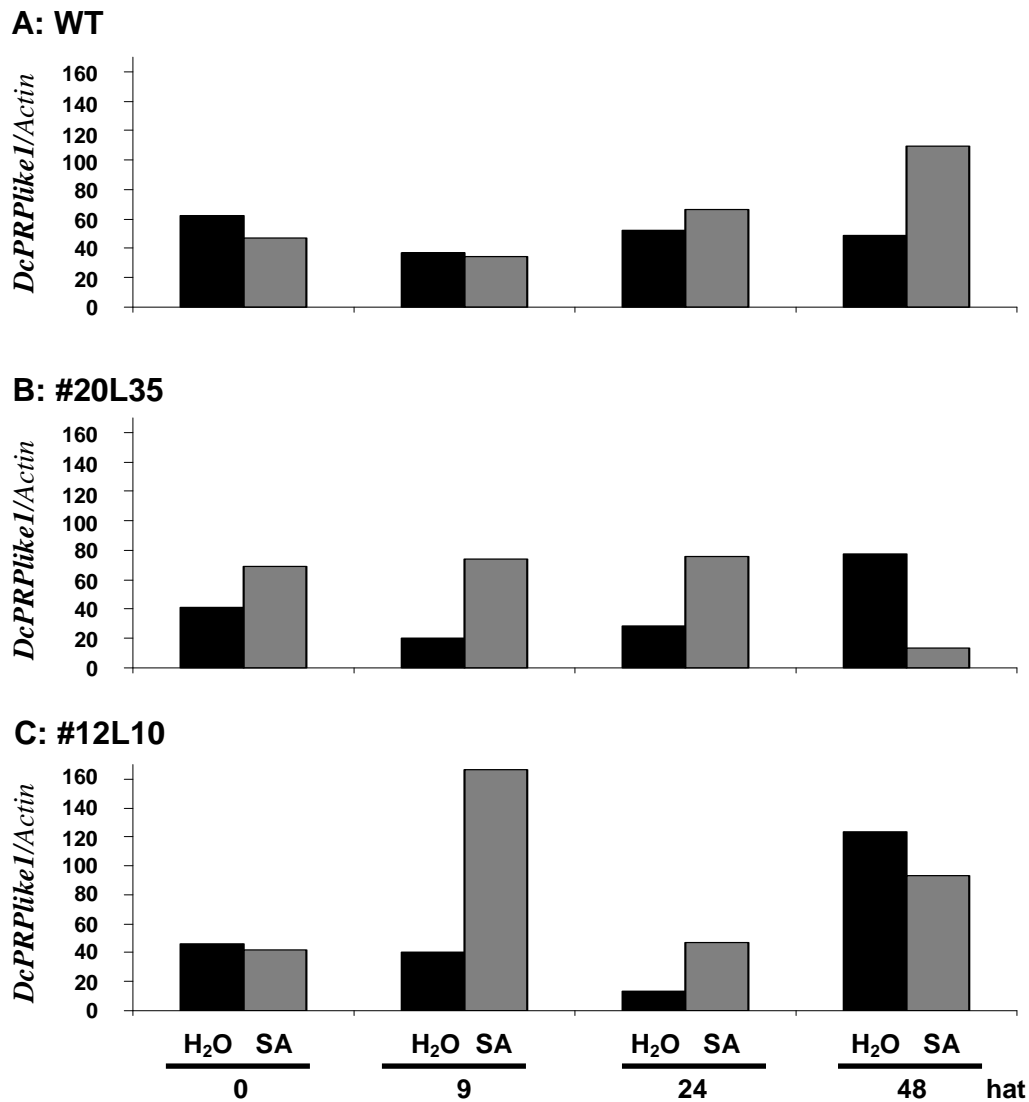


Abb. 3.25: Transkriptionskinetik des *DcPRPlike1*-Gens nach Besprühung der Blätter mit Salizylsäurelösung. Die relative Expression des *DcPRPlike1*-Gens wurde 0, 9, 24 und 48 Stunden nach der SA- oder H₂O- Besprühung (hat) der Möhrenblätter von Wildtyp-Möhren sowie in den Linien 35 (Dau c 1.01↓) und 10 (Dau c 1.02↓) mit quantitativer Real-Time PCR ermittelt. Die H₂O-besprühten Blätter dienten als Kontrolle. ↓: Suppression; #20: Dau c 1.01-supprimiert; #12: Dau c 1.02-supprimiert, WT: Wildtyp.

3.6.4 RELATIVE EXPRESSION DES *PR3*-GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG

Die relative Expression von *PR3* in den Blättern war höher als in den Wurzeln (Abb. 3.26, vgl. Abb. 3.19). Sie war etwas niedriger als die relative *DcPRPlike1*-Expression in den Blättern (vgl. Abb. 3.25) und höher als die relative *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-Expression in den Blättern (vgl. Abb. 3.23 und 3.24). In den Wildtyp-Blättern blieb die relative *PR3*-Expression über die gesamte Analysezeit relativ unverändert (Abb. 3.26 A). Es war keine Induktion des *PR3*-Gens durch die SA-Behandlung festzustellen. In den Blättern der Linien 35 (*Dau c 1.01*-unterdrückt) und 10 (*Dau c 1.02*-unterdrückt) gab es dagegen eine *PR3*-Induzierung nach der SA-Behandlung. In den SA-behandelten Blättern beider Linien stieg die relative *PR3*-Expression 9 Stunden nach der SA-Behandlung an (Abb. 3.26 B und C, 9 hat) und war höher als in deren Kontrollblättern. Die relative *PR3*-Expression blieb auch 24 hat in den SA-behandelten Blättern höher als in deren Kontrollblättern. Der relative *PR3*-Expressionslevel stieg in den SA-behandelten Blättern der Linie 35 an, während der relative *PR3*-Expressionslevel in den SA-behandelten Blättern der Linie 10 absank (Abb. 3.26 B und C, 24 hat). 48 hat sank die relative *PR3*-Expression in den SA-behandelten Blättern der Linie 35 deutlich unterhalb des relativen *PR3*-Expressionslevels der Kontrollblätter ab. Gleichzeitig stieg die relative *PR3*-Expression in deren Kontrollblättern an (Abb. 3.26 B und C, 48 hat). In den SA-behandelten und nicht-behandelten Blättern der Linie 10 stieg die relative *PR3*-Expression 48 Stunden nach der SA-Besprühung an. Der relative *PR3*-Expressionslevel lag in den SA-behandelten Blättern etwas höher als in dessen Kontrollblättern (Abb. 3.26 C, 48 hat).

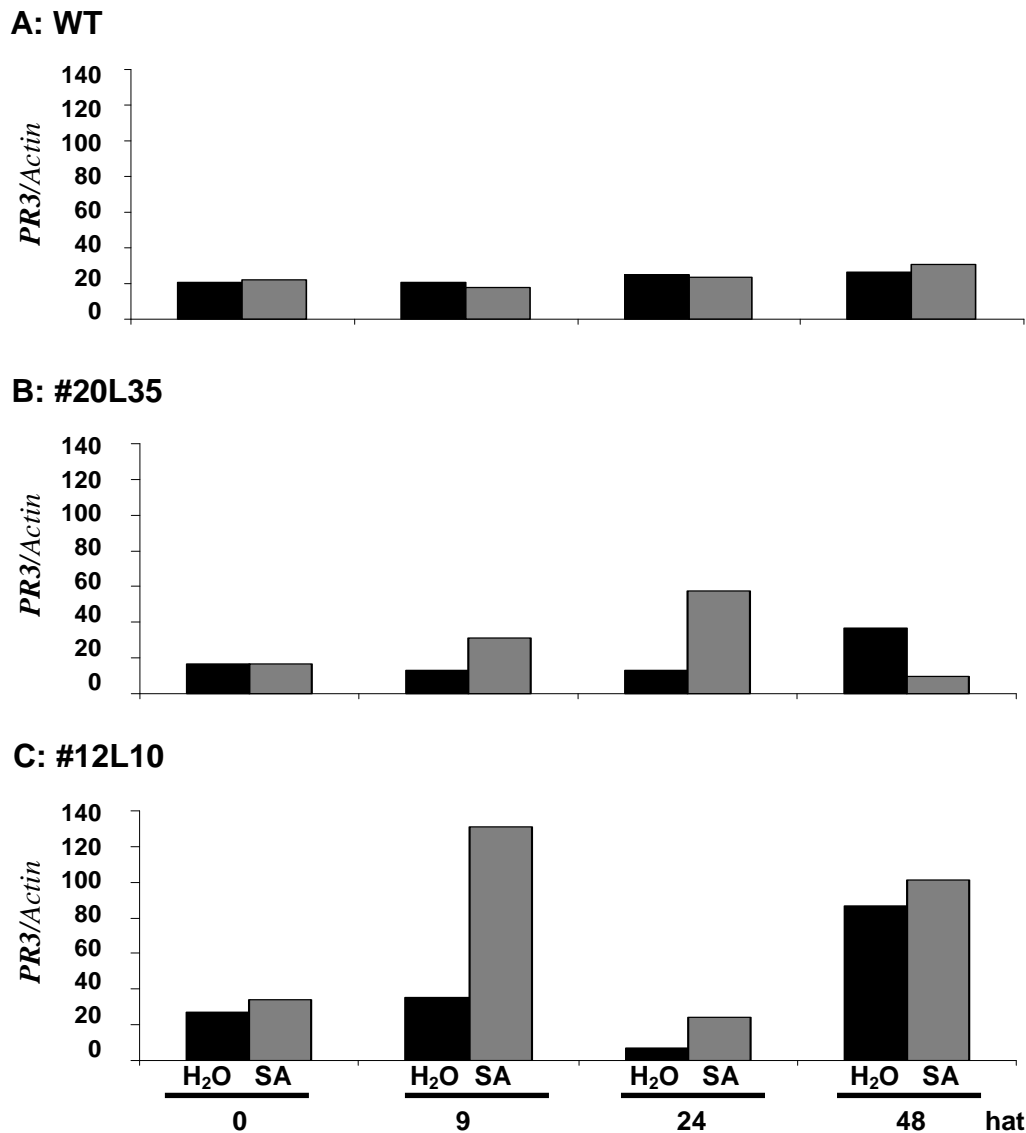


Abb. 3.26: Transkriptionskinetik des *PR3*-Gens nach Besprühung der Blätter mit Salizylsäurelösung. Die relative Expression des *PR3*-Gens wurde 0, 9, 24 und 48 Stunden nach der-Besprühung mit SA oder H₂O (hat) in Möhrenblättern von Wildtyp-Möhren sowie in den Linien 35 (Dau c 1.01↓) und 10 (Dau c 1.02↓) mit quantitativer Real-Time PCR ermittelt. Die H₂O-besprühten Blätter dienten als Kontrolle. ↓: Suppression; #20: Dau c 1.01-supprimiert; #12: Dau c 1.02-supprimiert, WT:Wildtyp.

3.7 SKIN-PRICK-TESTS AN PATIENTEN MIT MÖHRENALLERGIE

Die hypoallergenen Möhren wurden von der Kooperationspartnerin Professorin Vera Mahler an Patienten mit Möhrenallergie in der Hautklinik des Universitätsklinikums Erlangen getestet. Bei dem Patiententest handelte es sich um einen Hauttest, dem sog. Skin-Prick-Tests. Hierbei wurde die Hautoberfläche leicht mit einer möhrenhaltigen Spitze auf der Unterseite des Unterarms geritzt. Der Durchmesser der Hautreaktion wurde gemessen und mit den Durchmessern der Positivkontrolle (Histamin) und der Wildtyp-Möhren verglichen (Peters et al., eingereicht).

Bei einem getesteten Patienten mit einer Möhrenallergie gegen die Dau c 1.02-Isoform konnte eine reduzierte allergische Reaktion beim Hautkontakt mit den Dau c 1.02-

supprimierten Möhren (#12L10 und L33) festgestellt werden (Abb. 3.27). Da er nur gegen die Dau c 1.02-Isoform allergisch ist, reagierte er auf die Dau c 1.01-supprimierten Möhren (#20L35 und L39) zum Teil mehr als auf die Dau c-1.02-supprimierten Möhren. Es gab Unterschiede in der Hautreaktionsstärke zwischen den Klonen einer Linie. Es gab kaum eine Reaktion auf die #12L33-1 Möhre (die 1 gibt die Klonnummer wieder), aber auf den Klon dieser Pflanze, #12L33-3 reagierte die Haut des Patienten mehr (Abb. 3.27). Es gab auch eine verminderte allergische Reaktion auf einzelne Dau c 1.01-supprimierte Möhrenklone (#20). So eine verminderte Reaktion gab es u.a. gegen die #20L35-2 (Klon 2) und #20L39-1 (Klon 1).

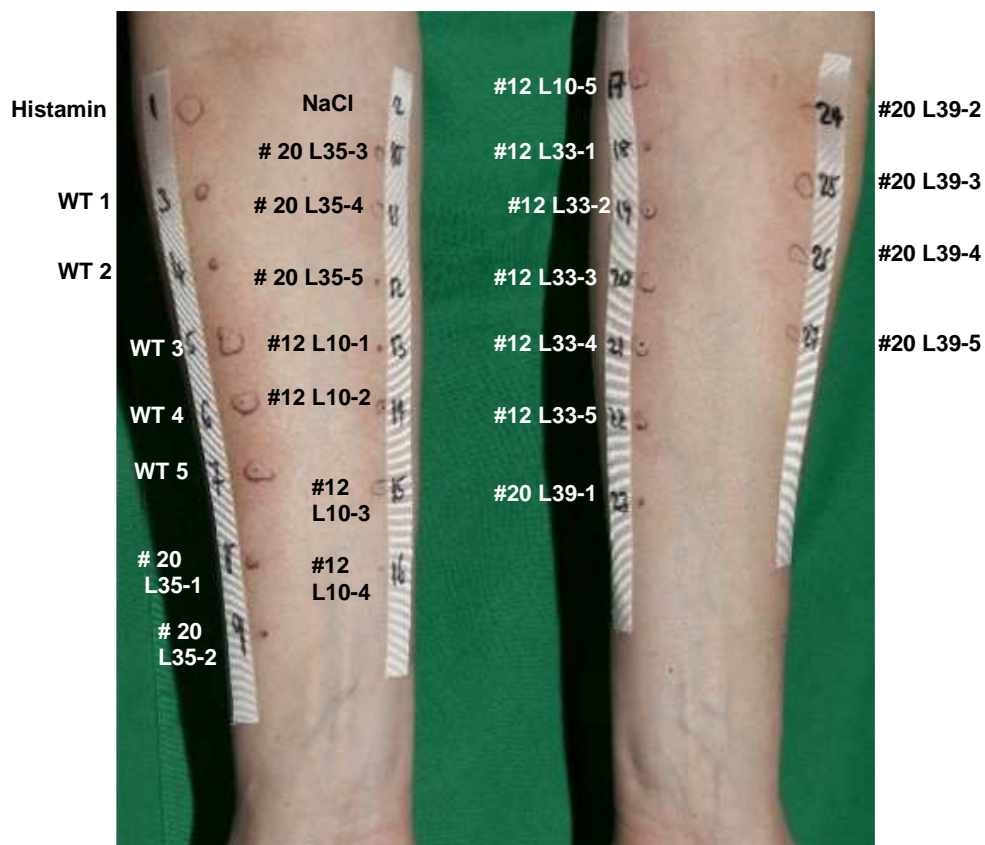


Abb. 3.27: Skin-Prick-Test an einem Patient mit einer Allergie gegen die Dau c 1.02-Isoform. Der Patient zeigt eine allergische Hautreaktion (mit dunklen Umkreisung gekennzeichnet) auf die Wildtyp-Möhren und eine reduzierte Hautreaktion auf die hypoallergenen Möhren. Histamin: Positivkontrolle; NaCl: Negativkontrolle; #20: Dau c 1.01-supprimiert; #12: Dau c 1.02-supprimiert.

Bei einem anderen Patienten mit einer Möhrenallergie gegen beide Dau c 1-Isoformen konnte keine reduzierte allergische Reaktion beim Hautkontakt mit den Dau c 1.01-supprimierten Möhren oder den Dau c 1.02-supprimierten Möhren festgestellt werden (Abb. 3.28). Dieser Patient reagierte auf alle getesteten Möhren etwa gleich stark.

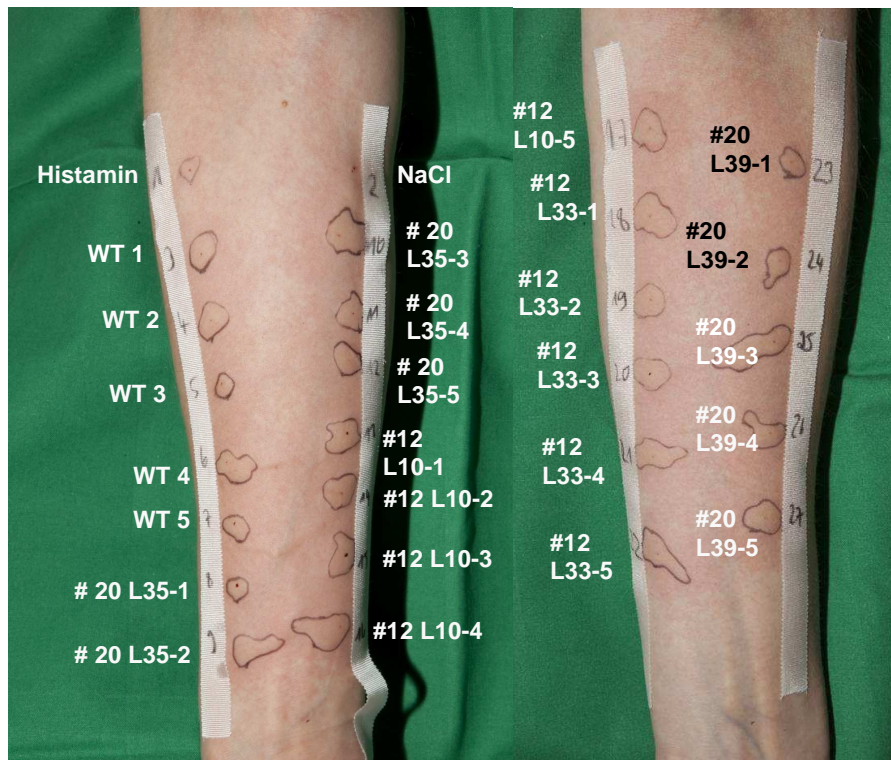


Abb.3.28: Skin-Prick-Test an einem Patienten mit einer Allergie gegen beide Dau c 1-Isoformen. Der Patient zeigte eine allergische Hautreaktion (mit dunklen Umkreisung gekennzeichnet) auf alle eingesetzten Möhren. Histamin: Positivkontrolle; NaCl: Negativkontrolle; #20: Dau c 1.01-supprimiert; #12: Dau c 1.02-supprimiert.

3.8 IgE-REAKTIVITÄTSANALYSE

Um den Suppressionserfolg der hypoallergen Möhren zu bestätigen, wurden IgE-Reaktivitätsanalysen durchgeführt (Peters et al. eingereicht). Hierbei wurde festgestellt, wie viel Dau c 1.01- oder Dau c 1.02-Protein in den hypoallergen Möhrenwurzelextrakten anhand der IgE-Reaktionen der Möhrenallergikerseren vorhanden war. Die Immunoblots sind in der Abbildung 3.29 zu sehen. Nur ein Patient war monosensibilisiert auf die Dau c 1.02-Isoform (Abb. 3.29, Spalte 1). Alle weiteren Patienten waren auf beide Dau c 1-Isoformen sensibilisiert (Abb. 3.29, Spalten 2-10). Es wurde die IgE-Reaktion der Patientenseren gegen die Wildtyp-Möhrenproteinextrakte untersucht. Alle Patientenseren, mit Ausnahme des monosensibilisierte Patienten, zeigten eine IgE-Bindungsreaktion an das Dau c 1 bei ~16 kDa (Abb. 3.29 A). Zudem war eine IgE-Bindung von 7 Patientenseren an ein unbekanntes hochmolekulares Protein bei ~64 kDa zu sehen (Spalten 2, 3, 4, 6, 7, 9 und 10). Das Serum von zwei Patienten zeigte eine IgE-Bindungsreaktion an das Dau c 1 im Möhrenproteinextrakt aus der Dau c 1.01-supprimierten Linie 39 (Abb. 3.29 B). Beide Patienten waren gegen beide Dau c 1-Isoformen sensibilisiert (Spalten 2 und 9). Auch hier war eine IgE-Bindung von 7 Patientenseren an ein unbekanntes hochmolekulares Protein bei ~64 kDa zu sehen (Spalten 2, 3, 4, 6, 7, 9 und 10). Das Serum von neun Patienten zeigte eine

IgE-Bindungsreaktion an das Dau c 1 im Möhrenproteinextrakt aus der Dau c 1.02-supprimierten Linie 33 (Abb. 3.29 C). Alle diese Patienten waren gegen beide Dau c 1-Isoformen sensibilisiert (Spalten 2-10). Auch hier war eine IgE-Bindung von 7 Patientenseren an ein unbekanntes hochmolekulares Protein bei ~64 kDa zu sehen (Spalten 2, 3, 4, 6, 7, 9 und 10).

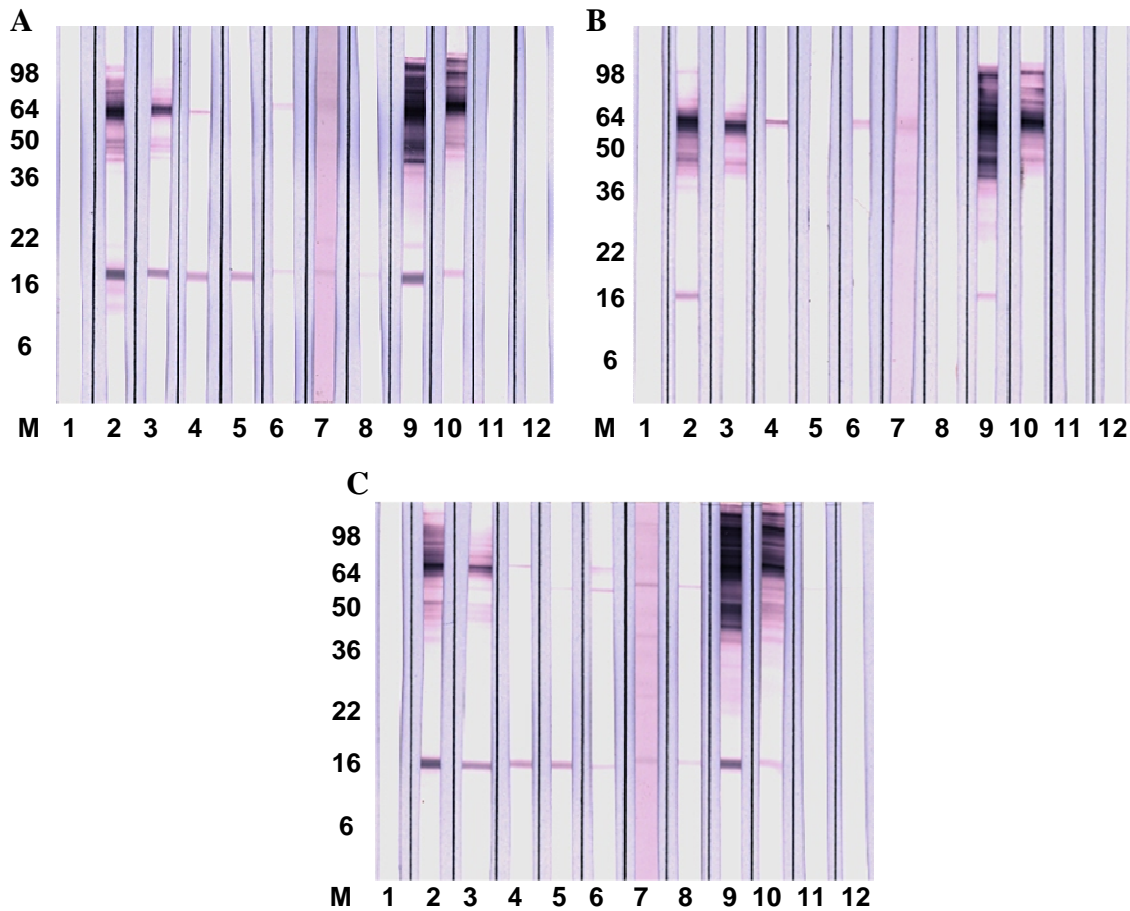


Abb. 3.29: IgE-Reaktivität des Serums von Möhrenallergikern. IgE-Reaktivität des Serums von 10 Möhrenallergikern (1-10) mit Wildtyp-Möhrenproteinextrakten (A, Gemisch von Wildtyp-Möhren). Die IgE-Reaktivität des Serums gegen die Möhren der Dau c 1.01-supprimierten Linie 39 (B) und gegen die Möhren der Dau c 1.02-supprimierten Linie 33 (C). Spalte 11: Serum von nicht-Allergiker als Negativkontrolle; Spalte 12: Pufferkontrolle.

4 DISKUSSION

Das Protein *Dau c 1* ist das Hauptallergen der Möhre (*Daucus carota*) und gehört den Pathogenese-assoziierten Proteinen („*pathogenesis-related*“ protein) der Familie 10 an (PR10; Hoffmann-Sommergruber et al. 1999). Es sind viele verschiedene Funktionen für die PR10-Proteine festgestellt worden, u.a. eine Ribonuklease-Aktivität (siehe Kapitel 1.1.1). Die genauen biologischen Funktionen der PR10-Proteine sind noch weitgehend unbekannt (Liu and Ekramoddoullah, 2003). In vielen verschiedenen Pflanzenarten sind die PR10-Proteine als Allergene bekannt (siehe Kapitel 1.1.1). Hauptsächlich verursachen diese pflanzlichen PR10-Proteine eine allergische Reaktionen bei Menschen durch eine Kreuzreaktion mit Baumpollen (siehe Kapitel 1.1.1 und 1.2). Etwa 98% der Möhrenallergiker reagieren auf das PR10-Protein der Möhre allergisch (Ballmer-Weber et al. 2001; Hoffmann-Sommergruber et al. 1999). In Europa tritt die Möhrenallergie in erster Linie mit der Birkenpollen-Allergie auf (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999).

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Herstellung von hypoallergenen Möhren mittels der RNA-Interferenz (RNAi)-Strategie und untersucht die Bedeutung dieses Proteins für das pflanzliche Immunsystem anhand der pilzlichen Pflanzenpathogene *Alternaria dauci*, *Alternaria radicina* und *Botrytis cinerea*. Diese drei Pilze verursachen den größten Schaden an der Möhrenernte. Die *Dau c 1*-Isoformen (*Dau c 1.01* und *Dau c 1.02*) wurden unabhängig voneinander mittels der RNAi-Strategie unterdrückt. Des Weiteren werden die von den Kooperationspartnern durchgeführten Testergebnisse der Allergiereaktionen der Haut (Skin-Prick-Tests) und IgE-Bindungsreaktionen der Blutseren von Möhrenallergikern gegen die hypoallergenen Möhren aufgezeigt.

4.1 HYPOALLERGENE MÖHREN

Die Sequenzen der *Dau c 1*-Isoformen (*Dau c 1.01* mit der Akzessionsnummer: Z81362 und *Dau c 1.02* mit der Akzessionsnummer: AF456481) wurden aus der offiziellen Allergen-Datenbank der Internationalen Union der Immunologischen Gesellschaft (www.allergen.org) untersucht und für das RNAi-Konstruktdesign eingesetzt. Anschließend wurden die doppelsträngigen RNA-Fragmente (dsRNA) für die RNAi-*Dau c 1.01*- und RNAi-*Dau c 1.02*-Konstrukte aus sterilen Möhrenpflanzen (*Daucus carota* spp. *sativus*) des Kultivars Rodelika kloniert (Abb. 3.1 und 3.2). Das RNAi-Konstrukt für die *Dau c 1.01*-Suppression hat die Größe von 253 Basenpaaren (bp) und das RNAi-Konstrukt für die *Dau c 1.02*-Suppression beträgt 267 bp (Konstruktsequenzen im Anhang, Kapitel 7.1.1). Nach der erfolgreichen Transferierung dieser Konstrukte über den „Eingangsvektor“ (pENTR/D-

TOPO; Abb. 3.3) in den „Ziel- bzw. Transformationsvektor“ (pK7GWIWG2[III]; Abb. 3.4 und 3.5, Vektorkarten im Anhang Kapitel 7.1.2) konnten Möhrenzellen agrobakterium-vermittelt transformiert werden (Imani et al., 2002). Die positiv transformierten Möhrenzellen konnten durch den Selektionsmarker Kanamycin effektiv selektiert werden. Alle untersuchten Transformanten sind erfolgreich transformiert worden. Das jeweilige RNAi-Konstrukt kann in den untersuchten transgenen Linien nachgewiesen werden (Abb. 3.7). 50 Pflanzen je RNAi-Konstrukt wurden über die somatische Embryogenese erzeugt (vgl. Kapitel 3.1; Li and Neumann, 1985). Jede Pflanze stellte eine unabhängige transgene Linie dar. Die *Dau c 1*-Isoformen wurden unabhängig von einander unterdrückt, weil die Auswirkungen beim Fehlen eines der Isoformen unbekannt sind und weil die Sequenzen der *Dau c 1*-Isoformen zu heterogen für eine Suppression mit einem Konstrukt sind. Es musste in erster Linie überprüft werden, ob die Pflanzen bei verminderter Expression der einzelnen Isoformen lebensfähig sind. Dies wurde nachgewiesen. Pflanzen mit der Suppression einer der *Dau c 1*-Isoformen, unabhängig ob *Dau c 1.01*- oder *Dau c 1.02*-Suppression, sind lebensfähig und entwickeln sich wie die Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.11 und 3.12). Am Anfang existierte von jeder Linie nur eine Pflanze. Von jeder Pflanze wurde ein Petiolus in Stücke geschnitten und auf kanamycinhaltigem B5-Agar in Petrischalen in *in vitro*-Kultur kultiviert (Abb. 3.8). Aus den Petiolenstücken wuchs Kallus heran, der einerseits für die Erhaltung der Linien diente und andererseits entstand auf diese Weise die Möglichkeit, jederzeit bei Bedarf Klonpflanzen der Linien über die somatische Embryonese regenerieren zu können (Abb. 2.1). Die Regenerierung von Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur bis zur ausgewachsenen Möhre beansprucht etwa sechs Monate und stellt damit eine Verlangsamung der Versuchsdurchführungen dar.

4.1.1 SUPPRESSIONSTÄRKE IN DEN TRANSGENEN LINIEN

4.1.1.1 Ermittlung der Suppressionsstärke auf Transkriptebene

In den generierten Pflanzen der transgenen Linien wurde die Suppressionsstärke von *Dau c 1.01* und *Dau c 1.02* zuerst auf der Transkriptebene mittels quantitativer Real Time PCR (qPCR) in den Blättern ermittelt, um die am stärksten supprimierten Linien für weitere Analysen sowie für die Proteinanalysen bei den Kooperationspartnern am Paul-Ehrlich-Institut (AG Vieths, Langen) und für klinische Patiententests in der Hautklinik der Universitätsklinik Erlangen (AG Mahler) zu erhalten. Die Ergebnisse der Proteinanalysen finden sich im folgenden Kapitel, die klinischen Patiententests werden in Kapitel 4.4 diskutiert.

Es wurde die relative Expression von *Dau c 1*-Isoformen in den Blättern mittels der qPCR ermittelt. Die Primer für die qPCR wurden so gewählt, dass nur einer der Primer in dem Bereich der Sequenz lag, die für das RNAi-Konstrukt verwendet wurde und der andere Primer außerhalb des RNAi-Konstrukts lag. Hiermit wurde nur die relative Expression der endogenen *Dau c 1*-Isoformen ermittelt. Das *Dau c 1.01*-Gen wird in den Wildtyp-Blättern deutlich (etwa 3-fach) weniger exprimiert als das *Dau c 1.02*-Gen (Abb. 3.9). Insgesamt ist die Expression beider Isoformen im Vergleich zu den Expressionslevels in den Wurzeln (Abb. 3.16 A und 3.17 A) relativ niedrig. Es wurden von den *Dau c 1.01*-unterdrückten und von den *Dau c 1.02*-unterdrückten Linien je 3 transgene unabhängige Linien ausgewählt, die die stärkste Suppression zeigten (Abb. 3.9). Bei den Linien mit der *Dau c 1.01*-Suppression zeigten die Linien 25 (13-fach), 35 (4,5-fach) und 39 (52-fach) die deutlichste Verminderung in der relativen *Dau c 1.01*-Expression. In der Linie 39 ist die *Dau c 1.01*-Expression am stärksten unterdrückt (Abb. 3.9 A). Das *Dau c 1.02* ist in den Linien 10 (22,6-fach), 28 (2,9-fach) und 33 (31,5-fach) am deutlichsten in der relativen Expression unterdrückt (Abb. 3.9 B). In den Linien 10 und 33 ist die *Dau c 1.02*-Unterdrückung am stärksten. Die Auflistung der qPCR-ermittelten Expressionswerte in den Blättern befindet sich im Anhang (Kapitel 7.2, Tab. S1).

4.1.1.2 Ermittlung der Suppressionsstärke auf Protein-Ebene

Die Feststellung der Suppressionsstärke auf der Protein-Ebene wurde von unseren Kooperationspartnern am Paul-Ehrlich-Institut (AG Viehls, Langen) durchgeführt. Die Menge des *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-Proteins wurde in Möhrenwurzelproteinextrakten aus den am stärksten supprimierten Linien und aus Wildtyp-Möhren mit Hilfe von spezifischen Antikörpern ermittelt (Peters et al., eingereicht). Für diese Analysen wurden ausgewachsene etwa 5 Monate alte Möhren geerntet und nur die Wurzel eingesetzt. Diese Analysen wurden mit Möhrenwurzeln durchgeführt, weil nur die Wurzeln der Möhre von Menschen verzehrt werden und es deshalb wichtig zu ermitteln war, ob die *Dau c 1*-Isoformen in diesem Pflanzenteil erfolgreich unterdrückt worden sind. In dem Westernblot wurde jeweils ein rekombinantes Protein von *Dau c 1.01* und *Dau c 1.02* als Positivkontrolle eingesetzt (Abb. 3.10). In den Wildtyp-Proteinextrakten wurden beide *Dau c 1*-Isoformen detektiert. Die detektierten *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-Proteinbanden liegen bei etwa 16 kDa. Diese Größe ist für das *Dau c 1* bekannt (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999). Es wurden auch die Banden für die rekombinanten *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-Proteine als Positivkontrolle nachgewiesen. Bei den Linien 8, 25, 35 und 39 der *Dau c 1.01*-supprimierten Möhren konnte

kein *Dau c 1.01*-Protein detektiert werden (Abb. 3.10 A). Die Linie 8 wurde zusätzlich mit analysiert, da in dieser Linie die *Dau c 1.01*-Unterdrückung auch in den Blättern viel versprechend war. Die Linie 8 wurde jedoch nicht in weiteren Analysen berücksichtigt, weil aus dem Kallus der Linie 8 keine Pflanzen regeneriert werden konnten. Bei den *Dau c 1.02*-supprimierten Linien 10, 28 und 33 konnte in den Möhrenwurzelproteinextrakten der Linien 10 und 28 kein *Dau c 1.02*-Protein detektiert werden, aber in dem Proteinextrakt der Linie 33 ist eine schwache Bande im Westernblot zu erkennen (Abb. 3.10 B). In den Blättern der Linie 33 ist die relative *Dau c 1.02*-Expression neben den Blättern der Linie 10 am deutlichsten unterdrückt (Abb. 3.9 B). Aber nur in den Wurzelproteinextrakten der Linie 33 kann das Protein detektiert werden. Anhand dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass es Unterschiede zwischen dem RNA-Level und dem Protein-Level gibt. Da die Suppressionsstärke auf der Transkriptebene in den Blättern ermittelt wurde und die Suppressionsstärke auf der Protein-Ebene in den Wurzeln, können diese Ergebnisse auch die organspezifischen Unterschiede wiedergeben. Es ist bekannt, dass eine konstitutive Akkumulation von PR10-Proteinen während des Pflanzenwachstums und der Entwicklung unter anderem in den Blättern stattfindet (Pinto et al. 2005). Es wurden relativ junge Blätter für die Ermittlung der Suppressionsstärke auf der Transkriptebene eingesetzt. In jungen Blättern ist weniger PR10 akkumuliert als in älteren Blättern (Pinto et al. 2005). Die Unterschiede auf der RNA-Ebene und auf der Protein-Ebene können auch auf die organspezifische PR10-Akkumulation zurückgeführt werden.

In den ELISA-Analysen wurde die *Dau c 1.01*-Restproteinmenge im Vergleich zu der Wildtyp-Möhrenwurzelproteinmenge quantifiziert (Fötisch, unveröffentlicht). Auch hierbei konnte eine deutliche Reduktion des *Dau c 1.01*-Proteins in allen drei *Dau c 1.01*-unterdrückten Linien festgestellt werden. Die Linie 35 ist mit 70%iger Reduktion des *Dau c 1.01*-Proteins im Vergleich zu den Wildtyp-Möhren am wenigsten supprimiert (Tab. 3.1). Dieses Ergebnis korreliert mit den qPCR-Daten der Blätter. In den Blättern der Linie 35 (4,5-fach) ist die *Dau c 1.01*-Suppression auch schwächer ausgeprägt als in den Blättern der Linien 25 (13-fach) und 39 (52-fach) (Abb. 3.9 A). Die prozentuale Reduktion des *Dau c 1.01*-Proteins in den Wurzeln der Linien 25 und 39 im Vergleich mit den Wildtyp-Möhren liegen mit 87% und 88% im gleich stark ausgeprägten Suppressionsbereich. Diese Ergebnisse korrelieren weitgehend ebenso mit den qPCR-Daten der Blätter. In den Blättern der Linien 25 und 39 wurde die niedrigste relative *Dau c 1.01*-Expression festgestellt (Abb. 3.9 A). In den Blättern ist der Unterschied deutlicher als in der ELISA-Analyse zwischen den Linien 25 und 39 zu sehen. Die Blätter der Linie 25 wiesen eine höhere relative *Dau c 1.01*-Expression auf

als die Blätter der Linie 39. Diese Ergebnisse weisen auf eine unterschiedlich stark ausgeprägte Translation der *Dau c 1.01*-Transkripte hin. Die Blattproben und Wurzelproben stammen jeweils von gleichen Pflanzen und wurden gleichzeitig entnommen; dadurch kann die unterschiedlich stark ausgeprägte Translation nicht auf einen Altersunterschied zurückgeführt werden. In den ELISA-Analysen der *Dau c 1.02*-Proteinreduktion konnte in den Wurzelproteinextrakten der *Dau c 1.02*-supprimierten Linien 10, 28 und 33 kein *Dau c 1.02*-Protein detektiert werden. Die Reduktion des *Dau c 1.02*-Proteins beträgt somit in allen Proben 100% im Vergleich zu den Wildtyp-Wurzelproteinextrakten (Tab. 3.1). Das Detektionslimit der *Dau c 1.02*-ELISA-Analysen liegt bei 10ng/ml. Dadurch liegt die Reduktion des *Dau c 1.02*-Proteingehaltes unterhalb des Detektionslimits. Im Gegensatz zu diesen ELISA-Ergebnissen konnte in den Blättern dieser Linien (10, 28 und 33) eine niedrige relative *Dau c 1.02*-Expression festgestellt werden (Abb. 3.9 B). Da auf der Transkriptebene das *Dau c 1.02* detektiert werden konnte aber auf Proteinebene nicht, kann gesagt werden, dass die Translation der Rest-RNA aus unbekanntem Gründen gehemmt ist. Die Stilllegung eines Gens mittels RNAi-Konstrukt ist auch bekannt als post-transkriptionale Genunterdrückung (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) (Susi et al. 2004). Dadurch wird die Boten-RNA (messenger-RNA; mRNA) bereits auf der Transkriptebene degradiert bzw. stillgelegt. Aus Pflanzen ist eine Translationshemmung im Zusammenhang mit der RNAi-vermittelten Suppression nicht bekannt. Eine Translationshemmung in Pflanzen durch Mikro-RNAs (miRNAs) wurde in *Arabidopsis* festgestellt (Lanet et al. 2009). Ob ein Zusammenhang zwischen der RNAi-vermittelten Suppression und der Translationshemmung durch miRNA besteht ist unbekannt. Es kann aber auch sein, dass die translatierte Menge an *Dau c 1.02* einfach unterhalb der Detektionsgrenze liegt und dadurch nicht nachweisbar ist. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass es sich bei diesen Linien um stark *Dau c 1.02*-supprimierte Linien handelt. Ähnlich stark ausgeprägte Suppressionen von pflanzlichen Allergenen wurden mittels RNAi in Apfelblättern und in Tomaten erzielt. Das Allergen Mal d 1 des Apfels war etwa 10-fach reduziert in den Blättern der RNAi-Pflanzen im Vergleich mit den Wildtypblättern (Gilissen et al. 2005). Das Tomatenallergen Lyc e 1 konnte ebenfalls 10-fach im Vergleich mit den Wildtyp-Tomaten mittels RNAi reduziert werden (Le et al. 2006). Mit der mehr als 70%igen *Dau c 1.01*-Proteinsuppression sowie mit der nicht mehr mittels ELISA detektierbaren Menge an *Dau c 1.02*-Protein in den Möhrenwurzeln konnte in dieser Arbeit erstmals ein vergleichbarer Suppressionserfolg in der Möhre erzielt werden. 4,5 bis 52-fache *Dau c 1.01*-Suppression und 2,9 bis 31-fache *Dau c 1.02*-Suppression in den Blättern auf der Transkriptebene bestätigen den Suppressionserfolg. Damit ist bewiesen, dass man das

Dau c 1-Protein der Möhre mittels RNAi supprimieren kann. Um nachweisen zu können, ob die RNAi-Unterdrückung auch in folgenden Generationen stabil bleibt, müssen Samen erzeugt werden. Im Vergleich zur traditionellen Pflanzenzüchtung ermöglicht die RNAi-Methode die simultane Ausschaltung von Proteinen in multigenen Familien (auf Sequenzhomologie basierend). In Kombination mit spezifischen Promotorelementen kann RNAi auf das Zielgewebe eingeschränkt werden, wobei die negativen Effekte des Proteinfunktionsverlusts minimiert werden (Le et al., 2006). Die RNAi-Technologie bietet auch eine zeiteffizientere Möglichkeit um Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften zu erzeugen. Die Züchtung einer resistenteren Möhre gegen *Aster Yellow*s beanspruchte beispielsweise etwa 10 Jahre (Gabelman et al. 1994). Mit der RNAi-Technologie kann man in etwa 2-3 Jahren Möhren mit bestimmten Eigenschaften erzeugen.

4.1.2 MORPHOLOGIE DER TRANSGENEN MÖHRENBLÄTTER

Es ist bisher nicht bekannt gewesen, wie sich die Unterdrückung der *Dau c 1*-Isoformen auf den Phänotyp der Möhren auswirkt. Die Wurzeln der Möhren aus der *in vitro*-Kultur sehen sehr unterschiedlich aus. Die Morphologie der Wildtypwurzel sowie der transgenen Möhrenwurzel unterscheidet sich stark schon innerhalb der einzelnen Klone einer Linie bzw. des Wildtyps. Dadurch gibt es keine Möglichkeit, einen Morphologievergleich der Wurzeln durchzuführen. Da die Blätter der Möhren keine Veränderungen durch die *in vitro*-Vermehrung erfahren, wurde die Morphologie der Blätter zwischen den verschiedenen transgenen Linien und denen des Wild-Typs untersucht. Die meisten transgenen Möhrenpflanzenblätter sehen den Wildtyp-Blättern sehr ähnlich (Abb. 3.11 und 3.12). Es ist kaum am Erscheinungsbild der Möhren zu erkennen, bei welchen Pflanzen eine Unterdrückung einer der *Dau c 1*-Isoformen vorliegt. Nur in den Blättern der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 39 und der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 33 liegt eine Veränderung des Blattphänotyps vor (Abb. 3.11 und 3.12).

Die Blätter der Linie 39 unterscheiden sich am stärksten von den Blättern der Wildtyp-Möhren (Abb. 3.11 B). Die Lamina, die Fiederung und die Petiolen der Blätter dieser Linie sind in allen Klonen deutlich reduziert. Dadurch sind die Pflanzen kleiner als die Pflanzen der Linien 25 und 35 und des Wild-Typs (Abb. 3.11 A). Da die anderen Linien (Linie 25 und 35) mit der nachgewiesenen *Dau c 1.01*-Suppression diesen Phänotyp nicht zeigen, kann die Blatt-Morphologieänderung der Linie 39 nicht auf die Unterdrückung des *Dau c 1.01*-Gens zurückgeführt werden. Die Stärke der *Dau c 1.01*-Unterdrückung kann auch nicht der Grund für die Blatt-Morphologieänderung sein, da die Linie 25 gleich stark mit der Linie 39

unterdrückt ist (Abb. 3.10 A und Tab. 3.1) und keine Phänotypänderung zeigt (Abb. 3.11). Bei diesen transgenen Möhren handelt es sich um stabil transgene Pflanzen, bei denen die transferierte DNA (tDNA) aus den Agrobakterien die Information zur Transkription des jeweiligen RNAi-Konstrukts sowie des CaMV35S-Promotors enthält (Abb. 3.6). Der Blumenkohl-Mosaik-Virus 35S-Promotor (*cauliflower mosaic viral 35S promoter*; CaMV35S) sorgt für eine effektive konstitutive Transkription des RNAi-Konstruktes (Odell et al. 1985; Sanders et al. 1987). Die Blatt-Morphologieänderung hängt eher mit der Insertionsstelle der tDNA des RNAi-Konstrukts im pflanzlichen Genom zusammen, da bei der agrobakterium-vermittelten Transformation die tDNA des RNAi-Konstrukts in das pflanzliche Genom in einer zufälligen Stelle inseriert wird, d.h. man hat keine Möglichkeit die Stelle dieser Insertion zu kontrollieren (Tinland 1996; Winkler et al. 1998). Abhängig von der Stelle der Insertion der tDNA ins pflanzliche Genom kann es zur Phänotypänderungen kommen (McKinney et al. 1995; Klucher et al. 1996; Winkler et al. 1998). Bei der Linie 39 ist das *Dau c 1.01*-RNAi-Konstrukt offensichtlich in einem Genombereich inseriert worden, wodurch die normale Blattentwicklung gestört ist. Dies ist zurzeit leider nicht mit molekularen Methoden nachzuweisen, da das Möhren-Genom noch weitgehend unsequenziert ist und für die Inserierungsstellenanalyse die Sequenzen, wie im diesem Falle die Sequenzen der Blattgene, bekannt sein müssten. Solche Inserierungsstellenanalysen der transferierten DNA sind bis jetzt unter anderem mit *Arabidopsis thaliana* (McKinney et al. 1995; Klucher et al. 1996) und mit *Oryza sativa* (Ma et al. 2009) durchgeführt worden. Die Genome dieser beiden Pflanzen sind bekannt (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000; International Rice Genome Sequencing Project 2005).

Die Änderungen der Blatt-Morphologie der *Dau c 1.02*-unterdrückten Linie 33 ist weniger stark ausgeprägt als die der zuvor beschriebenen *Dau c 1.01*-unterdrückten Linie 39 (vgl. Abb. 3.12 und 3.11). Im Vergleich zu den Wildtyp-Möhrenblättern ist bei dieser Linie 33 die Lamina der Fiederblätter vergrößert und die Petiolen sind verkürzt (Abb. 3.12). Die *Dau c 1.02*-Unterdrückung ist in den Linien 10 und 33 in der Blatt-RNA-Ebene gleich stark (Abb. 3.9 B) und in den Proteinanalysen mit ELISA lagen die Proteingehalte beider Linien unterhalb der Detektionsgrenze (Tab. 3.1). Im Westernblot wurde nur in den Wurzelproteinextrakten der Linie 33 mit spezifischen *Dau c 1.02*-Antikörpern eine geringe Menge an *Dau c 1.02*-Protein festgestellt (Abb. 3.10). Es ist anhand dieser Ergebnisse anzunehmen, dass die noch trotz RNAi-Unterdrückung verbliebene RNA effektiver in Proteine in den Pflanzen der Linie 33 translatiert worden ist als die Rest-RNA der Linien 10 und 28. Wie bei der *Dau c 1.01*-unterdrückten Linie 39 ist bei der *Dau c 1.02*-unterdrückten

Linie 33 nicht davon auszugehen, dass die *Dauc 1.02*-Unterdrückung zu den blattmorphologischen Änderungen geführt hat. Die *Dauc 1.02*-Unterdrückung der Linie 33 entspricht die der Linie 10 und bei der Linie 10 sind keine Phänotypänderungen der Blätter sichtbar (Abb. 3.12). Es ist bei der Linie 33 davon auszugehen, dass die Phänotypänderung ebenfalls auf die Insertionsstelle der tDNA des *Dauc 1.02*-RNAi-Konstruktes zurückzuführen ist. Die Insertionsstelle ist jedoch wie zu erwarten war nicht die Gleiche in dem Möhrengenom wie die Insertionsstelle der tDNA des *Dauc 1.01*-Konstrukts der Linie 39, da die Linien 39 und 33 nicht den gleichen Blatt-Phänotyp zeigen. Es kann angenommen werden, dass die tDNA des *Dauc 1.02*-Konstrukts in der Linie 33 in dem Bereich der Gene mit einer Auswirkung auf die Blattmorphologie inseriert worden ist.

4.2 RESISTENZ DER HYPOALLERGENEN MÖHREN

Die Funktion der PR10-Proteine im pflanzlichen Immunsystem ist noch weitgehend unbekannt. Bekannt ist, dass alle PR-Proteine direkt mit der Pflanzenresistenz korrelieren (Van Loon und Van Strien, 1999) und ihre Expression durch Pathogenbefall, Verletzung des Pflanzengewebes und andere Stressfaktoren induziert werden (Van Loon 1985; Vigers et al. 1991; Dubos and Plomion 2001; Liu et al. 2003; Hashimoto et al. 2004). Kürzlich publizierte Forschungsergebnisse anderer Arbeitgruppen haben antimikrobielle Schutzfunktionen für die PR10-Isoformen in verschiedenen Pflanzenarten gezeigt (Chen et al. 2010; Xie et al. 2010). In dieser Arbeit wurde erstmals die Anfälligkeit der *Dauc 1*-Isoform unterdrückten *Dauc 1.01*_RNAi- und *Dauc 1.02*_RNAi-Möhren auf pilzliche Pflanzenpathogene der Klasse Ascomycetes (Sitte et al. 2002) untersucht. Der möhrenpathogene Pilz *Alternaria radicina* Meier, Drechsler & Eddy wurde in den Resistenzanalysen eingesetzt, da er beträchtliche Schäden an der Möhrenernte, besonders während der Lagerung, verursacht (Farrar et al. 2004).

4.2.1 RESISTENZANALYSEN AN WILDTYP-MÖHREN MIT *ALTERNARIA RADICINA*

Erste, orientierende Resistenzanalysen wurden an Möhrenwurzelscheiben auf im Feld gewachsenen Wildtyp-Möhren (*Daucus carota* spp. *sativus* cv. Rodelika) mit dem pilzlichen Pflanzenpathogen *Alternaria radicina* (*A. radicina*; Meier et al. 1922) durchgeführt. Die Analysen wurden visuell und mit der quantitativen Real Time PCR (qPCR) durchgeführt. Diese Analysen dienten zur Feststellung der Anfälligkeit und zur Ermittlung des relativen

Expressionsmusters der beiden *Dau c 1*-Isoformen nach dem Befall durch *A. radicina* in Wildtyp-Möhren.

In den visuellen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die *A. radicina*-Infektion von der Stelle der Inokulation sich mit zunehmender Zeit in das umgebende Gewebe der Wurzelscheiben ausbreitet (Abb. 3.13 D, E und F). Einen Tag nach der Inokulation (dai) ist auf der Wurzelscheibe keine Infektion erkennbar (Abb. 3.13 D). Die Oberfläche der inokulierten Wurzelscheibe gleicht die der Wasser-Kontrolle (vgl. Abb. 3.13 A und D). Drei Tage nach der Inokulation sind die ersten deutlichen Anzeichen der *A. radicina*-Infektion als eine Nekrose auf der inokulierten Wurzelscheibe festzustellen (Abb. 3.13 E) (Pryor and Gilbertson 2001). 7 dai ist die *A. radicina*-Infektion deutlich zu erkennen und sie breitet sich in das umgebende Gewebe aus, insbesondere in die Richtung der Leitbündel in den mittleren Teil der Wurzelscheibe (Abb. 3.13 F). In den mit Wasser behandelten Kontroll-Wurzelscheiben kann man über die gesamte Beobachtungszeit weder eine Infektion noch eine Veränderung der Wurzelscheibenoberfläche erkennen (Abb. A, B und C). Dies bedeutet, dass die Infektion und die farbliche Änderung der inokulierten Wurzelscheiben durch die *A. radicina*-Inokulation bzw. -Infektion verursacht wird. Diese visuelle Überprüfung diente nicht nur zur Beobachtung der *A. radicina*-Infektion, sondern hiermit konnte ebenfalls sichergestellt werden, dass die Inokulationsbedingungen erfolgreich zur Infektion geführt hatten. Nur die erfolgreich infizierten Versuchsansätze und ihre Wasser behandelten Kontrollen wurden anschließend mit der qPCR analysiert.

Für die Transkriptionsanalysen mit der qPCR der beiden *Dau c 1*-Isoformen wurden Wurzelscheiben 0, 6, 12, 24 und 72 Stunden nach der Inokulation (hai) geerntet und analysiert. Beide *Dau c 1*-Isoformen wurden bereits 6 hai in den Wildtyp-Möhrenwurzelscheiben verstärkt exprimiert (Abb. 3.14). Die relative *Dau c 1.02*-Expression lag höher als die des *Dau c 1.01* (vgl. Abb. 3.14 A und B). In den Wildtyp-Möhrenblättern wurde auch ein höherer *Dau c 1.02*-Expressionslevel gemessen als der des *Dau c 1.01* (vgl. Abb. 3.9 A und B). Es ist aus diesen Ergebnissen festzustellen, dass das *Dau c 1.02* in höheren Mengen transkribiert wird als das *Dau c 1.01*. Die PR-Proteine sind dafür bekannt, dass sie durch eine Pathogeninfektion induziert werden (Van Loon et al. 1994; Van Loon and Van Strien 1999). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigen eine Hochregulation des PR10-Proteins nach einer pilzlichen Infektion des Pflanzengewebes in Hirse (Lo et al. 1999; Katilé et al. 2010), in Erbsen (Ruiz-Lozano et al. 1999), in Reis (McGee et al. 2001; Hashimoto et al. 2004) und in Pflaumen (El-kereamy et al. 2009). Eine Induktion der PR10-Transkripte wurde bereits 4 hai in Hirse festgestellt (Lo et al. 1999). Die Induktion der *Dau c*

I-Isoformen in Wildtyp-Möhrenwurzelscheiben erfolgt ebenfalls sehr schnell, da die beiden *Dau c I*-Isoformen bereits 6 hai verstärkt exprimiert waren. Das Maximum der relative *Dau c I*-Expression wurde für *Dau c I.01* bei 72 hai und für *Dau c I.02* bei 24 hai erreicht. Diese Zeitpunkte sind etwas später als die der maximalen PR10-Transkriptmenge in Hirse, welche bereits 12 hai erreicht wird. (Lo et al. 1999). In der anfälligen Pflaumen-Sorte „Veeblue“ wurde das Maximum an PR10-Transkripten 3 Tage nach einer *Monilinia fructicola*-Infektion ermittelt (El-kereamy et al. 2009). Dieser Zeitraum entspricht dem Erreichen des Maximums in der relativen *Dau c I.01*-Expression in den Möhrenwurzelscheiben. In den H₂O-behandelten Kontrollwurzelscheiben stieg die relative Expression der *Dau c I*-Isoformen während der Messzeit leicht an (Abb. 3.14). Da aber keine Anzeichen einer *A. radicina*-Infektion auf den Wurzelscheiben zu sehen waren, auch nicht sieben Tage nach der Versuchsbeginn, muss diese Induktion der *Dau c I*-Isoformen einen anderen Grund haben. Die Wurzelscheiben wurden am Versuchsbeginn auf feuchtes Filterpapier in Petrischalen gelegt. Während des Versuchs trocknete das Filterpapier leicht an. Dieser Feuchtigkeitsverlust kann zu einem zusätzlichen Stress bei den Möhrenwurzelscheiben führen. Dadurch könnte es zu einer Induzierung der PR10-Proteine gekommen sein. Eine Hochregulation der PR10-Proteine durch Trockenstress wurde z.B. in *Pinus pinaster* nachgewiesen (Dubos and Plomion 2001). Nach gewisser Zeit sank die Transkriptmenge der *Dau c I*-Isoformen der Kontrollwurzelscheiben wieder ab. Gleichzeitig stieg der Wasserverlust der Filterpapiere. Aus dieser Tatsache kann die Zunahme der *Dau c I*-Transkripte in den Kontrollwurzelscheiben nicht auf den Feuchtigkeitsverlust zurückgeführt werden. Es ist eher anzunehmen, dass die *Dau c I*-Transkriptzunahme in den Kontrollwurzelscheiben auf die Verletzung, die bei dem Schneiden der Wurzelscheiben entstand, zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass Verletzung des Pflanzengewebes auch die PR-Proteine induziert (Liu et al. 2003; Edreva, 2005). Eine Verletzung fand bei den inokulierten Wurzelscheiben ebenfalls statt. Jedoch ist die *Dau c I*-Induktion durch die *A. radicina*-Inokulation offensichtlich stärker als durch das Verletzen des Gewebes alleine, da in den inokulierten Wurzelscheiben der *Dau c I*-Transkriptionslevel in den inokulierten Wurzelscheiben deutlich höher liegt als in den Kontrollwurzelscheiben (Abb. 3.14). Die Möhrenwurzelscheiben der aus der *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen zeigten keine *A. radicina*-Infektion-abhängige Hochregulation der *Dau c I*-Isoformen an (vgl. Abb. 3.16 und 3.17). Die *A. radicina*-Kinetikergenergebnisse der aus der *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen sind im nächsten Kapitel genauer beschrieben. Die starke Induktion der *Dau c I*-Isoformen in den Wildtyp-Möhren ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen *Priming*-Effekt zurückzuführen (d.h. auf eine frühere pilzinduzierte Immunisierung, die eine stärkere

Abwehrantwort auf das neue Pathogen hervorruft) (Stein et al., 2008). Da die Möhren auf einem Feld im Freien gewachsen sind, sind sie mehreren Umweltstressfaktoren in ihrer Umgebung ausgesetzt gewesen. Es ist nicht auszuschließen, dass sie auch von anderen Pathogenen vorher befallen worden sind. *A. radicina* ist ein nekrotropher Pilz. Beim Befall von nekrotrophen Pilzen wird in erster Linie das Phytohormon Jasmonsäure in Pflanzen induziert (Thomma et al. 1998; Van Wees et al. 2003). Die *PR10*-Gene werden durch Jasmonsäure und Salizylsäure induziert (McGee et al. 2001). Wie im nächsten Kapitel beschrieben führt die *A. radicina*-Infektion in den aus *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen nicht zur *Dau c 1*-Hochregulation. Dadurch wird die *PR10*-Induktion in der Möhre vermutlich nicht durch Jasmonsäure induziert. Daher ist anzunehmen, dass die Hochregulation der *PR10*-Gene *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02* in den auf dem Feld gewachsenen Wildtypmöhren auf den *Priming*-Effekt zurückzuführen ist.

4.2.2 RESISTENZANALYSEN AN DAU C 1.01- UND DAU C 1.02-SUPPRIMIERTEN-MÖHRENWURZELSCHLEIBEN MIT *ALTERNARIA RADICINA*

Um die Anfälligkeit der *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-unterdrückten Möhrenlinien gegen den möhrenpathogenen Pilz *Alternaria radicina* (*A. radicina*) festzustellen, wurden wie mit den auf Feld gewachsenen Wildtyp-Möhrenwurzeln auch mit den Wurzeln der *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-supprimierten Möhren gleich aufgebaute Resistenzanalysen durchgeführt (vgl. Kapitel 4.2.1). Es wurden die *Dau c 1.01*-supprimierten Linien 35 und 39 und die *Dau c 1.02*-supprimierte Linie 10 sowie Wildtyp-Möhren für diese Analyse eingesetzt. Diese transgenen Linien 35, 39 und 10 entwickelten sich aus der *in vitro*-Kultur sehr gut und in großen Mengen zu ausgewachsenen Möhrenpflanzen, so dass man sie in dem für die Resistenzanalysen benötigten Ausmaß regenerieren konnte. All diese Möhren waren aus der *in vitro*-Kultur in Erde überführte Pflanzen.

Wie bei den Untersuchungen der Resistenz der Wildtyp-Möhrenwurzelscheiben wurde auch bei diesen Analysen der Infektionserfolg der *A. radicina*-Inokulation vor den qPCR Messungen visuell überprüft (Abb. 3.15). Da in den visuellen Infektionsbeobachtungen der Wildtyp-Möhrenwurzelscheiben die *A. radicina*-Infektion sieben Tage nach der Inokulation (dai) am deutlichsten zu sehen war (Abb. 3.13), wurde die Überprüfung des Infektionserfolgs der hypoallergenen Möhrenwurzelscheiben nur 7 dai durchgeführt (Abb. 3.15). Auf allen *A. radicina*-inokulierten Wurzelscheiben ist eine Infektion 7 dai zu erkennen. Die Infektionsintensität ist zwischen den Wildtyp- und hypoallergenen Möhrenwurzelscheiben

unterschiedlich stark. Die Wurzelscheiben stammen jeweils von zwei verschiedenen Pflanzenklonen. Es ist festzustellen, dass die Infektion auf verschiedenen Wurzelscheiben einer Linie unterschiedlich ausgeprägt ist. Auf der linken inokulierten Wildtyp-Wurzelscheibe ist die Infektion geringer als auf der rechten inokulierten Wildtyp-Wurzelscheibe (Abb. 3.15 A). Diese Variabilität zwischen den inokulierten Wurzelscheiben ist auch zwischen den hypoallergenen Wurzelscheiben jeder Linie festzustellen. So sind jeweils die linken inokulierten Wurzelscheiben der Linien 35, 39 und 10 stärker befallen als die rechts liegenden Wurzelscheiben (Abb. 3.15 B, C und D). Die Wurzelscheiben wurden für die Dokumentation in dieser Reihenfolge platziert. Alle Wurzelscheiben wurden unter gleichen Bedingungen inkubiert, so dass es zu keinen infektionsintensitätsrelevanten Unterschieden durch äußerliche Faktoren kommen konnte. Auf den Wasser-behandelten Wurzelscheiben ist keine Infektion festzustellen (Abb. 3.15). Die *A. radicina*-Infektion ist auf den inokulierten Wurzelscheiben der Linie 10 am schwächsten ausgeprägt (Abb. 3.15 D). In den im Kapitel 4.2.3.3 beschriebenen größer angesetzten visuellen *A. radicina*-Infektionsuntersuchungen auf den Wurzelscheiben der Wildtyp-Möhren und der Möhren der Linien 35 und 10 konnten keine signifikante Unterschiede in der Infektionsintensität festgestellt werden (Abb. 3.22 A). Deshalb sind die Unterschiede der Infektionsintensität zwischen den Wurzelscheiben der jeweiligen Linien in diesem Versuch nicht als eine Feststellung des Resistenzniveaus zu betrachten.

In den qPCR-Analysen wurde die relative Expression der *Dau c 1*-Isoformen (*Dau c 1.01* und *Dau c 1.02*), des *DcPRPlike1*-Gens (Akzessionsnummer: AB127984) und des *PR3*-Gens (Akzessionsnummer: AY271253) 0, 6, 12 und 24 Stunden nach der *A. radicina*-Inokulation in den Wurzelscheiben ermittelt. Es ist keine deutliche Hochregulation der relativen Expression der beiden *Dau c 1*-Isoformen nach der *A. radicina*-Infektion in diesen aus der *in vitro*-Kultur stammenden Möhrenwurzelscheiben festzustellen (Abb. 3.16 und 3.17). Eine vergleichbare Hochregulierung der *Dau c 1*-Isoformen, wie in den auf Feld gewachsenen, aus Samen stammenden Wildtyp-Möhrenwurzelscheiben, konnte nicht ermittelt werden (vgl. Abb. 3.14, 3.16 und 3.17).

4.2.2.1 Relative *Dau c 1.01*-Expression

In den Wildtyp-Wurzelscheiben ist die relative *Dau c 1.01*-Expression bei 0 h am höchsten (Abb. 3.16 A). Da es bei diesen Messwerten um Mittelwerte aus einem Gemisch verschiedener Wildtyp-Wurzelscheiben handelt, ist anzunehmen, dass es bei dieser Messung mindestens einen Ausreißer gibt, der den Messwert nach oben verschiebt. Dies ist aber nicht

nachzuweisen, da keine Einzelmesswerte für die Einzelwurzelscheiben vorliegen. Es handelt sich hierbei um eine kurzfristige *Dau c 1.01*-Hochregulation, da in späteren Messpunkten keine vergleichbare Hochregulation vorliegt. Es kann sein, dass in dieser Probe eine oder einige Wurzelscheiben auf das Schneiden der Wurzelscheibe mit einer kurzfristigen *Dau c 1*-Hochregulation reagierten.

Die relative *Dau c 1.01*-Expression steigt in allen Proben, abgesehen von der 0 hai Wert des Wildtyps, mit zunehmender Zeit an (Abb. 3.16). Teilweise ist die relative *Dau c 1.01*-Expression in den Wasser-behandelten Kontroll-Wurzelscheiben deutlich höher als in den inokulierten Wurzelscheiben (Abb. 3.16 A und B bei 24 hai). Diese Möhren sind vor Pathogenen relativ geschützt in Klimakammern und im Gewächshaus gewachsen. Dadurch kann ein *Priming*-Effekt in diesen Möhren weitgehend ausgeschlossen werden. Die Hochregulation in diesen inokulierten Möhren bleibt auch deutlich niedriger als in den Wildtyp-Wurzelscheiben der auf dem Feld gewachsenen Möhren (vgl. 3.16 und 3.14). Der relative *Dau c 1.01*-Expressionslevel liegt in diesen Proben etwa in gleicher Höhe wie in den Wasser-behandelten Wildtyp-Wurzelscheiben der auf dem Feld gewachsenen Möhren (vgl. Abb. 3.16 A und 3.14 A). Dadurch kann man davon ausgehen, dass die Hochregulation in dieser Analyse durch das Schneiden der Wurzelscheiben induziert worden ist. Es ist bekannt, dass durch das Verletzen des Pflanzengewebes *PR10*-Gene induziert werden (Liu et al. 2003). Zudem ist anzunehmen, dass die relative *Dau c 1.01*-Expression nicht allein durch eine *A. radicina*-Infektion induziert wird, sondern eine vorige Sensibilisierung durch andere Pathogene benötigt. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten Wiederholungen dieser Analysen sowie Resistenzanalysen mit einer Vorbehandlung mit Salizylsäure durchgeführt werden. Durch eine Vorbehandlung mit Salizylsäure könnte der *Priming*-Effekt überprüft werden. Eine Salizylsäure-Behandlung führt zur Hochregulation der beiden *Dau c 1*-Isoformen. Die Ergebnisse nach einer Salizylsäure-Behandlung der Möhrenblätter werden in dem Kapitel 4.3 diskutiert. Dass die relative *Dau c 1.01*-Expression nicht durch die *A. radicina*-Infektion hochreguliert wird, kann auch dadurch erklärt werden, dass der *PR10*-Induktionsweg über die Salizylsäure nicht aktiviert worden ist. Dies bestätigt die Aussage von Thomma et al. (1998) und Van Wees et al. (2003), dass die nekrotrophen Pilze wie *A. radicina* in erster Linie nur die Jasmonsäure-abhängige Abwehr induziert. Die Jasmonsäure kann die *PR10*-Synthese ebenso induzieren (McGee et al 2001; Liu et al. 2003), aber wie man in diesem Versuch sieht, kommt es in der Möhre durch die von Pathogenen ausgelöste Jasmonsäuresynthese nicht zu einer *PR10*-Induktion. Um zu überprüfen, ob die *PR10*-Induktion nur durch SA ausgelöst wird, müsste man ähnlich aufgebaute Pathogentests mit

biotrophen Phytopathogenen durchführen, die in erster Linie die salizylsäureabhängigen Abwehrmechanismen der Pflanze aktivieren. In Blättern der Wildtypmöhren konnte eine *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-Hochregulation in der Transkriptionsebene nach einer SA-Behandlung nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.3). Zusätzliche Informationen über den Induktionsweg der *PR10*-Gene der Möhre könnte man auch durch eine Jasmonsäure-Behandlung erhalten. Auffällig ist, dass in den Wurzelscheiben der *Dau c 1.01*-supprimierten Linien 35 und 39 keine Reduktion des *Dau c 1.01* auf der Transkriptionsebene festzustellen ist. In der Proteinebene der gleichen Klonpflanzen dieser Linien zu gleicher Zeit ist der *Dau c 1.01*-Proteingehalt jedoch deutlich reduziert (Abb. 3.10 A). Die RNAi-vermittelte posttranskriptionale Genunterdrückung (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) (Susi et al. 2004) scheint bei diesen Linien nicht wirksam zu sein, da die Boten-RNA (messenger-RNA; mRNA) bereits auf der Transkriptionsebene degradiert bzw. stillgelegt sein müsste. Es ist aber zu einer Translationshemmung gekommen, da auf der Protein-Ebene keine *Dau c 1.01* nachzuweisen ist. Eine Translationshemmung im Zusammenhang mit der RNAi-vermittelten Suppression eines Gens ist nicht bekannt. Eine Translationshemmung in Pflanzen durch Mikro-RNAs (miRNAs) wurde jedoch kürzlich in *Arabidopsis* festgestellt (Lanet et al. 2009). Es gibt aber keinen nachgewiesenen Zusammenhang zwischen der RNAi-vermittelten Suppression und der miRNAs. Dadurch kann nur festgehalten werden, dass die Translation der *Dau c 1.01*-Rest-RNA in diesen zwei *Dau c 1.01*-supprimierten Linien 35 und 39 aus unbekanntem Gründen gehemmt ist.

4.2.2.2 Relative *Dau c 1.02*-Expression

Das Bild der relativen *Dau c 1.02*-Expression gleicht dem der *Dau c 1.01* insofern als keine deutliche *A. radicina*-infektionsabhängige Hochregulation in den meisten Wurzelscheiben festzustellen ist (vgl. Abb. 3.16 und 3.17). Es ist lediglich in den Wurzelscheiben der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 39 12 hai eine Induktion der relativen *Dau c 1.02*-Expression zu sehen (Abb. 3.17 C 12 hai). Diese Hochregulation ist 24 hai noch deutlicher. Warum es allerdings in dieser Linie 39 zu einer induzierten relativen *Dau c 1.02*-Expression kommt und in den anderen Wurzelscheiben nicht, konnte nicht im Rahmen dieses Versuchs festgestellt werden. Es ist möglich, dass diese Pflanzen unter einem anderen Stress, wie z.B. Trocken- oder Wasserstress, vor dem Versuchbeginn gelitten haben. Es ist bekannt, dass Trockenstress die Transkription der *PR10*-Gene induziert (Dubos and Plomion 2001). Die Pflanzen werden gleichmäßig gegossen, aber es ist nicht auszuschließen, dass diese bzw. ein Teil dieser Pflanzen für ihre Verhältnisse zu viel oder zu wenig Wasser bekommen haben.

Dies könnte die Reaktion in den Wurzelscheiben erklären, da es bei diesem Fall zu einem *Priming*-Effekt gekommen sein könnte. Die Pflanzen zeigten keine Krankheitssymptome vor dem Versuch. Die meisten PR-Proteine gehören zu großen Proteinfamilien (Van Loon und Van Strien, 1999), so dass eine funktionelle Redundanz zwischen den Mitgliedern nicht ausgeschlossen werden kann. Da in den Möhren der Linie 39 die *Dau c 1.01*-Isoform deutlich stärker auf der Protein-Ebene unterdrückt ist als in den Möhren der Linie 35 (Tabelle 3.1), ist es möglich das bei diesem Suppressionsgrad das Fehlen der *Dau c 1.01*-Isoform in Stresssituationen zu einer Kompensierung durch die andere Isoform in Form von Hochregulation des *Dau c 1.02*-Gens führt. Die hypoallergenen Möhrenwurzeln sind nicht anfälliger gegenüber dem möhrenpathogenen Pilz *A. radicina* als die Wildtyp-Wurzeln (Abb. 3.22 A). Ähnlich zu diesen Ergebnissen wurde in *Medicago truncatula* eine Hochregulation von zwei Isoformen der PR5b-Proteine in PR10-like-supprimierten Pflanzen nach einer *Aphanomyces euteiches*-Infektion festgestellt (Colditz et al. 2007). Die PR10-like-supprimierten Pflanzen waren auch nicht anfälliger zu der *A. euteiches*-Infektion. Die Wurzelscheiben der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 zeigen eine deutlich niedrigere relative *Dau c 1.02*-Expression als die anderen untersuchten Wurzelscheiben (Abb. 3.17 D). Es ist zu beachten, dass die Skala der y-Achse um das 100-fache niedriger ist als bei den anderen untersuchten Wurzelscheiben. Diese bereits auf der RNA-Ebene vorhandene Suppression bestätigt die ersten *Dau c 1.02*-Suppressionsermittlungen in den Blättern (Abb. 3.9 B).

4.2.2.3 Relative *DcPRPlike1*-Expression

Die relative *Daucus carota* PRPlike1 (*DcPRPlike1*)-Expression wird in den Wildtyp-Wurzelscheiben und in den Wurzelscheiben der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 35 nicht durch die *A. radicina*-Infektion induziert (Abb. 3.18 A und B). Eine *DcPRPlike1*-Induktion nach der *A. radicina*-Infektion ist in den inokulierten und in den H₂O-behandelten Wurzelscheiben der *Dau c 1.01*-supprimierten Linien 39 und der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 festzustellen (Abb. 3.18 C und D). Dadurch ist zu erkennen, dass die relative *DcPRPlike1*-Expression allgemein in den Wurzelscheiben der Linien 39 und 10 nach dem Versuchbeginn hochreguliert wird. Da das *DcPRPlike1*-Gen eine 70-72%ige Homologie zum *Dau c 1*-Gen auf der Nukleotid-Ebene aufweist (Sano et al. 2004), kann angenommen werden, dass dieses Gen eine neue weitere *Dau c 1*-Isoform ist. Bei dem *DcPRPlike1*-Protein (Akzessionsnummer AB127984, Wally et al. 2009 und Jayaraj et al. 2009) handelt es sich nicht, wie der Name vermuten lässt, um ein dem Tabak PR1-Protein ähnliches Protein,

sondern es gehört wie *Dau c 1* zur Klasse der PR10 Proteine. Dies wird ebenfalls durch einen Sequenzvergleich mit PR1 Proteinen von Gerste (*Hordeum vulgare*; PR1a, Akzessionsnummer: X74939.1 und PR1b Akzessionsnummer; X74940.1) (Bryngelsson et al. 1994) und *Arabidopsis* (GenBank NM_127025) deutlich (s. Anhang, Abb. S1). Das *DcPRPlike1*-Gen ist nicht durch die *Dau c 1.01*- oder *Dau c 1.02*-RNAi-Konstrukte unterdrückt worden, da zu kurze (< 21bp) homologe Nucleotidabschnitte zwischen der *DcPRPlike1*-Sequenz und den *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-RNAi-Konstruktsequenzen vorliegen (s. Anhang Abb. S2 und S3). Die homologen Sequenzabschnitte müssen eine Mindestlänge von 21bp haben um eine erfolgreiche RNAi-vermittelte Unterdrückung zu erzielen (Susi et al. 2004). Jedenfalls ist die relative *DcPRPlike1*-Expression in den Wurzelscheiben der Linien 39 und 10 nach dem Versuchsbeginn induziert. Eine ähnliche Hochregulation der *DcPRPlike1*-Transkripte nach einer Elicitor-Behandlung in Möhrenblättern wurde von Jayaraj et al. (2009) und Wally et al. (2009) festgestellt (in beiden Publikationen ist *DcPRPlike1* mit PR1 angegeben). Die *DcPRPlike1*-Induktion in den Wurzelscheiben könnte durch das Schneiden der Wurzelscheiben ausgelöst worden sein, was jedoch unwahrscheinlich ist, da sie nur in den Wurzelscheiben der Linien 39 und 10 beobachtet wurde. Die Wildtyp-Wurzelscheiben und die Wurzelscheiben der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 35 zeigen nur eine leichte Erhöhung der relativen *DcPRPlike1*-Expression mit zunehmender Zeit. Da alle Wurzelscheiben gleich resistent gegenüber der *A. radicina*-Infektion trotz der *Dau c 1*-Isoformunterdrückung sind (Abb. 3.22 A), ist anzunehmen, dass die Funktion der *Dau c 1*-Isoformen durch ein anderes PR-Protein kompensiert wird. Die Ergebnisse aus diesem Versuchsteil weisen darauf hin, dass das verminderte Vorhandensein der *Dau c 1*-Isoformen in den Wurzelscheiben der Linien 39 und 10 zu einer Kompensierung durch das *DcPRPlike1*-Gen führt. Eine Kompensation durch andere PR-Gene und Isoformen nach einer Induzierung durch Salizylsäure-Behandlung wurde von Riviere et al. (2008) in Tabak beobachtet. Sie haben die sauren PR1-Proteine in Tabak RNAi-vermittelt unterdrückt und beobachteten nach einer Salizylsäure-Behandlung der Blätter eine Hochregulation von basischen PR1-Proteinen und der PR2-Proteine. Die systemisch ausgelöste Resistenz (SAR: *systemic acquired resistance*) war nicht in den supprimierten Tabak-Pflanzen gemindert, was darauf hinweist, dass die PR1-Funktion durch andere kompensiert werden kann. Ob die Induktion des *DcPRPlike1*-Gens durch das Schneiden der Wurzelscheiben oder durch die *A. radicina*-Infektion verursacht wurde, spielt hierbei keine große Rolle. Tatsache ist, dass dieses Gen in den Wurzelscheiben der Linien 39 und 10 hochreguliert wird. Da die Induzierung auch in H₂O-behandelten

Kontrollwurzelscheiben der Linien 39 und 10 und auch in den Wurzelscheiben des Wildtyps und der Linie 35 stattfindet, ist eher anzunehmen, dass die Induktion durch das Schneiden der Wurzelscheiben ausgelöst wird, d.h. durch eine Verletzung des Pflanzengewebes. Nach der Kompensationstheorie durch das *DcPRPlike1*-Gen kann gesagt werden, dass durch die starke Suppression des *Dau c 1.01*-Gens in der Linie 39 und die *Dau c 1.02*-Suppression in der Linie 10 das *DcPRPlike1*-Gen stärker induziert wird als in den Wurzelscheiben des Wildtyps und in den Wurzelscheiben der Linie 35 (Abb. 3.18).

4.2.2.4 Relative *PR3*-Expression

Die relative *PR3*-Expression ist in den Wurzelscheiben des Wildtyps und der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 35 und der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 nicht durch die *A. radicina*-Infektion induziert (Abb. 3.19 A, B und D). Nur in den Wurzelscheiben der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 39 ist die relative *PR3*-Expression 24 hai deutlich hochreguliert (Abb. 3.19 C). Dadurch, dass in den *A. radicina*-infizierten Wurzelscheiben der Linie 39 alle untersuchten Gene (*Dau c 1.01*, *Dau c 1.02*, *DcPRPlike1* und *PR3*) 24 hai hochreguliert sind, lässt sich dies auf einen *Priming*-Effekt zurückführen. Die Pflanzen der Linie 39 müssen vor dem Versuchsbeginn unter Stress gewesen sein, ansonsten müsste man das gleiche Transkriptionsmuster bei den anderen hypoallergenen Wurzelscheiben ebenfalls sehen. Da alle Pflanzen nebeneinander im Gewächshaus standen und unter den gleichen Lichtbedingungen gewachsen sind und keine Krankheitssymptome gezeigt haben, kann es nur sein, dass die Pflanzen der Linie 39 für ihre Verhältnisse falsch gegossen wurden und dadurch entweder unter Trocken- oder Wasserstress litten. Diese vorangegangene Sensibilisierung könnte der Grund für die beobachtete Hochregulation der *PR*-Gene in den *A. radicina*-infizierten Wurzelscheiben der Linie 39 24 hai sein. Eigentlich wäre eine Hochregulation des *PR3*-Gens nach der *A. radicina*-Infektion in allen Linien und im Wildtyp zu erwarten gewesen, da die Expression des *PR3*-Gens durch Salizylsäure und Jasmonsäure induziert wird und da die nekrotrophen Pilze wie *A. radicina* die Jasmosäuresynthese in den Pflanzen induzieren (Raskin 1992; Thomma et al. 1998; Van Wees et al. 2003). Ob die *PR3*-Hochregulation abhängig von einer vorangegangenen Sensibilisierung ist, ist nicht bekannt. Diese vorliegenden Ergebnisse weisen aber darauf hin.

4.2.3 VISUELLE RESISTENZANALYSEN DER HYPOALLERGENEN MÖHREN

Die visuellen Resistenzanalysen der hypoallergenen Möhren wurden im Julius-Kühn-Institut Quedlinburg (AG Krämer und AG Nothnagel) durchgeführt. Die Resistenz der Blätter, Petiolen und Wurzeln wurden mit den pilzlichen Pflanzenpathogenen *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko (*A. dauci*), *Alternaria radicina* Meier, Drechsler & Eddy (*A. radicina*) und *Botrytis cinerea* (de Bary) Whetzel (*B. cinerea*) analysiert. Blätter wurden mit *A. dauci*, Petiolen und Wurzeln mit *A. radicina* und *B. cinerea* infiziert. Zusätzlich zu den aus der *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen wurden Wildtyp-Pflanzen aus Samen auf ihre Resistenz gegenüber den genannten Pflanzenpathogenen untersucht. Die Anfälligkeitsanalyse wurde mittels DIAS (Digitales Analyse System) der FA. LemnaTec erfasst und statistisch mit ANOVA ausgewertet (Wilkinson 1998). Hierbei wurde die Infektionsintensität auf den Versuchsobjekten ermittelt.

4.2.3.1 Visuelle Resistenzanalyse der Möhrenblätter

Die Möhrenblätter wurden mit *A. dauci* infiziert und der Infektionsverlauf wurde vor der Infektion (0) und 3, 7 und 9 Tage nach der Inokulation (dai) erfasst. Vor der Infektion sehen alle Blätter gleich aus und ihre Oberfläche zeigt die gleiche Farbgebung (Abb. 3.20 (0 dai)). 3 dai sind die Blätter der aus Samen stammenden Wildtyp-Pflanzen bereits resistenter als die Blätter der aus *in vitro*-Kultur stammenden hypoallergenen und Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.20 3 dai). 7 und 9 dai sind die Blätter der aus Samen stammenden Wildtyp-Pflanzen deutlich resistenter als die der aus *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen (Abb. 3.20 7 und 9 dai). Es ist kein signifikanter Unterschied in der Infektionsintensität der Blätter aus der *in vitro*-Kultur zu erkennen. Die Wildtyp-Blätter der Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur zeigen die gleiche Anfälligkeit gegenüber der *A. dauci*-Infektion wie die *Dau c 1.01*-supprimierten Blätter der Linie 35 und die *Dau c 1.02*-supprimierten Blätter der Linie 10. Es lässt sich feststellen, dass die Blätter der hypoallergenen Möhren nicht anfälliger gegenüber der *A. dauci*-Infektion sind als die Wildtyp-Blätter, obwohl in den hypoallergenen Möhren eine der PR10-Isoformen unterdrückt ist. Die PR10-Proteine würden normalerweise durch eine Pathogeninfektion u.a. in Erbsen, Reis und Pflaumen hochreguliert (Ruiz-Lozano et al. 1999; McGee et al. 2001; Hashimoto et al. 2004; El-kereamy et al. 2009) und spielen dadurch mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Rolle bei der pflanzlichen Abwehr. In den hypoallergenen Möhrenpflanzen kann eine der PR10-Isoformen nicht durch eine pilzliche Infektion hochreguliert werden, da sie RNAi-vermittelt unterdrückt ist. Dies wurde schon im Kapitel 4.2.2 an Möhrenwurzelscheiben mittels qPCR nachgewiesen. Trotzdem sind die

hypoallergenen Möhrenblätter genauso resistent wie die aus der *in vitro*-Kultur stammenden Wildtyp-Möhrenblätter. Diese Tatsache ist ein weiterer Hinweis darauf, dass das Fehlen einer der *Dauc 1*-Isoformen durch ein oder mehrere andere PR-Proteine kompensiert wird, so dass die Pflanzen gleich widerstandsfähig wie die vergleichbaren Wildtyp-Pflanzen bleiben. Auffällig resistenter sind die Blätter der aus Samen stammenden Möhren. Diese Resistenz kann darauf beruhen, dass die Samen dieser Wildtyp-Pflanzen im Gewächshaus ausgesät wurden, im Gewächshaus wuchsen und mit mehreren möglichen Stressfaktoren in Kontakt kamen. Andererseits kann es sein, dass diese aus Samen stammenden Wildtyp-Möhren weniger Stress hatten als die Möhren aus der *in vitro*-Kultur, da sie z.B. in der Erde die natürlicheren Nährstoffe vorfanden als die Möhren in der Gewebekultur, die auf Nährstoffmedium kultiviert wurden. Die Pflanzen waren mit Mehltau befallen bevor sie für diese Resistenzanalysen angesetzt wurden. Die Mehltau-Infektion wurde vor dem Versuchsbeginn beseitigt. Es ist möglich, dass es bei den Möhren aus Samen zu einem *Priming*-Effekt gekommen ist, der die Pflanzen resistenter gemacht hat (Stein et al. 2008). Allerdings hätte es auch bei den Möhren aus der *in vitro*-Kultur zu einem *Priming*-Effekt kommen sollen, da sie gleichzeitig mit den Wildtyp-Möhren aus Samen von Mehltau befallen waren. Der Unterschied in der Infektionsintensität zwischen den Blättern der aus der *in vitro*-Kultur stammenden und der aus Samen stammenden Pflanzen ist 9-fach signifikant. Dieser Unterschied kann nur darauf zurückgeführt werden, dass die Pflanzen aus der *in vitro*-Vermehrung anders auf die *A. dauci*-Infektion reagieren als die Pflanzen aus Samen. Der Grund für die höhere Anfälligkeit der aus der *in vitro*-Kultur stammenden Möhren gegenüber der aus Samen stammenden Pflanzen könnte sein, dass die Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur bereits durch das Überführen in Erde einem mechanischen Stress sowie einem Anpassungsstress an den neuen Lebensraum ausgesetzt wurden und dadurch anfälliger pilzlichen Infektionen gegenüber geworden sind (Mikschofsky et al. 2009).

4.2.3.2 Visuelle Resistenzanalyse der Petiolen

Die Petiolen der *Dauc 1.01*-supprimierten Linie 35 und der *Dauc 1.02*-supprimierten Linie 10 zeigen das gleiche Resistenzniveau nach der *A. radicina*-Infektion wie die Wildtyp-Petiolen der aus der *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen (Abb. 3.21 A). Nur die Wildtyp-Petiolen der aus Samen stammenden Pflanzen sind signifikant resistenter gegenüber der *A. radicina*-Infektion wie die Petiolen der aus der *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen aus den vorher beschriebenen Blatt-Resistenz-Analysen nach der *A. dauci*-Infektion überein (vgl. Abb. 3.20). Die Vermutung von

Mikschofsky et al. (2009), dass mechanischer Stress zusammen mit Adaptionstress an das neue Wachstumsmedium (Erde) Pflanzen aus *in vitro*-Kultur anfälliger gegenüber pilzlichen Pflanzenpathogenen macht, kann tatsächlich der Grund für die erhöhte Anfälligkeit sein. Da die Wildtyp-Petiolen der aus der *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen gleichermaßen anfällig sind wie die *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-supprimierten Möhren, kann der Grund für die höhere Anfälligkeit im Vergleich zu den aus Samen stammenden Wildtyp-Pflanzen nur in der Kultivierungsform liegen. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste man Samen aus den hypoallergenen Möhren erzeugen und diese Untersuchungen mit den aus Samen stammenden Wildtyp- und transgenen Möhren wiederholen.

Auch nach der *Botrytis cinerea*-Infektion sind die Petiolen der aus der *in vitro*-Kultur stammenden Pflanzen stärker befallen als die Petiolen der aus Samen stammenden Wildtyp-Möhren (Abb. 3.21 B). Die *Dau c 1.01*-supprimierte Linie 35 zeigt 9 dai hierbei eine um 20% niedrigere Infektionsintensität als die Petiolen der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 und die Wildtyp-Petiolen der aus der *in vitro*-Kultur stammenden Möhren. Die niedrigste Infektionsintensität 9 dai ist bei den Wildtyp-Petiolen der aus Samen stammenden Möhren zu sehen. Sie zeigen eine etwa 30% niedrigere Infektionsintensität als die Wildtyp-Petiolen aus der *in vitro*-Kultur. Dabei ist der Unterschied in der Infektionsintensität 9 dai zwischen den Petiolen der aus der *in vitro*-Kultur stammenden und der aus Samen stammenden Möhrenpetiolen signifikant, nicht jedoch Unterscheid zwischen den Petiolen der aus der *in vitro*-Kultur stammenden Möhren.

4.2.3.3 Visuelle Resistenzanalyse der Wurzeln

Die Infektionsintensität nach der *A. radicina*-Infektion ist 13 dai auf allen Wurzelscheiben gleich hoch (3.22). Hierbei spielt die Herkunft der Möhren, ob aus der *in vitro*-Kultur oder aus Samen, keine Rolle. Da die *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-supprimierten Möhren die gleiche Resistenz wie die Wildtyp-Möhrenwurzelscheiben zeigen, kann angenommen werden, dass die Funktion der unterdrückten *Dau c 1*-Isoform durch andere Gene kompensiert wird oder dass die einzelnen PR10-Isoformen keine relevante Wirkung bei der *A. radicina*-Infektion aufweisen. Es sind weitere Untersuchungen diesbezüglich notwendig. Unter anderem müssten beide *Dau c 1*-Isoformen gleichzeitig in einer Möhre unterdrückt sein um ein klareres Bild über ihre Funktion im pflanzlichen Immunsystem zu erhalten.

Die Infektionsintensität nach der *B. cinerea*-Infektion ist geringer als nach der *A. radicina*-Infektion (vgl. Abb. 3.22 A und B). 13 Tage nach der *B. cinerea*-Infektion ist von

4.3.1 RELATIVE EXPRESSION DES *DAU C 1.01*-GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG

Wie zu erwarten war, wird die *Dau c 1.01*-Transkription in den Wildtyp-Blättern nach der Salizylsäure-Besprühung induziert (Abb. 3.23 A). Die *Dau c 1.01*-Transkriptionhochregulation ist 24 und 48 Stunden nach Behandlung in den SA-besprühten Wildtyp-Blättern deutlich zu sehen. Wie schon in der *Alternaria radicina*-Kinetik an Wurzelscheiben gibt es hier auch bei 0 hat einen auffällig hohen relativen *Dau c 1.01*-Transkriptionslevel in den H₂O-behandelten Wildtyp-Blättern (vgl. Abb. 3.16 und 3.23). Es ist anzunehmen, dass in mindestens einem Blatt die relative *Dau c 1.01*-Transkription bereits vor dem Versuchsbeginn induziert war und den Messwert erhöht hat. In den Blättern der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 35 ist über die gesamte Versuchslaufzeit kaum eine Induktion in der relativen *Dau c 1.01*-Expression festzustellen (Abb. 3.23 B). Dies deutet auf eine erfolgreiche *Dau c 1.01*-Suppression in diesen Blättern hin. Bei der RNAi-vermittelten Suppression handelt es sich um einen *knockdown* eines Gens (Broedersen and Voinnet, 2006). Dabei wird das Zielgen unterdrückt und nahezu komplett stillgelegt. Bei der Linie 35 ist das *Dau c 1.01*-Gen zu 70% unterdrückt (Tab. 3.1). Bei diesem Suppressionsgrad kann man noch, wie man auch in diesem Versuch sieht, eine Restmenge an *Dau c 1.01*-Transkripten ermitteln. In den Blättern der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 ist 48 hat etwa die gleiche relative *Dau c 1.01*-Expression wie in den Wildtyp-Blättern zu sehen (vgl. Abb. 3.23 A und C 48 hat).

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass in den Wildtyp-Blättern und in den Blättern der Linie 10 eine *Dau c 1.01*-Induktion durch die SA-Behandlung stattfindet und funktionsfähig ist und in den Blättern der Linie 35 die *Dau c 1.01*-Induktion durch die *Dau c 1.01*-Suppression erfolgreich unterdrückt ist.

4.3.2 RELATIVE EXPRESSION DES *DAU C 1.02*-GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG

Auch hier ist in den H₂O-behandelten Wildtyp-Blättern die relative *Dau c 1.02*-Expression in mindestens einem Blatt vor dem Versuchsbeginn hochreguliert. Da es sich bei diesen Messwerten um Mittelwerte aus einem Gemisch von fünf Wildtyp-Blättern handelt, ist anzunehmen, dass es bei dieser Messung mindestens einen Ausreißer gibt, der den Messwert nach oben verschiebt, wie auch in der Ermittlung der relativen *Dau c 1.01*-Expression in den H₂O-behandelten Wildtyp-Blättern 0 hat festgestellt wurde (vgl. Abb. 3.23 A und 3.24 A 0 hat). Die *Dau c 1.02*-Induktion durch die SA-Behandlung ist 48 hat in den Wildtyp-Blättern deutlich zu sehen (Abb. 3. 24 A). In den Blättern der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 35 ist

der relative *Dau c 1.02*-Expressionslevel allgemein höher als in den Wildtyp-Blättern (Abb. 3.24 A und B). Die *Dau c 1.02*-Transkription ist sowohl in den H₂O-behandelten Blättern wie auch in den SA-behandelten Blättern der Linie 35 induziert. Dies kann auf eine Kompensation der *Dau c 1.01*-Unterdrückung hindeuten. Eine deutliche Hochregulation ist 24 hat in den SA-behandelten Blättern der Linie 35 zu sehen. In den Blättern der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 bleibt die relative *Dau c 1.02*-Exprssion nahezu unbeeinflusst von der SA-Behandlung (Abb. 3.24 C). 48 hat ist eine sehr geringe relative *Dau c 1.02*-Expression in den SA-behandelten Blättern nachzuweisen. Es ist trotz der noch gerade nachweisbaren relativen *Dau c 1.02*-Expression in den Blättern der Linie 10 festzustellen, dass das *Dau c 1.02*-Gen erfolgreich in den Pflanzen dieser Linie unterdrückt ist.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die Transkription des *Dau c 1.02* in Wildtyp-Blättern und in den Blättern der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 35 durch die SA-Behandlung induziert wird. Der hohe relative *Dau c 1.02*-Expressionslevel in den H₂O- und SA-behandelten Blättern der Linie 35 deutet auf eine Kompensationsreaktion auf das unterdrückte *Dau c 1.01* hin. In den Blättern der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 ist das *Dau c 1.02* erfolgreich supprimiert und die *Dau c 1.02*-Suppression ist nicht durch eine SA-Behandlung aufzuheben und somit als stabil zu betrachten.

4.3.3 RELATIVE EXPRESSION DES *DcPRPLIKE1*-GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG

DcPRlike1-Transkripte werden in allen Proben detektiert (Abb. 3.25). Eine deutliche Hochregulation in der relativen *DcPRlike1*-Expression ist in den Wildtyp-Blättern 48 Stunden und in den Blättern der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 neun Stunden nach der SA-Behandlung beobachten (Abb. 3.25 A 48 hat und C 9 hat). In den Blättern der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 35 ist keine deutliche auf die SA-Behandlung zurückführbare *DcPRlike1*-Induktion zu sehen (Abb. 3.25 B). Da das *DcPRlike1*-Gen ein homologes Gen zu *Dau c 1* ist (Sano et al. 2004), kann es durchaus durch SA wie die *Dau c 1*-Gene induziert werden (Liu, X et al. 2006). Dies kann auch in den Wildtyp-Blättern und in den Blättern der Linie 10 in diesem Versuch nachgewiesen werden. In den Blättern der Linie 10 kann die erhöhte relative *DcPRlike1*-Expression auf eine Kompensierung des unterdrückten *Dau c 1.02* hinweisen. Es wurde bereits in der *A. radicina*-Kinetik in den Wurzelscheiben der Linie 10 eine *DcPRlike1*-Induzierung festgestellt (Kapitel 4.2.2.3; Abb. 3.18D). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass das *DcPRlike1*-Gen in den Wurzeln sowie in den Blättern der Linie 10 nach einer Pilzinfektion und nach einer SA-Behandlung hochreguliert

wird, während das *Dau c 1.02*-Gen supprimiert bleibt. Diese Ergebnisse sind auch ein Hinweis darauf, dass die *Dau c 1.02*-Suppression durch die Hochregulation des *DcPRPlike1*-Gens in den Pflanzen der Linie 10 kompensiert wird. Die Blätter und die Wurzeln der Linie 10 sind nicht anfälliger gegen Pilzbefall als die Wildtyp-Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur (Abb. 3.20 und 3.22). Diese Ergebnisse ähneln den Ergebnissen von Riviere et al. (2008). Riviere et al. haben die sauren *PR1*-Gene in Tabak supprimiert, und durch eine SA-Behandlung wurden in diesen Pflanzen die basischen *PR1*-Gene wahrscheinlich als Kompensation hochreguliert.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die SA-Behandlung die *DcPRPlike1*-Gene in den Wildtyp-Blättern und in den Blättern der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 hochreguliert. In den Blättern der Linie 35 bleibt die *DcPRPlike1*-Induktion aus, was darauf hinweist, dass in den Pflanzen dieser Linie die *DcPRPlike1*-Induktion gestört ist oder dass die *Dau c 1.01*-Suppression durch andere PR-Proteine kompensiert wird, so dass die *DcPRPlike1*-Gene nicht hochreguliert werden müssen. In den Wurzeln dieser Linie 35 bleibt die *DcPRPlike1*-Induktion ebenso aus wie in den Blättern (vgl. Abb. 3.18 B und 3.25 B). Durch das *Dau c 1.01*-RNAi-Konstrukt kann das *DcPRPlike1*-Gen selber nicht unterdrückt werden, da das *Dau c 1.01*-RNAi-Konstrukt sich zu stark von der *DcPRPlike1*-Sequenz unterscheidet (s. Anhang Abb. S2). Wenn es zu einer *DcPRPlike1*-Unterdrückung durch das *Dau c 1.01*-RNAi-Konstrukt kommen würde, müsste das *DcPRPlike1*-Gen auch in der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 39 stattfinden. Dies ist aber nicht der Fall, zumindest nicht in den Wurzeln (Abb. 3.18 C).

4.3.4 RELATIVE EXPRESSION DES *PR3*-GENS NACH SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG

Die Transkription des *PR3*-Gens wird in den Wildtyp-Blättern nicht durch die SA-Behandlung induziert (Abb. 3.26 A). Die relative *PR3*-Expression bleibt in den H₂O-behandelten und in den SA-besprühten Wildtyp-Blättern über die gesamte Versuchszeit gleichmäßig. Das *PR3*-Gen wird nicht in erster Linie durch SA induziert, sondern durch Jasmonsäure (JA), wie bereits in *Arabidopsis* und in Reis (*Oryza sativa*) gezeigt wurde (Thomma et al. 1998; Mei et al. 2006). Die Ergebnisse zeigen, dass die *PR3*-Induzierung auch in *Daucus carota* nicht SA-abhängig ist. Interessanterweise gibt es eine *PR3*-Induktion in den Blättern der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 35 und in den Blättern der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 (Abb. 3.26 B und C). Eine deutlich höhere relative *PR3*-Expression ist in den Blättern der Linie 35 24 Stunden und in den Blättern der Linie 10 bereits neun Stunden

nach der SA-Besprühung festzustellen. Da das *PR3*-Gen normalerweise nicht durch Salizylsäure induziert wird, muss diese Hochregulation einen anderen Grund haben. Es ist bekannt, dass die Salizylsäure die Synthese von JA-induzierten Proteinase-Inhibitoren in Tomatenblättern hemmt (Doares et al. 1995). Die JA-induzierten *PR3*-Gene werden aber nicht durch die SA-Behandlung in den *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-supprimierten Möhrenblättern gehemmt. Nur in den Wildtypblättern ist keine *PR3*-Induktion zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die *PR3*-Induktion in den *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-supprimierten Möhrenblättern mit der Suppression zusammenhängt. Ob es sich hierbei um eine Kompensierungsreaktion handelt, kann nicht sicher gesagt werden, aber diese Ergebnisse lassen es nicht ausschließen.

4.4 SKIN-PRICK-TEST AN PATIENTEN MIT MÖHRENALLERGIE

Die *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-supprimierten Möhren sowie die aus der *in vitro*-Kultur stammenden Wildtyp-Möhren wurden von unserer Kooperationspartnerin Frau Prof. Vera Mahler in der Hautklinik des Universitätsklinikums Erlangen an Patienten mit nachgewiesener Möhrenallergie in Form von Skin-Prick-Tests getestet (Peters et al. eingereicht). Das *Dau c 1* ist das Hauptallergen der Möhre (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999) und die meisten Möhrenallergiker reagieren auf dieses Protein allergisch. Etwa 50% der Patienten erfahren systemische Reaktionen (Ballmer-Weber et al., 2001; Moneo et al., 1999). Hier werden die Ergebnisse der Skin-Prick-Tests an zwei Patienten mit Möhrenallergie vorgestellt. Der Patient 1 ist gegen die *Dau c 1.02*-Isoform monosensibilisiert und der Patient 2 ist gegen beide *Dau c 1*-Isoformen allergisch, d.h. polysensibilisiert.

Patient 1 zeigt eine allergische Hautreaktion auf die Wildtypmöhren, wobei die Hautreaktion auf die einzelnen Wildtyppflanzenklone unterschiedlich stark ausfällt (Abb. 3.27). So ist die Hautreaktion auf die Wildtyppflanzenklone eins und zwei relativ gering im Durchmesser und auf die Wildtyppflanzenklone drei, vier und fünf im Durchmesser größer. Diese Ergebnisse zeigen einerseits eine mögliche Variabilität des Allergengehalts zwischen den einzelnen Wildtyppflanzenklonen. Andererseits kann die Variabilität ihren Ursprung aus den unterschiedlichen Stellen auf dem Unterarm des Patienten haben. Da schon zwischen den Wildtyppflanzenklonen eine Variabilität festzustellen ist, ist auch eine Variabilität zwischen den einzelnen Pflanzenklonen der *Dau c 1.01*- bzw. *Dau c 1.02*-supprimierten Pflanzenklone zu erwarten. Patient 1 zeigt eine reduzierte allergische Hautreaktion auf Proteinextrakte der Pflanzenklone eins, zwei und fünf der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 35. Eine reduzierte Hautreaktion ist auch auf den Pflanzenklon 1 der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 39 zu sehen.

Gegen diese Pflanzenklone der Linien 35 und 39 wäre eine wildtyppflanzen-ähnliche allergische Hautreaktion zu erwarten gewesen, da in diesen Möhreklonen die *Dau c 1.02*-Isoform nicht supprimiert ist und da dieser Patient nur auf die *Dau c 1.02*-Isoform allergisch ist. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass wahrscheinlich unterschiedliche Mengen an *Dau c 1.02*-Protein in den einzelnen *Dau c 1.01*-supprimierten Möhrenklonen vorhanden sind. Signifikante Unterschiede in der *Dau c 1.02*-Transkriptionsmenge in verschiedenen Wildtyp-Möhren wurden auch von Zagon et al. (2010) nachgewiesen. Gegen die *Dau c 1.02*-supprimierten Linien 10 und 33 ist eine deutlich reduzierte Hautreaktion bei diesem Patient zu erwarten, da er nur auf die *Dau c 1.02*-Isoform nachweislich allergisch ist (Mahler, unveröffentlicht). Dies ist aber nicht der Fall. Der Patient zeigt eine reduzierte Hautreaktion nur gegen die *Dau c 1.02*-supprimierten Möhrenklone eins und vier der Linie 10 und gegen den Möhrenklon eins der Linie 39. Von jeder Möhre, die in dieser Arbeit für die Skin-Prick-Tests verwendet wurden, wurde auch der *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-Proteingehalt mittels Westernblot ermittelt (Abb. 3.10). In den Westernblot war in den *Dau c 1.01*-supprimierten Möhren kein *Dau c 1.01*-Protein nachzuweisen und in den *Dau c 1.02*-supprimierten Möhren konnte nur in den Möhren der Linie 33 das *Dau c 1.02*-Protein schwach detektiert werden. Daher ist anzunehmen, dass es ein weiteres ähnliches, noch unentdecktes Allergen in den Möhren gibt zusätzlich zu *Dau c 1.01* und *1.02*. Weitere Möhrenallergene sind Profilin (*Dau c 4*) und Glycoproteine mit einem Molekulargewicht von 40 zu 60 kDa, welche allerdings noch nicht ausführlich charakterisiert wurden (Ballmer-Weber et al., 2001, 2005). Der Patient 1 ist jedoch gegen das *Dau c 4* nicht allergisch (Mahler, unveröffentlicht). Das *DcPRPlike1* ist aber ein Kandidat für ein weiteres Allergen der Möhre. Es besitzt mit 70 bis 72%iger Homologie zu *Dau c 1* (Sano et al. 2004) auch sehr wahrscheinlich ein allergenes Potenzial. Es ist in den *Dau c 1.02*-supprimierten Möhren der Linie 10 nach einer *Alternaria radicina*-Infektion in den Wurzelscheiben sowie nach einer SA-Behandlung in den Blättern hochreguliert (Abb. 3.18 und 3.25). Wenn das *DcPRPlike1* in der Zukunft als ein neues Allergen der Möhre bestätigt wird, könnte es sein, dass dieser Patient 1 zusätzlich zu seiner *Dau c 1.02*-Allergie auch eine Allergie gegen das *DcPRPlike1*-Protein hat und deswegen eine allergische Hautreaktion gegen die *Dau c 1.02*-supprimierten Möhren zeigt. Die allergischen Hautreaktionen des Patienten 1 können nicht durch die *Dau c 1.02*-Isoform ausgelöst sein, da das *Dau c 1.02*-Protein in den Möhren der Linie 10 nachweislich auf der Proteinebene unterdrückt ist (Abb. 3.10 B und Tabelle 3.1). Da die Möhre noch nicht durchsequenziert worden ist, können noch mehrere unentdeckte Allergene in der Möhre vorhanden sein.

Patient 2 reagiert gegen beide Dau c 1-Isoformen allergisch (Mahler, unveröffentlicht). Bei dem Skin-Prick-Test zeigt Patient 2 keine reduzierte Hautreaktion. Weder gegen die Dau c 1.01-supprimierten noch gegen die Dau c 1.02-supprimierten Möhren (Abb. 3.28). Dies ist auch zu erwarten gewesen, da die *Dau c 1.01*-supprimierten Möhren noch das Dau c 1.02-Protein beinhalten und die *Dau c 1.02*-supprimierten Möhren das Dau c 1.01-Protein enthalten. Um bei Patient 2 eine reduzierte Hautreaktion gegenüber den hypoallergen Möhren zu erzielen, müsste man beide Dau c 1-Isoformen gleichzeitig in einer Möhre supprimieren. Es wäre auch für viele Möhrenallergiker wichtig, dass beide Dau c 1-Isoformen supprimiert werden, da in einer Studie mit rekombinanten Dau c 1.01- und Dau c 1.02-Proteinen und mit Patientenseren etwa 65% der Patienten eine allergische Reaktion gegen das Dau c 1.01-Protein und 38% gegen das Dau c 1.02-Protein zeigen (Ballmer-Weber et al. 2005). Diese Studie wurde mit rekombinanten Dau c 1.01- und Dau c 1.02-Proteinen und mit Patientenseren durchgeführt. Bei den Möhrenallergikern bei unseren Skin-Prick-Tests war nur ein Patient monosensibilisiert gegen das Dau c 1.02-Protein. Alle neun weiteren Möhrenallergiker reagierten auf beide, Dau c 1.01 und Dau c 1.02, allergisch. Diese Ergebnisse wurden zum Teil mit Seren der Patienten durchgeführt und sind im nächsten Kapitel beschrieben.

4.5 IgE-REAKTIVITÄTSANALYSE

Die IgE-Reaktivitätsanalyse wird häufig bei Untersuchung des Allergenpotenzials verschiedener Allergenquellen verwendet, wie z.B. bei Apfel und Sellerie (Ebner et al. 1995) und bei der Tomate (Westphal et al. 2004; Lorenz et al. 2006). Auch bei der Determinierung des Allergenpotenzials der Dau c 1-Isoformen mit Wildtypmöhren wurde diese Analysemethode angewandt (Ebner et al. 1995; Ballmer-Weber et al. 2001, 2005; Reese et al. 2007; Peters et al. eingereicht).

Die IgE-Reaktivitätsanalysen wurden von unseren Kooperationspartnern am Paul-Ehrlich-Institut in Langen (AG Vieths) durchgeführt. Es wurden die IgE-Bindungsreaktionen von 10 Patientenseren an Möhrenwurzelproteinextrakten der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 39 (Abb. 3.29 B) und der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 33 (Abb. 3.29 C) sowie der aus der *in vitro*-Kultur stammenden Wildtypmöhren untersucht (Abb. 3.29 A). Als eine Negativ-Kontrolle wurde Serum eines Nicht-Allergikers mitgestestet. Das Serum des Nicht-Allergikers reagiert überhaupt nicht auf die Möhrenproteinextrakte. Dies bedeutet, dass in diesem Serum keine IgEs gegen die Möhrenallergene vorhanden sind. Nur einer der Patienten ist monosensibilisiert und zwar gegen die Dau c 1.02-Isoform. Alle weiteren Patienten sind

polysensibilisiert gegen die beiden Dau c 1-Isoformen. Das Serum des monosensibilisierten Patienten zeigt keine IgE-Bindung, weder an den Wildtypwurzelproteinextrakten noch an den Wurzelproteinextrakten der Dau c 1.01- bzw. Dau c 1.02-supprimierten Linien (Abb. 3.29 jeweils die Spalte 1). Im Serum dieses Patienten scheinen keine IgEs gegen die Dau c 1-Isoformen vorhanden zu sein, obwohl er in anderen Tests eine Allergie gegen das Dau c 1.02-Protein zeigt (Mahler, unveröffentlicht). Die Seren aller polysensiblen Patienten zeigen eine IgE-Bindungsreaktion an ein Protein in der Größe von ~16 kDa in den Wildtypwurzelproteinextrakten (Abb. 3.29 A Spalten 2-10). Diese Größe ist für das Dau c 1 bekannt (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999). Eine sehr deutliche IgE-Bindungsreaktion an das ~16 kDa-Protein der Wildtypwurzelproteinextrakte gibt es bei den Seren der Patienten zwei und neun (Abb. 3.29 A Spalten 2 und 9). Diese Patienten zwei und neun leiden nach diesen Ergebnissen an einer sehr deutlich ausgeprägten Möhrenallergie. Auffallend sind die zusätzliche IgE-Bindungsreaktion an die Wildtypwurzelproteinextrakt im hochmolekularen Bereich um die 64 kDa der Seren der Patienten zwei, drei, vier, sechs, neun und zehn. Diese können zum Teil weitere Möhrenallergene wie Profilin (Dau c 4) und Glycoproteine mit einem Molekulargewicht von 40 bis 60 kDa sein, die noch nicht ausführlich charakterisiert worden sind (Ballmer-Weber et al., 2001, 2005). Es ist aus diesen IgE-Bindungsreaktionen im hochmolekularen Bereich festzustellen, dass weitere Möhrenallergene vorhanden sind.

Hochmolekulare bis heute nicht charakterisierte Möhrenallergene wurden auch von Fernández-Rivas et al. (2004) festgestellt. Die IgE-Bindungsreaktionen an hochmolekularen Proteinen sind auch in den Wurzelproteinextrakten der *Dau c 1.01*- und *Dau c 1.02*-supprimierten Möhren festzustellen (Abb. 3.29 B und C). An das Wurzelproteinextrakt der Dau c 1.01-supprimierten Linie 39 bei der ~16 kDa Größe gibt es eine IgE-Bindung nur in den Seren der Patienten zwei und neun, die die stärkste IgE-Bindungsreaktion an das ~16 kDa Protein in den Wildtypwurzelproteinextrakten gezeigt haben (Abb. 3.29 B Spalten 2 und 9). Ob die IgEs diese Seren der Patienten zwei und neun an das restliche Dau c 1.01-Protein oder an das Dau c 1.02-Protein binden, kann anhand dieser Analyse nicht festgestellt werden. Da das Dau c 1.02-Protein in dem Wurzelproteinextrakt der Linie 39 noch vorhanden ist, wäre es zu erwarten gewesen, dass das Serum aller polysensiblen Patienten eine IgE-Bindungsreaktion an das Dau c 1.02-Protein in der Größe ~16 kDa gezeigt hätte. Dies ist aber nicht der Fall. Daher ist anzunehmen, dass das Dau c 1.02-Protein nur in sehr geringen Mengen in den hier eingesetzten Möhren der Linie 39 vorhanden ist. Alle Seren der Patienten zeigen eine sehr ähnliche IgE-Bindungsreaktion an die Proteine der Wurzelproteinextrakte der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 33 wie an die Wildtypwurzelproteinextrakte (vgl. Abb. 3.29

A und C). Es ist bei der Proteingröße ~16 kDa jeweils in den Spalten 2-10 eine IgE-Bindung zu sehen. In den Möhren der Linie 33 ist das Dau c 1.01-Protein noch vorhanden. Es kann anhand dieser Analyse nicht ermittelt werden, ob die IgEs der Seren 2-10 an das restliche Dau c 1.02-Protein oder das in vollem Umfang vorhandene Dau c 1.01-Protein binden. Ob die leichten Banden bei ~20 kDa in den Spalten 2, 7 und 9 in den IgE-Reaktionen mit den Wildtypwurzelpoteinextrakten das DcPRPlike1-Protein ist, kann erst in der Zukunft festgestellt werden (Abb. 3.29 A). Das DcPRPlike1-Protein hat eine Größe von etwa 19,5 kDa (Sano et al. 2004).

Zusammengefasst kann anhand dieser Analysen gesagt werden, dass in den Möhren neben dem Hauptallergen Dau c 1 auch weitere hochmolekulare Proteine vorhanden sind, mit denen die Seren der Patienten eine Antikörperreaktion zeigen und dadurch Allergene sein können. Die Stärke der IgE-Bindungsreaktion ist in den Seren der Patienten an die Möhrenallergene individuell stark und abhängig von der Sensibilität der einzelnen Patienten. Des Weiteren ist die IgE-Bindungsreaktion an die Dau c 1-Proteine in der Dau c 1.01-supprimierten Linie 39 am schwächsten, was diese Möhren in Bezug auf die IgE-Reaktivität der Patientenserum als hypoallergen bezeichnen lässt. Die hochmolekularen, offensichtlich allergenen Proteine, die in dieser IgE-Reaktivitätsanalyse nachgewiesen wurden, können auch in den Skin-Prick-Tests zu den kaum geminderten Hautreaktionen führen, da trotz der Dau c 1-Isoformsupprimierung weitere Proteine zu allergischen Reaktionen führen können. Es sind noch weitere Analysen zu allergenen Proteinen der Möhre notwendig, da hier nachgewiesen werden konnte, dass auf jeden Fall weitere Allergene in den Möhren vorhanden sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

5.1 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Herstellung von hypoallergenen Möhren (*Daucus carota*) mittels der RNA Interferenz-Technologie (RNAi) und mit der Analyse der Anfälligkeit dieser Möhren gegenüber mikrobiellen Phytopathogenen. Der Fokus der Arbeit lag auf dem Möhrenprotein Dau c 1. Es kommt in zwei Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 vor. Das Dau c 1 ist das Hauptallergen der Möhre und gehört gleichzeitig der Familie der Pathogenese-assoziierten Proteine 10 (PR10) an. Etwa 98% der Möhrenallergiker reagieren auf dieses Protein allergisch. Die Hauptursache für diese Möhrenallergie ist eine Kreuzallergie mit Birkenpollen. Die Funktion des Dau c 1-Proteins für das Möhrenimmunsystem und die Möhrenentwicklung ist weitgehend unbekannt. In anderen Pflanzen konnten diverse Funktionen für die PR10-Proteine festgestellt werden, wie z.B. Ribonuklease- und antigungale Aktivität.

Um die Funktion der Dau c 1-Isoformen untersuchen zu können, wurden beide Isoformen, Dau c 1.01 und Dau c 1.02, unabhängig voneinander mittels RNAi in der Möhre (*Daucus carota* spp. *sativus*) des Kultivars Rodelika supprimiert. Es konnten zum ersten Mal deutlich suppressierte hypoallergene Möhren regeneriert werden. Eine im Vergleich zu Wildtypmöhrenblättern ~10-fache Reduktion der jeweiligen Isoform lag in den Blättern der RNAi-Pflanzen vor. Die deutliche Reduktion der jeweils unterdrückten Dau c 1-Isoform wurde auch proteinbiochemisch mit spezifischen Antikörpern in den Dau c 1.01- und Dau c 1.02-supprimierten Möhrenwurzeln festgestellt. Die meisten Pflanzen entwickelten sich wie Wildtyppflanzen und zeigten keine Phänotypänderungen. Bei zwei unabhängigen Linien konnte eine Morphologieänderung der Blätter beobachtet werden, die vermutlich Insertionsartefakte darstellten.

Es konnte in Resistenzanalysen nachgewiesen werden, dass die hypoallergenen Möhren nicht anfälliger gegenüber den pilzlichen Phytopathogenen *Alternaria dauci*, *Alternaria radicina* und *Botrytis cinerea* sind. Diese drei Pilze verursachen den größten agronomischen Schaden an der Möhrenernte. Es findet auch keine Hochregulation der *Dau c 1*-Isoformen nach *Alternaria radicina*-Befall statt. Dies kann damit zusammenhängen, dass diese nekrotrophen Pilze nicht die Salizylsäure-abhängige (SA) Abwehr der Pflanze aktivieren, die die PR10-Transkription nachweislich induziert. Die unbeeinträchtigte Besiedlung der RNAi-Pflanzen legt nahe, dass die Dau c 1-Isoformen nicht an der Abwehr der getesteten Pathogene beteiligt sind bzw. dass verwandte PR-Proteine in den Dau c 1.01-supprimierten bzw. in den Dau c 1.02-supprimierten Möhren kompensatorisch wirken. Für Letzteres spricht, dass in den

Resistenzanalysen Hinweise auf eine Kompensation durch die Proteine DcPRPlike1 und PR3 vorlagen. Durch eine SA-Behandlung der Blätter konnte nachgewiesen werden, dass die Dau c 1 Isoformen in den hypoallergenen Möhren durch SA induzierbar waren. Hierbei zeigte sich eine Hochregulation der jeweils nicht supprimierten Isoform.

An Patienten durchgeführte Skin-prick-Tests mit RNAi-Möhren zeigten, dass es zu einer reduzierten allergischen Hautreaktion bei Personen kam, die monosensibilisiert gegenüber einer der beiden Dau c 1-Isoformen waren. In den IgE-Bindungsreaktionen mit Patientenserum konnte eine deutlich reduzierte IgE-Reaktion mit den Dau c 1.01-supprimierten Möhrenproteinextrakten gegen das Dau c 1-Protein festgestellt werden. Des Weiteren konnten in den IgE-Bindungsreaktionen gegen Dau c 1-Isoformen weitere, noch nicht charakterisierte, hochmolekulare Möhrenproteine festgestellt werden.

5.2 SUMMARY

The main allergenic protein Dau c 1 of carrots (*Daucus carota*) causes an allergic reaction by 98% of people who suffer from carrot allergy. The main reason for this allergy is a cross-reaction between Dau c 1 and Bet v 1, the main allergen of Birch pollen. Dau c 1 is not alone a main allergen, it also belongs to the pathogenesis-related protein family 10 (PR10). Two isoforms Dau c 1.01 and Dau c 1.02 of Dau c 1 exist. The function of Dau c 1 in carrot development and in carrot defence strategies is unknown. In other plants, many different functions of PR10 were detected, e.g. ribonuclease activity and antifungal activity. In the work at hand, hypoallergenic carrots were generated for the first time. This was achieved by the use of the RNA interference technology.

The functions of the two Dau c 1 isoforms in carrots were analysed in these hypoallergenic carrots in relation to their function in pathogen defence. The isoforms were silenced separately in carrots of the cultivar Rodelika. For the first time clearly silenced hypoallergenic carrots were generated. In the leaves a ~10-fold reduction of each isoform was determined. An evident reduction of each suppressed isoform was also determined protein-biochemically by the use of the respective specific Dau c 1.01 and Dau c 1.02 antibodies in roots. Most of the plants developed as wild type carrots and no phenotypical changes were detected. Only in two independent lines morphological changes of the leaves were noticed. These changes are presumably artifacts of the insertion.

The analysis of the resistance stage showed that the hypoallergenic carrots are not more susceptible to the plant pathogen *Alternaria dauci*, *Alternaria radicina* and *Botrytis cinerea* than wild-type carrots. These tree fungi cause the largest agronomical damages in carrot crop. No up-regulation of Dau c 1 isoforms was detected after a *Alternaria radicina* challenge. This can result from the fact that these necrotrophic fungi do not activate the salicylic acid-dependant (SA) defense of the plant which verifiably induces the PR10 transcription. The unimpaired colonisation of the RNAi-plants suggests that the Dau c 1 isoforms do either not participate in the defense of the tested pathogens or that related PR proteins have a compensatory function in the Dau c 1.01 / Dau c 1.02 suppressed carrots. The latter is more probable as the resistance analyses indicated a compensation by the proteins DcPRPlike1 and PR3. A SA-treatment of the leaves was able to prove that the Dau c 1 isoforms in the hypoallergenic carrots were inducible by SA. The SA-treatment showed an up-regulation of the respective non-suppressed isoform.

Skin-prick-tests with RNAi-carrots performed with patients showed a reduced allergic skin reaction with patients who were monosensitized against one of the two Dau c 1 isoforms.

A clearly reduced IgE-reaction with the Dau c 1.01-suppressed carrot-protein-extracts against the Dau c 1-protein were detected in the IgE binding reactions with sera of patients. Further, not yet characterized, high-molecular carrot proteins were detected in the IgE binding reactions against Dau c 1 isoforms.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S. and Van Loon, L.C.** (1980) Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of Tobacco infected with TMV. *J. gen. Virol.* 47:79-87
- Ballmer-Weber, B.K., Wüthrich, B., Wangorsch, A., Fötisch, K., Altmann, F. und Vieths, S.** (2001) Carrot allergy: Double-blinded, placebocontrolled food challenge and identification of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108:301-307
- Ballmer-Weber, B.K., Wangorsch, A., Bohlen, B., Kaul, S., Kündig, T., Fötisch, K., van Ree, R. und Vieths, S.** (2005) Component-resolved in vitro diagnosis in carrot allergy: Does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure? *Clin. Exp. Allergy.*, 35:970-978
- Ballmer-Weber, B.K.** (2008) Pollenassoziierte Nahrungsmittelallergien. *Ernährung*, 2:10-15
- Baranski, R., Krämer, R. and Klocke, E.** (2006) A Laboratory Leaf Assay of Carrot Susceptibility to *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathology* 154: 637-640
- Baulcombe, D.** (2004) RNA silencing in plants. *Nature.* 431:356-363
- Ben-Noon, E., Shtienberg, D., Shlevin, E. and Vintal, H.** (2001) Optimization of Chemical Suppression of *Alternaria dauci*, the Causal Agent of Alternaria Leaf Blight in Carrots. *Plant Disease.* 85:1149-1156
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J.** (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409:363-366
- Blaschke, J.R., Forche, E. and Neumann, K.H.** (1978) Investigations on the cell cycle of haploid and diploid tissue cultures of *Datura innoxia* Mill. and its synchronisation. *Planta.* 144: 7-12
- Bohle, B.** (2007) The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy.* 62:3-10
- Bohle, B., Radakovics, A., Jahn-Schmid, B., Hoffmann-Sommergruber, K., Fischer, G.F. and Ebner, C.** (2003) Bet v 1, the major birch pollen allergen, initiates sensitization to Api g 1, the major allergen in celery: evidence at the T cell level. *Eur. J. Immunol.* 33: 3303-3310
- Bohle, B., Zwölfer, B., Heratizadeh, A., Jahn-Schmid, B., Antonia, Y.D., Alter, M., Keller, W., Zuidmeer, L., van Ree, R., Werfel, T. and Ebner, C.** (2006) Cooking birch pollen-related food: Divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity *in vitro* and *in vivo*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118:242-249
- Börner, H.** (2009) Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 8. neu bearbeitete und aktualisierte Auflage
- Breda, C., Sallaud, C., El-Turk, J., Buffard, D., de Kozak, I., Esnault, R. and Kondorosi, A.** (1996) Defence reaction in *Medicago sativa*: a gene encoding a class 10 PR protein is expressed in vascular bundles. *MPMI.* 9:713-719
- Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O. and Breitenbach, M.** (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* 8(7):1935-1938

- Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., O’Riordain, G., Susani, M., Ahorn, H., Ebner, C., Kraft, D. and Scheiner, O.** (1995) Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens. *Eur. J. Biochem.* 233:484-489
- Breiteneder, H. and Radauer, C.** (2004) A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113:821-830
- Broedersen, P. and Voinnet, O.** (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *TRENDS in Genetics.* 22(5):268-280
- Bryngelsson, T., Sommer-Knudsen, J., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Ek, B. and Thordal-Christensen, H.** (1994) Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis-related proteins from barley. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7(2):267-275
- Capesius, I. und Bopp, M.** (1974) Nachweis der DNA-Synthese in Hypokotylen und Cotyledonen gehemmter und nicht gehemmter Keimlinge von *Sinapis alba*. *Planta.* 118: 171-181
- Chadha, P. and Das, R.H.** (2006) A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. *Planta.* 225:213-222
- Chen, Z.Y., Brown, R.L., Damann, K.E. and Cleveland, T.E.** (2010) PR10 expression in maize and its effect on host resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Mol. Plant Pathol.* 11:69-81
- Christensen, A.B., Cho, B.H., Naesby, M., Gregersen, P.L., Brandt, J., Madriz-Ordenana, K., Collinge, D.B. and Thordal-Christensen, H.** (2002) The molecular characterisation of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related protein. *Mol. Plant Pathol.* 3:134-144
- Colditz, F., Niehaus, K. and Krajinski, F.** (2007) Silencing of PR-10-like proteins in *Medicago truncatula* results in an antagonistic induction of other PR proteins and in an increased tolerance upon infection with the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Planta.* 226:57-71
- Constabel, C.P. and Brisson, N.** (1995) Stigma- and vascular-specific expression of the PR10a gene of potato: a novel pattern of expression of a pathogenesis-related gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:104-113
- Coquoz, J.-L., Buchala, A. and Métraux, J.-P.** (1998) The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiol.* 117:1095-1101
- Dean, J.V., Mohammed, L.A. and Fitzpatrick, T.** (2005) The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta.* 221:287-296
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. and Ryals, J.** (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science.* 266: 1247-1250
- Doares, S.H., Narváez-Vásquez, J., Conconi, A. and Ryan, C.A.** (1995) Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* 108:1741-1746

- Dodo, H.W., Konan, K.N., Chen, F.C., Egnin, M. and Viquez, O.M.** (2008) Alleviating peanut allergy using genetic engineering: the silencing of the immunodominant allergen Ara h 2 leads to its significant reduction and a decrease in peanut allergenicity. *Plant Biotechnology Journal*. 6:135-145
- Dreborg, S. and Foucard, T.** (1983) Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy*. 38: 167-172
- Dubos, C. and Plomion, C.** (2001) Drought differentially affects expression of a PR-10 protein, in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings. *J. Exp. Bot.* 52:1143-1144
- Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breitender, H., Valenta, R., Ebner, H., Kraft, D. and Scheiner, O.** (1995) Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollenallergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J. Allergy Clin. Immunol.* 95:962-9
- Edreva, A.** (2005) Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiology*. 31:105-124
- El-kereamy, A., Jayasankar, S., Taheri, A., Errampalli, D. and Paliyath, G.** (2009) Expression analysis of a plum pathogenesis related 10 (PR10) protein during brown rot infection. *Plant Cell Rep.* 28:95-102
- Etesamifar, M. And Wüthrich, B.** (1998) IgE-mediated food allergies including oral allergy syndrome in 383 patients. *Allergologie*. 21(9):451-457
- Farrar, J.J., Pryor, B.M. and Davis, R.M.** (2004) *Alternaria* diseases of carrot. *Plant Disease*. 88(8): 776-784
- Fernández-Rivas, M.,González-Mancebo, E., Van Leeuwen, W.A. and Van Ree, F.L.R.** (2004) Anaphylaxis to raw carrot not linked to pollen allergy. *Allergy*. 59:1239-1240
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. und Mello, C.C.** (1998) Potent and specific genetic interference by doppel-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-811
- Flores,T., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M. and Flores, H.E.** (2002) Ocatin. A novel tuber storage protein from the Andean tuber crop oca with antibacterial and antifungal activities. *Plant Physiol.* 128:1291-1302
- Froese, C. and Neumann, K.H.** (1997) The influence of kinetin on the protein synthesis pattern at some stages of the cell cycle of regenerative synchronized cell suspension cultures of *Daucus carota* L. *Angew. Bot.* 71:11-115
- Fusaro, A.F., Matthew, L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Dedic-Hagan, J., Ellacott, G.A., Watson, J.M., Wang, M.-B., Brosnan, C., Carroll, B.J. and Waterhouse, P.M.** (2006) RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO reports*. 7:1168-1175
- Gabelman, W.H., Goldman, I.L. and Breitbach, D.N.** (1994) Field-evaluation and selection for resistance to Aster Yellows in carrot (*Daucus-carota* L). *J. of the American society for Horticultural Science*. 119(6):1293-1297
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J.** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*. 261:754-756

- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and K. Ojimai** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158
- Gilissen, L.J.W.J., Bolhaar, S.T.H.P., Matos, C.I., Rouwendal, G.J.A., Boone, M.J., Krens, F.A., Zuidmeer, L., van Leeuwen, A., Akkerdaas, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Knulst, A.C., Bosch, D., van de Weg, W.E. and van Ree, R.** (2005) Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 115:364-369
- Glazebrook, J.** (2005) Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205-227
- Gomez, M., Curiel, G., Mendez, J., Rodriguez, M. and Moneo, I.** (1996) Hypersensitivity to carrot associated with specific IgE to grass and tree pollens. *Allergy.* 51:425-429
- Goodliffe, J.P. and Heale, J.B.** (1978) The role of 6-methoxy mellein in the resistance and susceptibility of carrot root tissue to the cold-storage pathogen *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant Pathology.* 12:27-43
- Greenberg, J.T.** (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 48:525-545
- Grzebelus, D., Baranski, R. and Reby, E.** (2003) A laboratory petiole assay of carrot susceptibility to *Alternaria radicina*. *Folia Horticulturae* 15:41-48
- Guo, B., Chen, X., Dang, P., Scully, B.T., Liang, X., Holbrook, C.C., Yu, J. and Culbreath, A.K.** (2008) Peanut gene expression profiling in developing seeds at different reproduction stages during *Aspergillus parasiticus* infection. *BMC Developmental Biology.* 8:12
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J.** (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 404:293-296
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. and Hannon, G.J.** (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science.* 293:1146-1150
- Hashimoto, M., Kisseleva, L., Sawa, S., Furukawa, T., Komatsu, S. and Koshiba, T.** (2004) A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant Cell Physiol.* 45:550-559
- Hoffmann-Sommergruber K.** (2000) Plant Allergens and Pathogenesis-Related Proteins. What Do They Have in Common? *Int Arch Allergy Immunol.* 122:155-166
- Hoffmann-Sommergruber K.** (2002) Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochemical Society Transactions.* 30(6):930-935
- Hoffmann-Sommergruber K., O'Riordain, G., Ahorn, H., Ebner, C., Laimer da Camara Machando, M., Pühringer, H., Scheiner, O., and Breiteneder, H.** (1999) Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1. *Clin. Exp. Allergy.* 29:840-847
- Imani, J., Berting, A., Nitsche, S., Schäfer, S., Gerlich, W.H. und Neumann, K.-H.** (2002) The integration of a major hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression in regenerated carrot plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 71:157-164

- International Rice Genome Sequencing Project:** The Map-Based Sequence of the Rice Genome, Nature. 2005, 436:793-800
- Jayaraj, J., Rahman, M., Wan, A. and Punja, Z.K.** (2009) Enhanced resistance to foliar fungal pathogens in carrot by application of elicitors. Ann. Appl. Biol. 155:71-80
- Jellouli, N., Jouira, H.B., Daldoul, S., Chenennaoui, S., Ghorbel, A., Salem, A.B. and Gargouri, A.** (2010) Proteomic and Transcriptomic Analysis of Grapevine PR10 Expression During Salt Stress and Functional Characterization in Yeast. Plant Mol. Biol. Rep. 28:1-8
- Karimi, M., Inze, D. und Depicker, A.** (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. Trends Plant Sci. 7:193-195
- Katilé, S.O., Perumal, R., Rooney, W.L., Prom, L.K. and Magill, C.W.** (2010) Expression of pathogenesis-related protein PR-10 in sorghum floral tissues in response to inoculation with *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata*. Molecular Plant Pathology 11(1):93-103
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B.** (1987) Biological function of "pathogenesis-related" proteins: four PR proteins of tobacco have β -1,3-glucanase activity. EMBO J., 6, 3209-3212
- Kazemi-Shirazi, L., Pauli, G., Purohit, A., Spitzauer, S., Fröschl, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Breiteneder, H., Scheiner, O., Kraft, D. and Valenta, R.** (1999) Quantitative IgE inhibition experiments with purified recombinant allergens indicate pollen-derived allergens as the sensitizing agents responsible for many forms of plant food allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 105:116-125
- Klucher, K.M., Chow, H., Reiser, L. and Fischer, R.L.** (1996) The *AINTEGUMENTA* Gene of Arabidopsis Required for Ovule and Female Gametophyte Development Is Related to the Floral Homeotic Gene *APETALA2*. The Plant Cell. 8:137-153
- Krämer, R., Nothnagel, T., Rabenstein, F., Ehrig, F. and Baranski, R.** (2007) Assessment of resistance to *Alternaria* spp. In carrot (*Daucus carota* L.). 32nd International Carrot Conference, Arcachon (Bordeaux), France, Abstracts, p. 46
- Krämer, R., Nothnagel, T. and Rabenstein, F.** (2008) Digitale Bildanalyse zur Bewertung der Resistenz von *Daucus* und *Rhododendron* gegen pilzliche Pathogene. Mitt. Julius Kühn-Institut, 56. Deutsche Pflanzenschutztagung, Kiel, 22.-25.09.2008, 419-420
- Krämer, R., Nothnagel, T. and Rabenstein, F.** (2009) Comparison of resistance response of carrot accessions (*Daucus carota* L.) to *Alternaria dauci* and *A. radicina*. 33rd International Carrot Conference, Anaheim (Los Angeles), USA, <http://groups.ucanr.org/carrotconf2009/index.cfm>
- Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., Brodersen, P., Crété, P., Voinnet, O. and Robaglia, C.** (2009) Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis MicroRNAs. The Plant Cell. 21:1762-1768
- Le, L.Q., Mahler, V., Lorenz, Y., Scheurer, S., Biemelt, S., Vieths, S. und Sonnewald, U.** (2006) Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Lyc e 1-silenced transgenic tomato plants. J. Allergy. Clin. Immunol. 118:1176-1183
- Lee, H.-I., León, J. and Raikoin, I.** (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. Prog. Natl. Acad. Sci. USA. 92:4076-4079

- Lee, H.-I., León, J. and Raikina, I.** (1999) Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase from Tobacco. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(51):36637-36642
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. and Fritig, B.** (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6750-6754
- Li, T. and Neumann, K.-H.** (1985) Embryogenesis and endogenous hormone content of cell cultures of some carrot varieties (*Daucus carota* L.) *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 98:227-235
- Lin, X., Hwang, G.-J.H. and Zimmerman, J.L.** (1996) Isolation and Characterization of a Diverse Set of Genes from Carrot Somatic Embryos. *Plant Physiol.* 11:1365-1374
- Liu J.-J. and Ekramoddoullah, A.K.M.** (2003) Root-specific expression of a western white pine PR10 gene is mediated by different promoter regions in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 52:103-120
- Liu, J.-J. and Ekramoddoullah, A.K.M.** (2006) The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68:3-13
- Liu, J.-J., Ekramoddoullah, A.K.M. and Yu, X.** (2003) Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold-hardening. *Physiol. Plant* 119:544-553
- Liu, J.-J., Ekramoddoullah, A.K.M., Piggott, N. and Zamani, A.** (2005) Molecular cloning of a pathogen/wound-inducible PR10 promoter from *Pinus monticola* and characterization in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta*. 221:159-169
- Liu, X., Huang, B., Lin, J., Fei, J., Chen, Z., Pang, Y., Sun, X. and Kexuan Tang, K.** (2006) A novel pathogenesis-related protein (SsPR10) from *Solanum surattense* with ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress- and pathogen-inducible. *Journal of Plant Physiol.* 163:546-556
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*. 25:402-408
- Lo, S.-C.C., Hipskind, J.D. and Nicholson, R.L.** (1999) cDNA Cloning of a Sorghum Pathogenesis-Related Protein (PR-10) and Differential Expression of Defense-Related Genes Following Inoculation with *Cochliobolus heterostrophus* or *Colletotrichum sublineolum*. *MPMI* 12(6):479-489
- Lorenz, Y., Enrique, E., LeQuynh, L., Fötisch, K., Retzek, M., Biemelt, S., Sonnewald, U., Viehls, S. and Scheurer, S.** (2006) Skin prick tests reveal stable and heritable reduction of allergenic potency of gene-silenced tomato fruits. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118:711-718
- Ma, Y., Liu, L., Zhu, C., Sun, C., Xu, B., Fang, J., Tang, J., Luo, A., Shouyun Cao, S., Li, G., Qian, Q., Xue, Y. and Chu, C.** (2009) Molecular analysis of rice plants harboring a multi-functional T-DNA tagging system. *J. Genet. Genomics* 36:267-276
- Markovic-Housley, Z., Degano, M., Lamba, D., von Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S., Susani, M., Ferreira, F., Scheiner, O. and Breiteneder, H.** (2003) Crystal Structure of a Hypoallergenic Isoform of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 and its Likely Biological Function as a Plant Steroid Carrier. *J. Mol. Biol.* 325:123-133

- Markovic-Housley, Z., Basle, A., Padavattan, S., Maderegger, B., Schirmer, T. and Hoffmann-Sommergruber, K.** (2009) Structure of the major carrot allergen Dau c 1. *Acta Cryst. D65*, 1206-1212
- Mauch-Mani, B. and Slusarenko, A.J.** (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell*. 8:203-212
- McGee, J.D., Hamer, J.E. and Hodges, T.K.** (2001) Characterization of a *PR-10* pathogenesis-related gene family induced in Rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *MPMI*. 14(7):877-886
- McKinney, E.C., All, N., Traut, A., Feldmann, K.A., Belostotsky, D.A., McDowell, J.M. and Meegher, R.B.** (1995) Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mutants *act2-1* and *act4-1*. *The Plant Journal* 8(4):613-622
- Mei, C., Qi, M., Sheng, G. and Yang, Y.** (2006) Inducible Overexpression of a Rice Allene Oxide Synthase Gene Increases the Endogenous Jasmonic Acid Level, *PR* Gene Expression, and Host Resistance to Fungal Infection. *MPMI*. 19(10):1127-1137
- Meier, F. C., Drechsler, C. and Eddy, E. D.** (1922) Black rot of carrots caused by *Alternaria radicina* n.sp. *Phytopathology* 12: 421-423
- Mersereau, M., Pazour, G.J. and Das, A.** (1990) Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene* 90 (1); 149-151
- Mikschofsky, H., Mann, G. and Broer, I.** (2009) Soil adaptation of transgenic *in vitro* carrot plantlets. *Journal of Agricultural Science*. 147:43-49
- Moiseyev, G.P., Beintema, J.J., Fedoreyeva, L.I. and Yakovlev, G.I.** (1994) High sequence similarity between a ribonuclease from *ginseng* calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases. *Planta*.193:470-472
- Moiseyev, G.P., Fedoreyeva, L.I., Zhuravlev, Y.N., Yasnetskaya, E., Jekel, P.A. and Beintema, J.J.** (1997) Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses: New members of the *PR-10* family of intracellular pathogenesis-related plant proteins. *FEBS Letters*. 407(2):207-210
- Moneo, I., Gomez, M., Sanchez-Monge, R., Alday, E., de las Heras, M., Esteban, I., Bootello, A. and Salcedo, G.** (1999) Lack of crossreaction with Bet v 1 in patients sensitized to Dau c 1, a carrot allergen. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 83:71-75
- Muñoz, C., Hoffmann, T., Escobar, N.M., Ludemann, F., Botella, M.A., Valpuesta, V. and Schwab, W.** (2010) The Strawberry Fruit Fra a Allergen Functions in Flavonoid Biosynthesis. *Molecular Plant*. 3(1):113-124
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R.** (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *The Plant Cell*. 2:279-289
- Neudecker, P., Achweimer, K., Nerkamp, J., Scheurer, S., Vieths, S., Stich, H. and Rosch, P.** (2001) Allergenic cross-reactivity made visible: solution structure of major cherry allergen Pru av 1. *J. Biol. Chem.* 276(25): 22756-22763
- Nothnagel, T. and Baranski, R.** (2005) Evaluation of *Daucus* genetic resources for resistance to leaf fungal diseases. *Umbelliferae Improvement Newsletter* 15:7-9

- Nothnagel, T. and Krämer, R.** (2007) Establishment of a digital image analysis system for resistance tests against various carrot pathogens. 32nd International Carrot Conference, Arcachon (Bordeaux), France, Abstracts, p. 98
- Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.-H.** (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 313:810-812
- Pant, B. and Manandhar, S.** (2007) In vitro propagation of carrot (*Daucus carota*) L. *Scientific world*. 5(5):51-53
- Park, C.-J., Kim, K.-J., Shin, R., Park, J.M., Shin, Y.-C. and Peak, K.-H.** (2004) Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *The Plant Journal* 37:186-198
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Métraux, J.-P. and Broekaert, W.F.** (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 10:2103-2113
- Peters, S., Imani, J., Mahler, V., Foetisch, K., Paulus, K., Scheurer, S., Vieths, S. and Karl-Heinz Kogel, K.-H.** (eingereicht) Reduced allergenicity of carrot roots harvested from *Dau c 1.01* and *Dau c 1.02*-silenced transgenic carrot plants. *Transgenic Research* eingereicht.
- Pinto, M.P., Ribeiro, A., Regalado, A.P., Rodrigues-Pousada, C. and Ricardo, C.P.P.** (2005) Expression of *Lupinus albus* PR-10 proteins during root and leaf development. *Biologia Plantarum*. 49(2):187-193
- Pryor, B.M. and Gilbertson, R.L.** (2001) A PCR-based Assay for Detection of *Alternaria radicina* on Carrot Seed. *Plant Disease*. 85(1):18-23
- Raskin, I.** (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:439-463
- Reese, G., Ballmer-Weber, B.K., Wangorsch, A., Randow, S. and Viehls, S.** (2007) Allergenicity and antigenicity of wild-type and mutant, monomeric, and dimeric carrot major allergen *Dau c 1*: Destruction of conformation, not oligomerization, is the roadmap to save allergen vaccines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:944-951
- Riviere, M.-P., Marais, A., Ponchet, M., Willats, W. and Galiana, E.** (2008) Silencing of acidic pathogenesis-related PR-1 genes increases extracellular β -(1 \rightarrow 3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions. *Journal of Experimental Botany* 59(6):1225-1239
- Roehr, C.C., Edenharter, G., Reimann, S., Ehlers, I., Worm, M., Zuberbier, T. and Niggemann, B.** (2004) Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clin. Exp. Allergy*. 34:1534-1541
- Ruiz-Lozano, J.M., Roussel, H., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V.** (1999) Defense genes are differentially induced by a Mycorrhizal fungus and *Rhizobium* sp. in Wild-Type and symbiosis-defective pea genotypes. *MPMI* 12(11):976-984
- Samanani, N., Liscombe, D.K. and Facchini, P.J.** (2004) Molecular cloning and characterization of norcochlorogenic acid synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal*. 40:302-313
- Sanders, P.R., Winter, J.A., Bamason, A.R., Rogers, S.G. and Fraley, R.T.** (1987) Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Research*. 15(4):1543-1558

- Sano, T., Nishimoto, M., Saburi, W., Kimura, A., Yasuda, H., Uchibatake, M., Ohwada, T. and Masuda, H.** (2004) Isolation and characterization of cDNA encoding P-19.5 protein accumulated preferentially at early stage of carrot somatic embryogenesis. *Plant Science* 167:1211-1217
- Sicherer, S.H.** (2001) Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108:881-890
- Sikorski, M.M., Biesiadka, J., Kasperska, A.E., Kopcińska, J., Łotocka, B., Golinowski, W. and Legocki, A.B.** (1999) Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules. *Plant Science.* 149:125-137
- Simmons, E. G.** (1995) *Alternaria* themes and variations (112-144). *Mycotaxon* 55:55-163
- Sitte, P., Weiler, E.W., Kadereit, J.W., Bresinsky, A. und Körner, C.** (2002) Strasburger Lehrbuch der Botanik. 35. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Tylkowska K., Grabarkiewicz-Szczęsna, J., Szopińska, D. and Dorna, H.** (2005) Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Additives and Contaminants.* 22(4):302-308
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Kawalleck, P. and Hahlbrock, K.** (1988) Gene structure and in situ transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley. *Mol. Gen. Genet.* 213:93-98
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., 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. and Pieterse, C.M.J.** (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell.* 15:760-770
- Srivastava, S., Emery, R.J.N., Kurepin, L.V., Reid, D.M., Fristensky, B. and Kav, N.N.V.** (2006) Pea PR 10.1 is a ribonuclease and its transgenic expression elevates cytokinin levels. *Plant Growth Regul.* 49:17-25
- Staats, M., van Baarlen, P. and van Kan, J.A.L.** (2005) Molecular phylogeny of the pathogenic Genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol. Biol. and Evolution.* 22(2):333-346
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. and Jones, J.D.G.** (1995) Molecular-genetics of plant-disease resistance. *Science.* 268:661-667
- Stein, E., Molitor, A., Kogel, K.-H. and Waller, F.** (2008) Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhiza fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiol.*, 49:1747-1751
- Steward, F.C., Ammirato, P.V. and Mapes, M.O.** (1970) Growth and Development of Totipotent Cells, Some Problems, Procedures, and Perspectives. *Ann. Bot.* 34:761-787
- Susi, P., Hohkuri, M., Wahlroos, T. and Kilby, N.J.** (2004) Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Molecular Biology* 54:157-174
- The *Arabidopsis* Genome Initiative:** Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* (2000) 408:796-815
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P. and 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.* 8;95(25):15107-15111

- Tinland, B.** (1996) The Integration of T-DNA into Plants Genomes, *Trends Plant Sci.* 1:178-184
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. and Ryals, J.** (1992) Acquired Resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell.* 4:645-656
- Van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N.M. and Stuitje, A.R.** (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell.* 2:291-299
- Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer da Camara-Machando, M., Susani, M., Ebner, C., Kraft, D., Scheiner, O. and Breiteneder, H.** (1995) Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1 and Bet v 2 (birch profiling). *J. Allergy Clin. Immunol.* 95:962-969
- Van Loon, L.C.** (1985) Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 4:111-116
- Van Loon, L.C. and Van Kammen A.** (1970) Polyacrylamide Disc Electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. *Virology.* 40:199-211
- Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T. and Conejero, V.** (1994) Recommendation for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12:245-264
- Van Loon, L.C. und Van Strien, E.A.** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.*, 55:85-97
- Van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J.** (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-62
- Van Wees, S.C.M., Chang, H.-S., Zhu, T. and Glazebrook, J.** (2003) Characterization of the early response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. *Plant Physiology.* 132:606-617
- Verberne, M.C., Hoekstra, J., Bol, J.F. and Linthorst, H.J.M.** (2003) Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *The Plant J.* 35:27-32
- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., Van Montagu, M. and Schell, J.** (1975) Characterization of different plaque-forming and detective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *J. gen. Virol.* 26:33-48
- Viehts, S., Scheurer, S. and Ballmer-Weber, B.** (2002) Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 964:47-68
- Vigers, A.J., Roberts, W.K. and Selitrennikoff, C.P.** (1991) A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4:315-323
- Vlot, A.C., D'Maris Amick Dempsey, D.A. and Klessig, D.F.** (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:177-206
- Wagenitz, G.** (2003) Wörterbuch der Botanik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, zweite, erweiterte Auflage
- Wally, O., Jayaraj, J. and Punja, Z.K.** (2009) Broad-spectrum disease resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens in transgenic carrots (*Daucus carota* L.) expressing an Arabidopsis *NPRI* gene. *Planta.* 231:131-141

- Walter, M.H., Liu, J.-W., Grand, C., Lamb, C.J. and Hess, D.** (1990) Bean pathogenesis-related (PR) proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. *Mol. Gen. Genet.* 222:353-360
- Walter, M.H., Liu, J.-W., Wunn, J. and Hess, D.** (1996) Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (*Ypr1 0*) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. *Eur. J. Biochem.* 239:281-293
- Wang, C.-S., Huang, J.-C. and Hu, J.-H.** (1999) Characterization of two subclasses of PR-10 transcripts in lily anthers and induction of their genes through separate signal transduction pathways. *Plant Molecular Biology.* 40:807-814
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P. and Ryals, J.A.** (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell.* 3:1085-1094
- Wensing, M., Akkerdaas, J.H., van Leeuwen, W.A., Stapel, S.O., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Aalberse, R.C., Bast, B.J.E.G., Knulst, A.C. and van Ree, R.** (2002) IgE to Bet v 1 and profilin: Crossreactivity patterns and clinical relevance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110:435-442
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.-B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G. and Waterhouse, P.M.** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal.* 27(6):581-590
- Westphal, S., Kempf, W., Foetisch, K., Retzek, M., Vieths, S. and Scheurer, S.** (2004) Tomato profilin Lyc e 1: IgE cross-reactivity and allergenic potency. *Allergy.* 59:526-532
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. and Ausubel, F.M.** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature.* 414:562-571
- Wilkinson, L.** (1998) SYSTAT 9.0 for Windows: Statistics. SPSS Inc., Chicago
- Winkler, R.G., Frank, M.R., Galbraith, D.W., Feyereisen, R. and Kenneth A. Feldmann, K.A.** (1998) Systematic Reverse Genetics of Transfer-DNA-Tagged Lines of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 118:743-750
- Wiweger, M., Farbos, I., Ingouff, M., Lagercrantz, U. and von Arnold S.** (2003) Expression of Chia4-Pa chitinase genes during somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 393:2691-2699
- Xie, Y.-R., Chen, Z.-Y., Brown, R. L., Bhatnagar, D.** (2010) Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology* 167:121-130
- Xu, P., Blancaflor, E.B. and Roossinck, M.J.** (2003) In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with *Cucumber mosaic virus* and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. *MPMI.* 16(6):467-476
- Yamamoto, M., Torikai, S. and Oeda, K.** (1997) A Major Root Protein of Carrots with High Homology to Intracellular Pathogenesis-Related (PR) Proteins and Pollen Allergens. *Plant Cell Physiol.* 38:1080-1086

- Yan, Q., Qi, X., Jiang, Z., Yang, S. and Han, L.** (2008) Characterization of a pathogenesis-related class 10 protein (PR-10) from *Astragalus mongholicus* with ribonuclease activity. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:93-99
- Yun, J. and Katelaris, C.H.** (2009) Food allergy in adolescents and adults. *Internal Medicine Journal* 39:475-478
- Zagon, J., Jansen, B., Knoppik, M., Ehlers, A., Kroh, L.W., Holzhauser, T., Vieths, S. and Broll, H.** (2010) Gene transcription analysis of carrot allergens by relative quantification with single and duplex reverse transcription real-time PCR. *Anal Bioanal Chem.* 396:483-493
- Zubini, P., Zambelli, B., Musiani, F., Ciurli, S., Bertolini, P. and Baraldi, E.** (2009) The RNA hydrolysis and the cytokinin binding activities of PR-10 proteins are differently performed by two isoforms of the Pru p 1 peach major allergen and are possibly functionally related. *Plant Physiology.* 150:1235-1247
- Zuberbier, T., Edenharter, G., Worm, M., Ehlers, I., Reimann, S., Hantke, T., Roehr, C.C., Bergmann, K.E. and Niggemann, B.** (2004) Prevalence of adverse reactions to food in Germany – a population study. *Allergy.* 59:338-345

7 ANHANG

7.1 SEQUENZEN UND VEKTORKARTEN

7.1.1 SEQUENZEN DER RNAi-KONSTRUKTE

Sequenz des Dau c 1.01-RNAi-Konstrukts für die Suppression des Dau c 1.01 und dessen Varianten:

Transformationssequenz der Dau c 1.01-RNAi (253 bp)

```
ATGGGTGCCAGAGCCATTCACCTCGAGATCACTTCTTCCGTCTCAGCAGAGAAAATATTCAGCGGC
ATTGTCCTTGATGTTGATACAGTTATCCCCAAGGCTGCCCTGGAGCTTACAAGAGTGTTCGATGTTA
AAGGAGATGGTGGAGCTGGGACCGTCAGAATTATCACCTTCCCGAAGGTAGCCCGATCACCTCAA
TGACGGTTAGAAGTATGATGCAGTCAACAAGGAGGCTTGACATACGACTCCACCG
```

Sequenz des Dau c 1.02-RNAi-Konstrukts für die Suppression des Dau c 1.02:

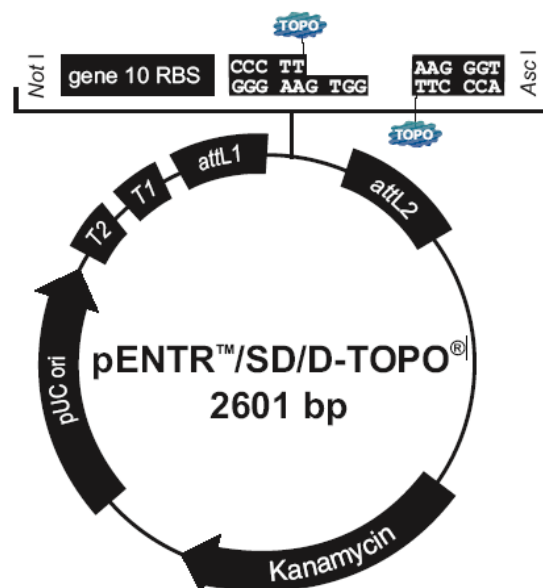
Transformationssequenz der Dau c 1.02-RNAi (267 bp)

```
GTATCAGGGATTTCTCCTTGATATGGACACTGTTTTCCCAAGGTTCTTCCTCAGCTTATCAAGAGT
GTCGAGATTCTTGAGGGCGATGGTGGTGTGGAAACCGTCAGACTCGTCCATCTTGGCGAAGCAACT
GAATATAACCACAATGAAGCAAAAAGGTAGACGTAATCGACAAGGCCGATTAGGCTACACCTACAC
CACCATCGGAGGTGACATCCTCGTGGAAGGACTCGAATCCGTGGTGAATCAATTCGTTGTTGTGCC
AAC
```

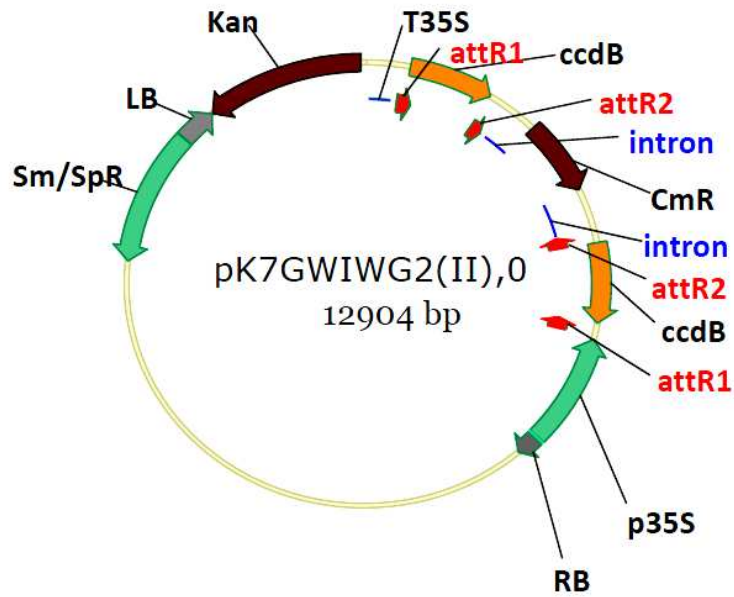
7.1.2 VEKTORKARTEN

Eingangs (*Entry*-) und Ziel (*Destination*)-Vektor pENTR/D-TOPO bzw. pK7GWIWG2(II) zur Erstellung der RNAi-Konstrukte. Der Eingangsvektor wurde von Invitrogen und der Zielvektor von Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB) Gent, Belgien (Karimi et al., 2002) bezogen.

Entry-Vektor pENTR/D-TOPO:

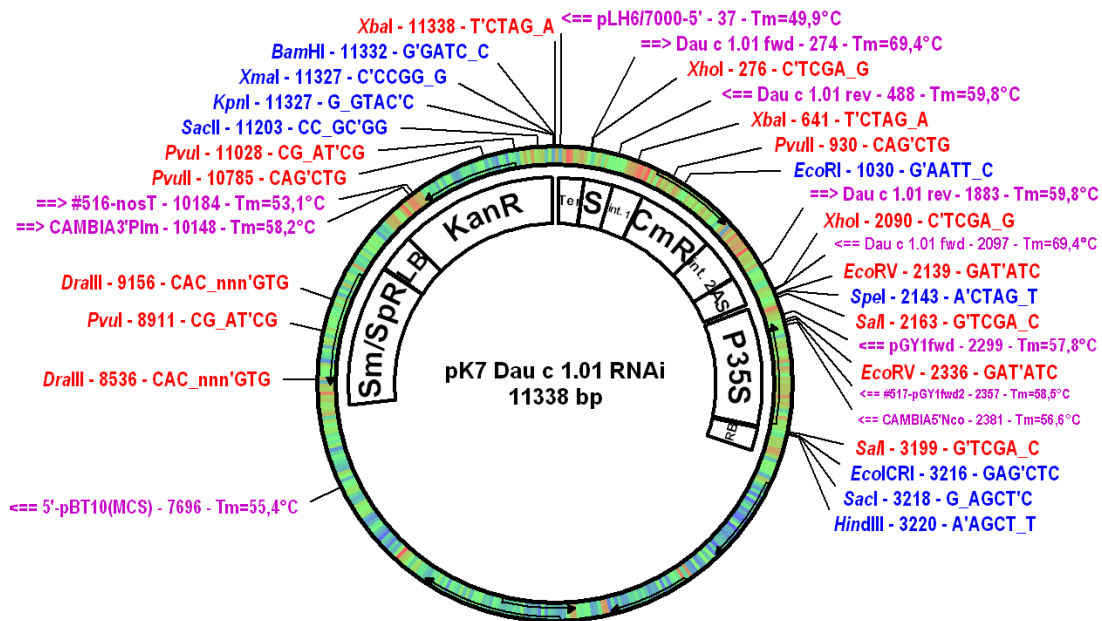


Destinations-Vektor pK7GWIWG2(II):

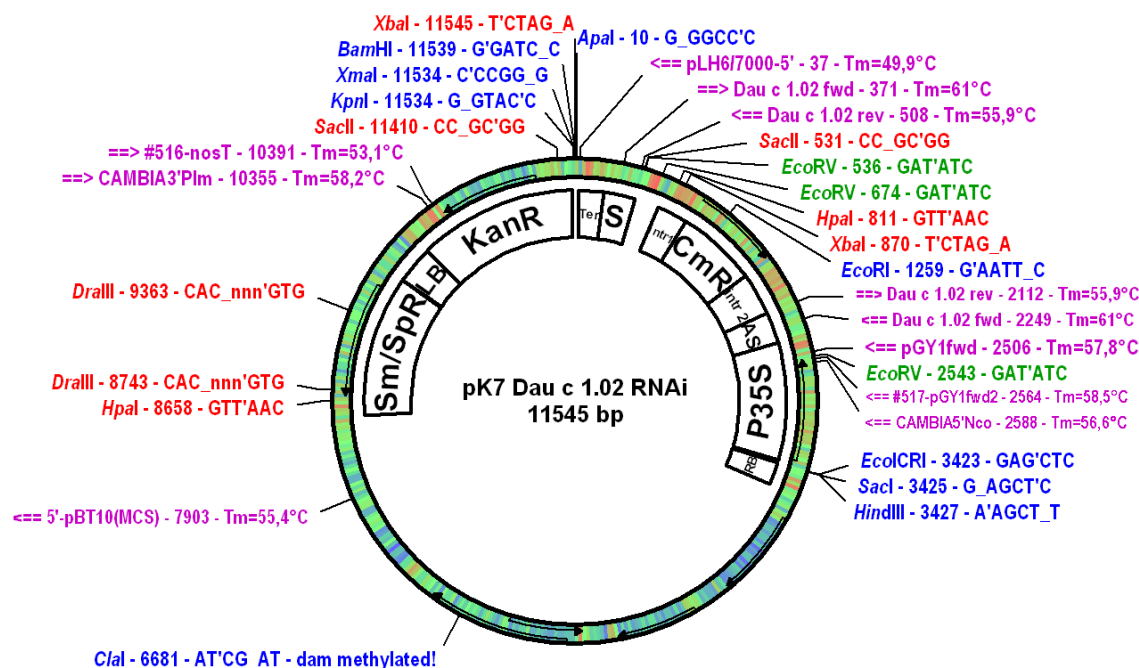


Die Transformationsvektoren mit den RNAi-Konstrukten:

Transformationsvektor Dau c 1.01-RNAi



Transformationsvektor Dau c 1.02-RNAi



7.2 AUFLISTUNG DER QPCR-ERMITTELTEN EXPRESSIONSWERE AUS MÖHRENBLÄTTERN

In der Tabelle 7.1 sind die mit der qPCR-ermittelten Expressionswerte von *Dau c 1.01* und *Dau c 1.02* der Möhrenblätter angegeben. In der gleichen Tabelle ist jeweils die Reduktionsstärke im Vergleich zu den Wildtypblättern aufgeführt (Tab. S1).

	Relative Expression (qPCR)	
	in Blättern	
	Dau c 1.01	Dau c 1.02
Wildtyp	0,3703	1,7557
L25 (Dau c 1.01_RNAi)	0,0278 (13-fach)	
L35 (Dau c 1.01_RNAi)	0,0814 (4,5-fach)	
L39 (Dau c 1.01_RNAi)	0,0071 (52-fach)	
L10 (Dau c 1.02_RNAi)		0,0775 (22,6-fach)
L28 (Dau c 1.02_RNAi)		0,5974 (2,9-fach)
L33 (Dau c 1.02_RNAi)		0,0558 (31,5-fach)

Tab. S1: Auflistung der qPCR-ermittelten Expressionswerte aus Möhrenblättern. In den ersten transgenen Möhrenpflanzen wurde die Suppressionsstärke des *Dau c 1.01* bzw. *Dau c 1.02* in den Blättern ermittelt. L: Linie, *Dau c 1.01_RNAi*: *Dau c 1.01*-supprimiert, *Dau c 1.02_RNAi*: *Dau c 1.02*-supprimiert, in Klammern ist die Reduktionsumfang im Vergleich mit den Wildtypblättern angegeben.

7.3 SEQUENZVERGLEICHE

Der Sequenzvergleich zwischen der *Daucus carota* (Dc)PRPlike1-Sequenz mit den PR1-Sequenzen von *Hordeum vulgare* a und b und *Arabidopsis thaliana* wurde mittels CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment durchgeführt (Abb. S1).

Der Sequenzvergleich des Dau c 1.01-RNAi-Konstruktes mit der Sequenz des DcPRPlike1 ist in Abbildung S2 abgebildet und der Sequenzvergleich des Dau c 1.02-RNAi-Konstrukts mit der DcPRPlike1-Sequenz ist in Abbildung S3 zu sehen.

HvPR1a	-----AGCTAGGCTACACATCGG--AGGCACAA	ACTGCAGCTCCAGCACTCCGGGCGCCCTAGCGGGAGAA---CATCTCTGGGGGTCG	TTGTTGGACAGAA-ACCATACTAA-----CTGTGAT-TGG-TTTTCGA-GTACATATA 579
HvPR1b	-----CGACGCAACAGAACTCGTGTGCTGAGCTGTATAGCAGCCCAT	ACTGCAGCTCCAGCACTCCGGGCGCCCTAGCGGGAGAA---CATCTCTGGGGGTCG	TCGTTGGACAGAA-ACCATACTAA-----CCGTGATGACGCTTTCAGA-GTACATACA 600
AePR1	-----CGACGCAACAGAACTCGTGTGCTGAGCTGTATAGCAGCCCAT	ACTGCAGCTCCAGCACTCCGGGCGCCCTAGCGGGAGAA---CATCTCTGGGGGTCG	ATGTGAAACAGAA-GCCATACTAAAG-TAATGATGTATCATGCAACACACGTACA 555
DcPR1like1	ATCCGATCAGTCTCAGAGTCTACACTTGAATTCAGCAACTTTCTCTCCACATCTTT	TTTTAAAAATTTAATTTAGTATAACAATTTTGTCTGAAGCACATTTTTTAAATTTGTTC	CCGAGGACGAGAACACAACTCTAATTCAGAGCCCTACCTCAITTCGCAAAATTAAC 652
HvPR1a	AGAAATCAITTTACACACCAAC-----CCAGAAATGGAGACGCCAAAGTGGCCATTTTGGCT	GCCGGCGGGGACTGGAAAGGGG--GCGGACCGGGTGAAGCTGTGGGTGGAGCGAAGAAAGG	CATA---GTCCA-GTATGTCCTCTGCTTCTCA-----CFTGCATGGGATTTTCACGCGCTC 630
HvPR1b	AGAAATCAITTTACACACCAAC-----CGAGAAATGGAGACGCCAAAGTGGCCATTTTGGCT	GCTGGCGGGGACTGGAAAGGCA--TCGGACCGGGTGAAGCTGTGGGTGGAGCGAAGAAAGG	TCATGCTACATATATATGCTCTCTGCTTCTAA-----T-----CTCATGGCACTTT 645
AePR1	AACCAITATCAACTTAGAAAAA-----T--GAATTTTACTGGCTAATCTCGAT-TTTTAAAT	--TAGCGGTGACTTGTCTGGG--GTCTCCGCTGAACATGTGGGTAGCGGAGAAAGCTA	TAAA--GGAGGTGTATATGTATCAAGTATTCA-----ATAGGAGCATCATATGGCAGGAT-- 608
DcPR1like1	AGATATTTTCTAAGAAAAATCATGGGTGTCAGAGCACGACGACAAAGAGATCAC-CT	TATATGAATAAACAGAGTGGCCAGTGCACAAATGACCTGTGAGAACTGAGGCGCTTGACA	TGGCTTTTGTGCTGCGAGTGTCAATTTTCAAGGCTCTGCGGCTGTGTTTTTGTGTGGAGT 712
HvPR1a	CGCCCT---AGCCATGCGAGCG--CCATGGTTAATTTTCCCAAGCG-CAAAACTCGCC	ACTACGACTACGGG--TCCAACACCTGTGCAAGGGGAAAGTGTGGCGGCACTACAC--GCA	GTATCTAATTAATGACTAGAGGGG---TGGGCGAGTAAA-TAAAAGGAAT--GCTGTAAAT 684
HvPR1b	CGCCCT---AGCCATGCGAGCG--CCATGGTTAATTTTCCCAAGCG-CAAAACTCGCC	ACTACGACTACGGG--TCCAACACCTGTGCAAGGGGAAAGTGTGGCGGCACTACAC--TCA	GTATCTAATTAATGACTAGAGGGG---CGAGCGAGTAAA-TAAAAGGAAT--GCCGTAAAT 699
AePR1	CGTCTTGTAGCTCTTGTAGTG--CTCTTGTCTTCCCTCGAAAGCT--CAAGATAGGCC	AGAAAGATTTGCACATCGAATTAACAGTTACATGAGGGAGATATTTCTGATGGGATTCATG	GTATCAATTTTCAAAATATACAAATAGAGAGCTGAGA-TTACGAGAACTTATTAAT 667
DcPR1like1	CGTCTTGTAGCTCTTGTAGTG--CTCTTGTCTTCCCTCGAAAGCT--CAAGATAGGCC	AGAAAGATTTGCACATCGAATTAACAGTTACATGAGGGAGATATTTCTGATGGGATTCATG	ACTTCTATGTTTTTGTCCAGGTCATTTTATTTCTTGGACTTGTCTGTGTTACTGATA-- 771
HvPR1a	TCGAGACTAC--CTTTCACCCACAGCGCGCGGCTGCGCTGCGCTGGGGGAGTGA	GGTGTGTGGCGCGCTCGACCAAGCATCGGCTG--CGCTCGGCTGCTGCTGCAACAACAACG	---AAGCTATGTTTCTCTCTCCATGACAGTAAATAAATAATGAGCTT----- 734
HvPR1b	TCGAGACTAC--CTTTCACCCACAGCGCGCGGCTGCGCTGCGCTGGGGGAGTGA	GGTGTGTGGCGCGCTCGACCAAGCATCGGCTG--CGCTCGGCTGCTGCTGCAACAACAACG	---AAGCCATGTTTC-----CATCTGAGCTATAATAATAATGAGCTTATATCA 749
AePR1	ACAAGACTAT--CTAAGGGTTACAAACAGCCAGAGGGGGTGGGCTGAGGCTGATG	AGTTGTTTGGAGAAAGTCAAGTGAAGCTGGATG--TGGCAAGAGTGAAGCA---ATG	TAAAAGTTACATCTTAAATTAAT-TATAGTTATATATGTAAMAATATGSGCCCTTTTAAAMA 726
DcPR1like1	CCAAGGCGGCTCCCGGAGCTTACAAAGATGTC---GAAATCAAAGGATGATGGT-----GA	AAAAAATGAAAAATCACTTATCAGTGGTCCAMATGGCGATGGTGGCAGCCACCANA	---AATAAAGAGTCTCAACTATGAGATGTCAAACTATGAGATGTGTGTAATTTGTATGCTGT 828
HvPR1a	GCTGGAGCAGAGCTGAGGCTAGGCCAGAGACTAG--CCAACGAGAGGATCGGGC	GCGGCGCTTCTCATCACTGCAA-----CTACGAGCCCG-----CGGAAATG	-----AMAAAAA----- 759
HvPR1b	GCTGGAGCAGAGCTGAGGCTAGGCCAGAGACTAG--CCAACGAGAGGATCGGGC	GCGGCGCTTCTCATCACTGCAA-----CTACGAGCCCG-----CGGAAATG	GTACATAAAT--AATTAATATAGTTAATGTTCTTTC--- 760
AePR1	AGTGGGACGAGGGGTTGACGCTATGCTGGGAGTACG---CAGAACCAACTAAGAGGCA	GTGGAAACCATATCAGTTGCAA-----CTATGATCTCG-----TGGGAATG	TAAACTTACCTTGGAAATATGATGATGCAAGATGTTTCAAT 867
DcPR1like1	GTGGAAACCATCAAGACATCACTCTTCCCGAAGGTTAGTTTCTTACCTATTAAACCACTT	CTACGGCCATATTTCCCAACCAAGGAGATGCTGTGGTCCAGAAAGAGAAATCAAGATG	

Abb. S1: Sequenzvergleich zwischen DcPR1like1, HvPR1a, HvPR1b und AePR1. Sequenzvergleich der DcPR1like1-Sequenz mit den Sequenzen von *Hordeum vulgare* HvPR1a, HvPR1b und von *Arabidopsis thaliana* AtPR1 mittels CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

Dauc1.01 -----
DcPRPlike1 ATCGCATCAGTCTCACAGTTCTACACTTGAGTTCATTCAACAACCTTCTCTCACATCTTT 60

Dauc1.01 -----ATGGGTGCCAGAGCCATTCACTCGAGATCACTTC 35
DcPRPlike1 AGATATTGTTTTCTAAGAAAAATCATGGGTGCCAGAACGACGAACAAGAGATCACCTC 120
                ***** ** * * ***** **

Dauc1.01 TTCCGTCTCAGCAGAGAAAATATTCAGCGGCATTGTCCTTGATGTTGATACAGTTATCCC 95
DcPRPlike1 CTCTGTCCCGGCAGAGAAGATGTTCCATGGCTTGATCCTCGATATCGATAACGTTCTCCC 180
                * * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Dauc1.01 CAAGGCTGCCCTGGAGCTTACAAGAGTGTGATGTTAAAGGAGATGGTGGAGCTGGGAC 155
DcPRPlike1 CAAGGCGCTCCCGAGCTTACAAGAATGTGAAATCAAAGGTGATGGTGGAGTTGGAAC 240
                ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * *

Dauc1.01 CGTCAGAATTATCACCTTCCCGAAGGTAGCCGATCACCT--CAATGACGGT--AGAA 211
DcPRPlike1 CATCAAGCACATCACTCTTCCCGAAGGTAGTTTCTTACCTATTAACCACTTTTTTAAAA 300
                * * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * *

Dauc1.01 CTGATGCAGT-CAACAAGGAGGCCTTGA-CATACGACTCCACG----- 253
DcPRPlike1 TTTATTTAGTATAACAATTTTGTCTGAAGCACATTTTAAATTTGTTTCCCTATATGAA 360
                * * * * * ***** * * * * * * * *

Dauc1.01 -----
DcPRPlike1 TAACCAGGTGGCCAGTGACCACAATGACCCTGAGAAGTACGCGCTTGACAAGAAGAAT 420

Dauc1.01 -----
DcPRPlike1 TGCACAATCGATTACAGTTACATCGACGGAGATATTCTGATGGGATTCATTGAAAAAATT 480

Dauc1.01 -----
DcPRPlike1 GAAAATCATCTATCAGTGGTGCCAAATGCCGATGGTGGCAGCACCACCAAGACTACGGCC 540

Dauc1.01 -----
DcPRPlike1 ATATTCCACACCAAAGGAGATGCTGTGGTGCCAGAAGAGAACATCAAGTATGCCGAGGAG 600

Dauc1.01 -----
DcPRPlike1 CAGAACAACATGCTATTCAAGGCCGTCGAAGCCTACCTCATTGCAAATTAAGTGGTCTT 660

Dauc1.01 -----
DcPRPlike1 TGTGTGCGAGTGTCAATTTTCAAGGTCTCTGGCGTGTGTTTTGTGTGGAAGTACTTCTAT 720

Dauc1.01 -----
DcPRPlike1 GTTTTGTCCAAGTCAATTTCTTATTTCTTGGACTTGTCTGTGTTTACTGATAAATAAGAG 780

Dauc1.01 -----
DcPRPlike1 TCTCAACTATGAGATGTCAACTATGAGATGTGTGTAATGTATCGTGTAAACTTACCTT 840

Dauc1.01 -----
DcPRPlike1 GGAATATACGATGCAAGATGTTTCAAT 867

```

Abb. S2: Sequenzvergleich von Dau c 1.01-RNAi-Konstrukt mit DcPRPlike1. Der Sequenzvergleich des Dau c 1.01-RNAi-Konstrukts mit der DcPRPlike1-Komplettsequenz wurde mittels CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment durchgeführt.

7.4 AUFLISTUNG DER qPCR-ERMITTELTEN EXPRESSIONSWERTE IN WURZELSCHLEIBEN NACH DER ALTERNARIA RADICINA-INFESTION

In der Tabelle S2 sind die mittels qPCR ermittelten Expressionsunterschiede von *Dau c 1.01* und *Dau c 1.02* in den mit *Alternaria radicina* (*A. radicina*) infizierten und nicht infizierten Wurzelproben aus der *Alternaria radicina*-Kinetik an Wildtypwurzelscheiben der im Feld gewachsenen Möhren aufgeführt.

Tab. S2: Auflistung der qPCR-ermittelten Expressionswerte in Wildtypwurzelscheiben der auf Feld gewachsenen Möhren nach einer *A. radicina*-Infektion. Die Expressionswerte für *Dau c 1.01* und *Dau c 1.02* nach einer *A. radicina*-Infektion in Wildtypwurzelscheiben wurden im Vergleich zu den Expressionswerten von Ubiquitin ermittelt. Alle Werte sind Mittelwerte.

Gen	Relative Expression (qPCR)								
	nach H ₂ O-Behandlung					nach <i>A. radicina</i> -Infektion			
	0 hai	6 hai	12 hai	24 hai	72 hai	6 hai	12 hai	24 hai	72 hai
<i>Dau c 1.01</i>	0,451	0,805	19,382	1,823	2,726	23,752	20,346	116,700	121,376
<i>Dau c 1.02</i>	1	5,631	14,420	34,937	30,839	137,187	102,774	400,780	317,365

In der Tabelle S3 sind die mittels qPCR ermittelten Expressionsunterschiede von *Dau c 1.01*, *Dau c 1.02*, *DcPRPlike1* und *PR3* in den mit *A radicina* infizierten und nicht infizierten Wurzelproben aus der *Alternaria radicina*-Kinetik aufgeführt. Diese Resistenzanalyse wurde mit Wildtypwurzelscheiben und mit den Wurzelscheiben der *Dau c 1.01*-supprimierten Linien 35 und 39 sowie mit den Wurzelscheiben der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 durchgeführt.

Tab. S3: Auflistung der qPCR-ermittelten Expressionswerte in Wurzelscheiben nach einer *A. radicina*-Infektion. Die Expressionswerte für *Dau c 1.01*, *Dau c 1.02*, *DcPRPlike1* und *PR3* nach einer *A. radicina*-Infektion in Wurzelscheiben der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 35 und 39, der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 und des Wildtyps wurden im Vergleich zu den Expressionswerten von Actin ermittelt. Alle Werte sind Mittelwerte.

Linie	Gen	Relative Expression (qPCR)						
		nach H ₂ O-Behandlung				nach <i>A. radicina</i> -Infektion		
		0 hai	6 hai	12 hai	24 hai	6 hai	12 hai	24 hai
Wildtyp	<i>Dau c 1.01</i>	10,548	0,914	0,850	4,823	0,340	0,987	2,365
L35 (<i>Dau c 1.01_RNAi</i>)	<i>Dau c 1.01</i>	1,321	0,939	1,267	5,759	1,417	1,797	3,124
L39 (<i>Dau c 1.01_RNAi</i>)	<i>Dau c 1.01</i>	0,824	2,825	4,010	4,551	1,922	5,365	6,355
L10 (<i>Dau c 1.02_RNAi</i>)	<i>Dau c 1.01</i>	0,782	1,821	2,957	4,955	2,366	2,539	6,692
Wildtyp	<i>Dau c 1.02</i>	45,576	44,685	48,969	185,974	28,981	92,523	101,295
L35 (<i>Dau c 1.01_RNAi</i>)	<i>Dau c 1.02</i>	40,168	30,718	62,653	201,000	23,399	58,521	117,658
L39 (<i>Dau c 1.01_RNAi</i>)	<i>Dau c 1.02</i>	28,744	101,277	159,355	215,535	100,978	303,728	645,569
L10 (<i>Dau c 1.02_RNAi</i>)	<i>Dau c 1.02</i>	0,321	0,910	2,889	4,997	1,272	3,149	4,877
Wildtyp	<i>DcPRPlike1</i>	5,641	17,292	69,846	211,246	8,723	54,818	135,353
L35 (<i>Dau c 1.01_RNAi</i>)	<i>DcPRPlike1</i>	1,490	9,308	23,629	121,496	13,404	29,794	56,864
L39 (<i>Dau c 1.01_RNAi</i>)	<i>DcPRPlike1</i>	2,940	93,719	213,666	458,783	74,968	138,699	618,113
L10 (<i>Dau c 1.02_RNAi</i>)	<i>DcPRPlike1</i>	5,559	29,396	115,827	307,135	47,117	87,271	394,840
Wildtyp	<i>PR3</i>	1,992	1,117	3,148	6,859	0,835	2,493	4,785
L35 (<i>Dau c 1.01_RNAi</i>)	<i>PR3</i>	0,394	1,130	3,503	4,855	1,078	2,526	4,290
L39 (<i>Dau c 1.01_RNAi</i>)	<i>PR3</i>	0,535	4,980	11,438	12,159	4,371	9,548	28,748
L10 (<i>Dau c 1.02_RNAi</i>)	<i>PR3</i>	0,435	2,016	5,997	7,474	3,819	3,225	8,101

7.5 AUFLISTUNG DER qPCR-ERMITTELTEN EXPRESSIONSWERTE IN BLÄTTERN NACH DER SALIZYLSÄURE-BEHANDLUNG

In der Tabelle S4 sind die mittels qPCR ermittelten Expressionsunterschiede von *Dau c 1.01*, *Dau c 1.02*, *DcPRPlike1* und *PR3* in den mit Salizylsäure behandelten und nicht behandelten Blattproben aus der Salizylsäure-Kinetik aufgeführt. Diese Resistenzanalyse wurde mit WildtypBlättern und mit den Blättern der *Dau c 1.01*-supprimierten Linien 35 und 39 sowie mit den Blättern der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 durchgeführt.

Tab. S4: Auflistung der qPCR-ermittelten Expressionswerte in Blättern nach einer Salizylsäure-Behandlung. Die Expressionswerte für *Dau c 1.01*, *Dau c 1.02*, *DcPRPlike1* und *PR3* nach einer Salizylsäure-Behandlung der Blätter von der *Dau c 1.01*-supprimierten Linie 35 und 39, der *Dau c 1.02*-supprimierten Linie 10 und von Wildtypmöhren wurden im Vergleich zu den Expressionswerten von Actin ermittelt. Alle Werte sind Mittelwerte.

Linie	Gen	Relative Expression (qPCR)							
		nach H ₂ O-Behandlung				nach SA-Behandlung			
		0 hat	9 hat	24 hat	48 hat	0 hat	9 hat	24 hat	48 hat
Wildtyp	<i>Dau c 1.01</i>	0,512	0,045	0,050	0,125	0,114	0,127	1,071	0,872
L35 (<i>Dau c 1.01</i> _RNAi)	<i>Dau c 1.01</i>	0,112	0,062	0,117	0,333	0,084	0,071	0,087	0,124
L10 (<i>Dau c 1.02</i> _RNAi)	<i>Dau c 1.01</i>	0,106	0,126	0,083	0,439	0,113	0,156	0,350	1,056
Wildtyp	<i>Dau c 1.02</i>	14,829	5,626	3,615	3,768	5,054	6,825	8,847	13,716
L35 (<i>Dau c 1.01</i> _RNAi)	<i>Dau c 1.02</i>	7,899	9,818	5,871	13,547	10,198	10,284	18,486	12,568
L10 (<i>Dau c 1.02</i> _RNAi)	<i>Dau c 1.02</i>	0,492	0,358	0,210	1,224	0,378	0,419	0,680	2,913
Wildtyp	<i>DcPRPlike1</i>	62,680	37,389	52,062	48,466	47,516	34,556	66,424	109,189
L35 (<i>Dau c 1.01</i> _RNAi)	<i>DcPRPlike1</i>	41,018	20,378	28,453	77,298	68,797	74,253	75,452	13,572
L10 (<i>Dau c 1.02</i> _RNAi)	<i>DcPRPlike1</i>	46,182	40,173	13,085	124,039	41,903	166,721	46,9154	93,380
Wildtyp	<i>PR3</i>	20,815	20,677	24,878	26,104	21,828	17,963	23,439	30,448
L35 (<i>Dau c 1.01</i> _RNAi)	<i>PR3</i>	16,785	13,247	13,365	37,036	16,785	31,505	57,742	9,771
L10 (<i>Dau c 1.02</i> _RNAi)	<i>PR3</i>	27,099	35,295	6,871	86,882	34,240	130,821	24,247	101,508

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Erklärung:

ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Herstellung von hypoallergenen Möhren (*Daucus carota*) und
Analyse ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber mikrobiellen Pathogenen**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Gießen im Juni 2010,

Susanna Peters

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit in seinem Institut und für das Thema meiner Doktorarbeit. Ich möchte mich bei ihm auch für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, für die fachliche Unterstützung und für das entgegenbrachte Vertrauen bedanken.

Ein besonderer Dank geht auch an meinen Zweitgutachter HD Dr. Christoph Forreiter für die stets vorhandene Bereitschaft mit mir über meine Arbeit zu diskutieren und für die fachliche Unterstützung.

Ein Dankeschön an alle Kooperationspartner: Vera Mahler, Kathrin Paulus, Uwe Sonnewald, Stephan Vieths, Stephan Scheurer, Daniela Weingand und Kay Fötisch, nur durch die Zusammenarbeit mit Euch konnte meine Arbeit in vorgelegtem Umfang durchgeführt werden.

Im „vierten Stock“ möchte ich mich bei Dr. Jafargholi Imani für die fachliche Einführung in die Welt der *in vitro*-Kulturen und Möhren-Transformation sehr bedanken. Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei Silke Hermann, Ute Micknass und Jan Menz für die gute Zusammenarbeit.

Für die fachliche Unterstützung und Diskussionen bedanke ich mich bei allen Arbeitsgruppenleitern. Bei Patrick Schäfer und Gregor Langen bedanke ich mich besonders für die anregenden Diskussionen in der Endphase meiner Arbeit.

Aus ganzem Herzen kommt auch der Dank für die gute Atmosphäre, Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft von Daggi, Rebekka, Elke, Christina, Martina, Volker und Udo. Was wäre das Arbeiten ohne Euch gewesen?

Anna, Du warst immer da! Danke!

Allen Mit-Promovierenden danke ich für die Zusammenarbeit und Freundschaft. Alex, Magda, Maggie, Eileen, Steffie und Sophie, Ihr seid nicht aus dieser Zeit wegzudenken.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für das Vertrauen und für die Unterstützung meiner Entscheidungen. Ihr habt mir das alles ermöglicht. Kiitos. Meinen Geschwistern Marju, Jaakko und Ida danke ich für die Unterstützung und für die ständige Aufmunterung.

Für die Liebe, für das gute Essen, für das Vertrauen, für die Unterstützung, für die Aufmunterung, für die Motivation ...die Liste ist ewig lang... bedanke ich mich mit meinem ganzen Herzen bei Dir, Henning.