

**Chemisch Induzierte Resistenz  
im Pathosystem Weizen – Echter Weizenmehltau:  
Cytologische und molekulare Funktionsanalyse eines  
Benzothiadiazols**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Tag der Disputation: 13. Dezember 2001**

**vorgelegt von  
Diplom-Biologe Ulrich Beckhove  
aus Düsseldorf**

**Gutachter: Prof. Dr. Aart J. E. van Bel  
Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel**

**Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b><u>1</u></b>	<b><u>  <b>EINLEITUNG</b></u></b>	<b><u>1</u></b>
<b>1.1</b>	<b>WIRT-PATHOGEN-INTERAKTIONEN</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>FORMEN DER RESISTENZ GEGENÜBER PHYTOPATHOGENEN ORGANISMEN</b>	<b>3</b>
1.2.1	PRÄFORMIERTE UND KONSTITUTIVE RESISTENZ	3
1.2.2	INDUZIERTER RESISTENZ	4
1.2.2.1	BIOLOGISCH INDUZIERTER RESISTENZ	5
1.2.2.2	CHEMISCH INDUZIERTER RESISTENZ	7
1.2.2.2.1	SALICYLSÄURE UND IHRE DERIVATE	7
1.2.2.2.2	BTH UND DCINA	7
1.2.2.2.3	BABA	9
1.2.2.2.4	ANDERE SUBSTANZEN	9
<b>1.3</b>	<b>ABWEHRMECHANISMEN DER PFLANZE UND SIGNALWEGE DER IR</b>	<b>10</b>
1.3.1	PRÄFORMIERTE KOMPONENTEN DER ABWEHR	10
1.3.2	AKTIVIERTE ABWEHRMECHANISMEN	10
<b>1.4</b>	<b>DAS PATHOSYSTEM WEIZEN-ECHTER WEIZENMEHLTAU</b>	<b>13</b>
1.4.1	DER WEIZEN	13
1.4.2	DER ECHE WEIZENMEHLTAUPILZ	15
<b>1.5</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>17</b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>  <b>MATERIAL UND METHODEN</b></u></b>	<b><u>19</u></b>
<b>2.1</b>	<b>PFLANZEN UND PATHOGENMATERIAL</b>	<b>19</b>
2.1.1	WEIZENKULTIVAR	19
2.1.2	GERSTENKULTIVAR	19
2.1.3	ANZUCHTBEDINGUNGEN DER PFLANZEN	19
2.1.4	PATHOGENMATERIAL	20
2.1.5	NACHZUCHT DER PATHOGENE	20
<b>2.2</b>	<b>BEHANDLUNG DER PFLANZEN MIT BTH</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>MAKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>21</b>

<b>2.4</b>	<b>MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>21</b>
2.4.1	INOKULATION	21
2.4.2	ENTFÄRZEN UND FIXIEREN VON GANZBLATTPRÄPARATEN	22
2.4.3	FÄRZEN DES PILZGEWEBES	22
2.4.4	MIKROSKOPIE	23
2.4.5	FOTOGRAFIE	23
<b>2.5</b>	<b>GRUNDLEGENDE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>24</b>
2.5.1	PLASMIDVEKTOREN	24
2.5.2	KLONIERUNG VON cDNA-FRAGMENTEN	24
2.5.3	TRANSFORMATION	25
2.5.4	SELEKTION	26
2.5.5	ISOLATION VON PLASMID-DNA AUS TRANSFORMIERTEN E. COLI KULTUREN	27
2.5.6	RESTRIKTIONSANALYSEN	27
2.5.7	PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	28
2.5.8	NICHT-DENATURIERENDE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	28
<b>2.6</b>	<b>NICHT-RADIOAKTIVE NORTHERNBLOT ANALYSE</b>	<b>29</b>
2.6.1	EXTRAKTION VON RNA AUS WEIZENBLÄTTERN	29
2.6.2	DENATURIERENDE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	30
2.6.3	IMMOBILISIERUNG DER RNA MITTELS KAPILLARBLOT	30
2.6.4	AMPLIFIKATION VON INSERTIERTER PLASMID-DNA ZUR SONDENHERSTELLUNG	31
2.6.5	HERSTELLUNG DIGOXIGENIN- UND FLUORESCEIN-MARKIERTER RNA-SONDEN	32
2.6.6	HYBRIDISIERUNG	33
2.6.7	IMMUNODETEKTION	33
<b>2.7</b>	<b><i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNGEN</b>	<b>35</b>
2.7.1	VORBEREITUNG DER BLATTPROBEN	35
2.7.1.1	FIXIERUNG DES BLATTMATERIALS	35
2.7.1.2	DEHYDRATISIERUNG DES FIXIERTEN PFLANZENMATERIALS	36
2.7.2	INFILTRATIONS- UND EINBETTUNGSMETHODEN	37
2.7.2.1	INFILTRATION UND EINBETTUNG IN PEG	37
2.7.2.2	INFILTRATION UND EINBETTUNG IN PARAFFIN	38
2.7.3	BESCHICHTUNG VON OBJEKTTRÄGERN MIT POLY-L-LYSIN	40

<b>2.8</b>	<b><i>IN SITU</i> DNA-RNA-HYBRIDISIERUNG MIT DIG-MARKIERTEN SONDEN</b>	<b>40</b>
2.8.1	HERSTELLUNG DIG-MARKIERTER DNA-SONDEN	40
2.8.2	HERSTELLUNG KURZER SONDEN	41
2.8.3	DIE HERSTELLUNG VON SEMIDÜNNNSCHNITTEN IN PEG EINGEBETTETER PROBEN	42
2.8.4	BLOCKIERUNG FREIER ALDEHYDE UND UNSPEZIFISCHER BINDUNGSSTELLEN	42
2.8.5	HYBRIDISIERUNG	43
2.8.6	IMMUNODETEKTION	44
<b>2.9</b>	<b>RADIOAKTIVE <i>IN SITU</i> RNA-RNA-HYBRIDISIERUNG</b>	<b>47</b>
2.9.1	VORBEREITUNG DER EINGEBETTETEN BLATTSEGMENTE	47
2.9.1.1	ANFERTIGUNG VON SEMIDÜNNNSCHNITTEN IN PARAFFIN EINGEBETTETER PROBEN	47
2.9.1.2	DEPARAFFINISIEREN DER SEMIDÜNNNSCHNITTE	48
2.9.1.3	PRONASE-VERDAU UND NACHFIXIERUNG DES GEWEBES	49
2.9.2	HERSTELLUNG RADIOAKTIV MARKIERTER SONDEN	50
2.9.2.1	<i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTION	50
2.9.2.2	VERDAU DER TEMPLATES	51
2.9.2.3	AUFREINIGUNG DER SONDEN ÜBER SEPHADEX G25 SÄULEN	51
2.9.2.4	BESTIMMUNG DER SONDENMENGE ÜBER DIE EINGEBAUTE RADIOAKTIVITÄT	52
2.9.2.5	KONTROLLE UND GRÖßENBESTIMMUNG DER RADIOAKTIV MARKIERTEN SONDEN	52
2.9.2.6	TEILWEISE ALKALISCHE HYDROLYSE DER SONDEN	53
2.9.3	HYBRIDISIERUNG	54
2.9.4	WASCHEN UND RNASE-VERDAU	55
2.9.5	MIKROAUTORADIOGRAPHIE	56
2.9.5.1	BESCHICHTEN DER OBJEKTTRÄGER MIT FLÜSSIGFILM	56
2.9.5.2	ENTWICKLUNG DES FILMS UND VERSIEGELUNG DER PRÄPARATE	57
<b>2.10</b>	<b><i>WESTERN</i> ANALYSEN</b>	<b>58</b>
2.10.1	PROTEINEXTRAKTION	58
2.10.2	PROTEINBESTIMMUNG	58
2.10.3	DENATURIERENDE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	59
2.10.4	ELEKTROBLOT	60
2.10.5	IMMUNODETEKTION	60

---

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>MAKROSKOPISCHE ANALYSE DES MEHLTAUBEFALLS NACH CHEMISCHER INDUKTION DER RESISTENZ MIT BTH</b>	<b>62</b>
<b>3.2</b>	<b>QUALITATIVE UND QUANTITATIVE MIKROSKOPISCHE ANALYSE DER PFLANZLICHEN ABWEHR NACH INDUKTORBEHANDLUNG</b>	<b>63</b>
<b>3.3</b>	<b>EXPRESSIONSANALYSEN CHEMISCH INDUZIERTER GENE</b>	<b>67</b>
3.3.1	<i>LOX</i> EXPRESSION	69
3.3.2	<i>WCI-1</i> EXPRESSION	69
3.3.3	<i>WCI-3</i> EXPRESSION	72
3.3.4	<i>PR-1</i> EXPRESSION	72
<b>3.4</b>	<b>WESTERNBLOT ANALYSEN VON PR-1 PROTEINEN</b>	<b>74</b>
<b>3.5</b>	<b>IN SITU HYBRIDISIERUNGEN</b>	<b>75</b>
3.5.1	IN SITU DNA-RNA-HYBRIDISIERUNG MIT DIG-MARKIERTEN SONDEN	77
3.5.1.1	ZELLTYPESPEZIFISCHER NACHWEIS VON <i>PR-1</i> IN WEIZENBLÄTTERN	77
3.5.1.2	TRANSKRIPTAKKUMULATION IN EPIDERMISZELLEN NACH HR?	77
3.5.1.3	HERSTELLUNG KURZER SONDEN FÜR VERBESSERTE PERMEABILITÄT IN GEWEBESCHNITTEN	77
3.5.1.4	ZEITPUNKTE VOR DEM AUFTRETEN DER HR	79
3.5.1.5	KONTROLLEN MIT DEM GERSTEKULTIVAR SULTAN 5	79
3.5.1.6	NACHWEIS UNSPEZIFISCHER BINDUNG VON DNA-SONDEN AN HR-ZELLEN	79
3.5.1.6.1	KONTROLLEN MIT <i>WCI-3</i> IN WEIZEN UND DEM GERSTENKULTIVAR SULTAN 5	79
3.5.1.6.2	WEITERE KONTROLLEN	79
3.5.2	RADIOAKTIVE IN SITU RNA-RNA-HYBRIDISIERUNG	81
3.5.2.1	KONTROLLEN MIT <i>SENSE</i> SONDEN	81
3.5.2.2	Gewebespezifischer Nachweis der <i>LOX</i>	83
3.5.2.3	Gewebespezifischer Nachweis von <i>WCI-1</i>	83
3.5.2.4	Gewebespezifischer Nachweis von <i>WCI-3</i>	85
3.5.2.5	Gewebespezifischer Nachweis von <i>PR-1</i>	85

<b><u>4</u></b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b><u>87</u></b>
4.1	INDUZIERTER RESISTENZ IN GETREIDE	87
4.2	WIRKUNG DES RESISTENZINDUKTORS BTH IN WEIZEN GEGEN <i>BGT</i>	89
4.3	CYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER CHEMISCH INDUZIERTEN ABWEHRMECHANISMEN VON WEIZEN GEGEN <i>BGT</i>	89
4.4	DIE BEDEUTUNG VERSCHIEDENER CHEMISCH UND/ODER PATHOGEN INDUZIERBARER GENE IN WEIZEN	92
4.4.1	<i>WCI-1</i>	94
4.4.2	<i>WCI-3</i>	95
4.4.3	DIE <i>PR-1</i> -FAMILIE	97
4.4.4	LIPOXYGENASE	100
4.5	DAS PROBLEM DER BINDUNG VON NUKLEINSÄUREN AN ZELLEN MIT HR BEI <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNGEN	104
4.6	ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN DER <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNGEN	106
<b><u>5</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>109</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>SUMMARY</u></b>	<b><u>110</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>111</u></b>

## Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser (= Milli Q)
A. dest.	destilliertes Wasser (= Milli Pore)
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AK	Antikörper
<i>Avr</i>	Avirulenzgen
BCI	<i>barley chemically induced</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>
<i>Bgt</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>
bIR	biologisch Induzierte Resistenz
bp	Basenpaare
BSA	Rinder ( <i>bovine</i> ) Serum Albumin
BTH	Benzo[1,2,3]thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester
Ci	Curie
CIR	chemisch Induzierte Resistenz
cm	Zentimeter
cpm	detektierte Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
DCINA	2.6-Dichlorisonikotinsäure
DCSA	3.5-Dichlorsalicylsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotide
dpi	Tage nach Inokulation ( <i>days post inoculation</i> )
dpm	Zerfälle pro Minute ( <i>disintegrations per minute</i> )
dpt	Tage nach Behandlung ( <i>days post treatment</i> )
DTT	Dithiothreitol
E	Einstein [= 1 mol Quanten]
EtBr <sup>-</sup>	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f. sp.	forma specialis
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde
hpi	Stunden nach Inokulation ( <i>hours post inoculation</i> )
hpt	Stunden nach Behandlung ( <i>hours post treatment</i> )
<i>Hv</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
ISR	<i>induced systemic resistance</i>
Kap.	Kapitel
kB	Kilobasen
LOX	Lipoxygenase
ls	<i>leaf spray</i>
MCS	multiple cloning site

min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
nm	Nanometer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
ppm	<i>parts per million</i>
Pst	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SA	Salicylsäure
SAR	Systemic Acquired Resistance
<i>sd</i>	Gießbehandlung über den Boden ( <i>soil drench</i> )
<i>t</i> -BuOH	tertiäres Butanol
Tris	Tris - (Hydroxymethyl) - Aminomethan
u	<i>units</i> = willkürlich definierte Einheiten
UTP	Uraciltriphosphat
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WCI	<i>wheat chemically induced</i>
WP	<i>wettable powder</i>
xGal	5-Brom-4chlor-3indolyl-β -D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

## 1 Einleitung

Im Laufe der Menschheitsgeschichte kam es immer wieder zu Naturkatastrophen, welche durch phytopathogene Organismen hervorgerufen worden waren. Im Juni des Jahres 1845 erreichte *Phytophthora infestans*, der Erreger der Kraut- und Knollenfäule (Kartoffelfäule), Europa mit einer Schiffsladung von Saatkartoffeln aus Nordamerika. In den folgenden Monaten breitete sich eine Epidemie der Krankheit über Wind und Regen wie ein Lauffeuer aus. Dies hatte besonders in Irland fatale Konsequenzen für die Landbevölkerung, da diese sich fast ausschließlich von Kartoffeln ernährte. In den Jahren 1845-48 kam es hier durch den Totalausfall der Kartoffelernte zu einer Hungersnot, welcher mehr als eine Millionen Menschen zum Opfer fielen. Als weitere Folge wurden von der Regierung in London und den Großgrundbesitzern zwei Millionen Menschen zur Auswanderung in die Kolonien in Nordamerika und Australien gezwungen. Grund für diese Katastrophe war auch damals schon die Monokultur einzelner Kartoffelsorten. Es wurden zu dieser Zeit insgesamt nur drei aus Südamerika stammende Kartoffelsorten angebaut, von der keine eine Resistenz gegen den wahrscheinlich aus Mexiko eingeschleppten Erreger besaß (BOURKE 1993; SALAMAN und REDCLIFFE 1985).

Ein weiteres Beispiel für durch phytopathogene Pilze hervorgerufene Tragödien ist der durch Vergiftung mit Mycotoxinen ausgelöste Ergotismus (Mutterkornvergiftung). Im Mittelalter kam es, verursacht durch Ergotalkaloide des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea*, zum Tod der Bevölkerung ganzer Landstriche. So wurden z. B. im Jahre 943 in der Gegend von Limoges (Frankreich) 40.000 Menschen Opfer einer Vergiftung durch *Claviceps purpurea* infiziertes Getreide. Die Opfer litten an Übelkeit, Kopfschmerzen, Erbrechen, Durchfällen, epilepsieähnlichen Krämpfen, Halluzinationen und brandigen Gliedmaßen (Antoniusfeuer), die oftmals amputiert werden mußten. Bei schwangeren Frauen kam es zu Fehlgeburten. Verblödung, Verkrüppelung, Rückenmarksdegeneration und häufig auch Tod durch Kreislaufversagen oder Atemlähmung charakterisieren den weiteren Verlauf der Vergiftung.

Dank der Erkenntnisse der Phytomedizin kommt es heute zwar nicht mehr zu solchen Epidemien, doch trotz intensiver chemischer Pflanzenschutzmaßnahmen liegen die durch phytopathogene Organismen bedingten Ernteverluste weltweit immer noch bei 13,3 %, mit

steigender Tendenz. Hinzu kommen weitere Verluste durch tierische Schädlinge, konkurrierende Wildkräuter und abiotische Faktoren wie Dürren, Unwetter und Frost, so daß nur etwa 50 % des potentiellen Ertrages geerntet werden kann (OERKE 1994).

Trotz einer stetig wachsenden Weltbevölkerung wird eine Erweiterung der heute landwirtschaftlich genutzten Fläche nicht möglich sein. Schon heute geht ein großer Teil der Flächen durch Versteppung und Raubbau verloren und kann oft nur durch Zerstörung ökologisch wertvoller Lebensräume ersetzt werden. Da dies keine geeignete Lösung des Problems ist, kann die Versorgung in Zukunft nur gesichert werden, wenn auf gegebener Nutzfläche eine erhebliche Steigerung der Erträge erzielt wird. Es ist daher wichtig, nachhaltige Pflanzenschutzkonzepte zu entwickeln, welche im Einklang zwischen dem ökonomisch Machbaren und dem ökologisch Vertretbaren stehen (REISENER und SCHEINPFLUG 1993). Neben gentechnischen und züchterischen Ansätzen, welche die Erhöhung der Toleranz von Pflanzen gegenüber abiotischem Streß (Hitze, Wassermangel, Versalzung) verfolgen und somit auch einen Anbau auf Flächen mit ungünstigen Bedingungen ermöglichen, stellt die Nutzung des Phänomens der Induzierten Resistenz eine weitere Möglichkeit dar in Zukunft die Erträge deutlich zu steigern.

Mit neuen molekularbiologischen und biochemischen Methoden, sowie verbesserter mikroskopischer Technik, ist es heute möglich, Wirt-Pathogen-Interaktionen und die wichtigen Resistenzmechanismen der Pflanzen gegenüber Schaderregern genau zu analysieren. Das so erworbene Wissen bildet einen Grundstein für die Entwicklung neuer nachhaltiger Strategien in einem modernen Pflanzenschutz.

## **1.1 Wirt-Pathogen-Interaktionen**

Pflanzen kommen während ihrer Entwicklung mit einer Vielzahl von potentiellen Krankheitserregern in Kontakt. Schafft es ein Mikroorganismus (Virus, Bakterium, Pilz) eine Pflanze erfolgreich zu besiedeln und sich auf ihr zu vermehren, so wird er als virulentes Pathogen, die befallene Pflanze als Wirt und die Interaktion als kompatibel bezeichnet (SCHLÖSSER 1997). Zeigt die Pflanze hierbei keine deutlichen Krankheitssymptome und wird nicht merkbar geschädigt, spricht man von Toleranz. Die jedoch häufigste und als evolutionär ursprünglich anzusehende Wechselbeziehung zwischen Pflanzen und Mikroorganismen ist die Inkompatibilität (HEATH 1987). Hierbei wird das potentielle Pathogen

frühzeitig in seiner Entwicklung gehemmt und es kommt zu keiner oder nur einer schwachen Ausprägung von Symptomen. Die Pflanze gilt als resistent gegenüber dem als avirulent bezeichnetem Pathogen.

## **1.2 Formen der Resistenz gegenüber phytopathogenen Organismen**

### **1.2.1 Präformierte und konstitutive Resistenz**

Die meisten Mikroorganismen, mit denen eine Pflanze in Kontakt kommt, sind nicht in der Lage, diese zu besiedeln und sich auf ihr zu vermehren. Diese Basisresistenz oder auch Nicht-Wirt-Resistenz beruht einerseits auf der Physiologie und den Umweltansprüchen der einzelnen Mikroorganismen, welche einer Besiedlung entgegenstehen, andererseits aber auch auf einer Vielzahl unspezifischer Komponenten, wie passive Barrieren, oder aktive Abwehrmechanismen der Pflanzen (HEATH 1974). Zu den passiven Barrieren gehören neben der Wachsschicht der Kutikula, die Zellwand und andere pflanzliche Strukturen aber auch biochemische Komponenten (z.B. Phytoalexine), welche präformiert vorhanden sind und ein Eindringen eines Pathogens verhindern (SCHLÖSSER 1983, OSWALD und ELSTNER 1984; vgl. Kap. 1.3.1). Die aktiven Abwehrreaktionen werden hingegen erst durch einen Pathogenbefall ausgelöst. Diese unspezifisch wirkende Nicht-Wirt-Resistenz ist durch mehrere genetische Faktoren (poly oder multigen) bedingt und verleiht einer Pflanzenart eine vollständige und dauerhafte Widerstandsfähigkeit gegenüber allen Genotypen eines Pathogens.

Im Laufe der koevolutionären Entwicklung gelang es einzelnen Organismen, Komponenten der Basisresistenz mit Hilfe sogenannter Pathogenitätsfaktoren zu umgehen und somit die Pflanze erfolgreich zu parasitieren. Es wurde eine Basiskompatibilität zwischen Pathogen und Pflanze erzeugt (HEATH 1981). Die Pflanzen wiederum entwickelten Mechanismen, welche zu konstitutiven Resistenzen gegenüber den Pathogen führten. Auslöser für die poly- oder monogen determinierten Resistenzantworten der Pflanze sind vom Pathogen abgegebene oder freigesetzte Elicitoren, welche der Pflanze die mehr oder weniger spezifische Erkennung des Erregers ermöglichen. Je nachdem, ob eine Gruppe verschiedener Pathotypen oder nur eine einzelne physiologische Rasse des Erregers von der Pflanze erkannt wird und eine Resistenzantwort stattfindet, unterscheidet man zwischen Rassen-Sorten-unabhängiger Resistenz (horizontale oder auch quantitative Resistenz) und Rassen-

Sorten-abhängiger (vertikale oder qualitative Resistenz) (VAN DER PLANK 1984, HEATH 2000). Die Rassen-Sorten-unabhängige Resistenz steht wie auch die Nicht-Wirt-Resistenz unter einer komplexen genetischen Kontrolle, was dazu führt, daß ein bestimmter Genotyp einer Pflanzenart gegenüber einigen, wenn nicht allen Rassen eines Pathogens resistent ist. Dieser breit wirksame Schutz der Pflanze ist dauerhaft, meist jedoch nicht vollständig gegenüber den verschiedenen Pathotypen einer Erregerpopulation. Im Gegensatz hierzu steht die Rassen-Sorten-abhängige Resistenz, welche auf Seiten der Pflanze und des Pathogens jeweils durch nur ein einziges Gen bestimmt wird und somit mit dem klassischen Gen-für-Gen Modell von FLOR (1946, 1955, 1956) beschrieben werden kann. Zu jedem Wirtsgen, welches eine Resistenz der Pflanze bewirkt (Resistenzgen), steht auf Seiten des Pathogens ein korrespondierendes Avirulenzgen. Man geht davon aus, daß das Resistenzgenprodukt als Rezeptor fungiert und das Produkt des Avirulenzgens (*avr*) oder ein Folgeprodukt seiner enzymatischen Aktivität mit erstem interagiert (HEATH 1991, DE WITT 1997) und so über verschiedene Signaltransduktionskaskaden eine erfolgreiche Abwehr des Pathogens eingeleitet wird (SCHEEL 1998). Fehlt eine der beiden Komponenten, oder ist eine aufgrund einer Mutation modifiziert kommt es nicht zu einer Resistenzreaktion der Pflanze und die Interaktion ist kompatibel.

### **1.2.2 Induzierte Resistenz**

Neben den bereits dargestellten Formen von Resistenz gegen phytopathogenen Organismen wird mit der Induzierten Resistenz (IR) eine weitere pflanzliche Abwehrreaktion beschrieben, die eine Resistenz gegenüber einem breiten Spektrum von Pathogenen vermittelt (KESSMANN 1994, STICHER 1997). Diese unspezifische Form der Resistenz ist definiert als eine Erhöhung der pflanzeigenen Widerstandsfähigkeit nach Induktion durch exogen applizierte Faktoren, welche biologischen ( $\Rightarrow$  biologisch Induzierte Resistenz, BIR) oder auch chemischen ( $\Rightarrow$  chemisch Induzierte Resistenz, CIR) Ursprungs sein können. Die Zeit zwischen Induktion und einsetzender Schutzwirkung dauert in der Regel mehrere Tage (OOSTENDORP *et al.* 1996). Bei der IR handelt es sich um einen Prozeß, der sowohl die Auslösung und Verstärkung zellulärer Abwehrmechanismen umfaßt, als auch die erhöhte Bereitschaft der Pflanze beinhaltet, schneller auf einen Pathogenbefall zu reagieren (HAMMERSCHMIDT 1993). Dieser Zustand erhöhter Abwehrbereitschaft wird auch als Sensibilisierung (*sensitizing*) oder *priming* charakterisiert (CONRATH *et al.* 2001)

und kann mehrere Tage, Wochen oder sogar Monate andauern (HAMMERSCHMIDT 1993, SCHNEIDER *et al.* 1996). Da diese Resistenz rassenunabhängig und in der Regel nicht zu einem vollkommenen Schutz der Pflanze führt, kann die IR auch als eine Verstärkung der horizontalen Resistenz angesehen werden (HÜCKELHOVEN 1999).

### **1.2.2.1 Biologisch Induzierte Resistenz**

Das Phänomen der IR wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt und von verschiedenen Phytopathologen beschrieben (CARBONE und ARNAUDI 1930, CHESTER 1933, GÄUMANN 1946). Sie zeigten den Zusammenhang zwischen einer Erstinfektion und der erhöhten Abwehrbereitschaft der Pflanze gegenüber einem nachfolgenden Befall. Es wurde damals schon ein Signal vermutet, welches im infizierten Blatt produziert und anschließend in andere Bereiche der Pflanze verbracht wird, wo es Resistenz induziert. Je nachdem, ob die Induktion der Resistenz auf das primär befallene Blatt beschränkt bleibt oder auch in anderen Bereichen der Pflanze induziert wird, sprechen wir heute von lokal, bzw. systemisch Induzierter Resistenz (SIR). Detaillierte Experimente von ROSS (1961) an Tabak zeigten erstmalig, daß eine Nekrosen verursachende Infektion der unteren Blattetage mit TMV (Tabakmosaikvirus) zu einer Induktion der Resistenz auf höher gelegenen Blättern führt. Er nannte diese Form der biologisch induzierten Resistenz *systemic acquired resistance* (SAR). Der von ROSS (1961) geprägte Begriff der SAR wurde später auf weitere Formen der IR übertragen und sorgt bis heute für unklare Aussagen über die eigentlich beschriebene Resistenzphänomene.

Aufgrund der Akkumulation von Salicylsäure (SA) in befallenen wie auch in entfernt liegenden, nicht befallenen Bereichen der Pflanze wurde SA lange Zeit als das systemisch vermittelnde Signal angesehen, welches für die Ausprägung der SAR verantwortlich ist. Es zeigte sich, daß der endogene SA-Gehalt mit der Expression von PR-Proteinen (vgl. Kap. 4.1) und der Resistenz korreliert (ENYEDI *et al.* 1992, YALPANI *et al.* 1993). Transgene Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen, bei denen eine Akkumulation von SA durch die konstitutive Expression einer bakteriellen Salicylathydroxylase (*NahG*) aus *Pseudomonas putida* verhindert wird, halfen bei der Aufklärung der Rolle der SA bei der SAR. Die Salicylathydroxylase metabolisiert SA zu SAR-inaktivem Catechol. *NahG*-Pflanzen können deshalb nach einem Pathogenbefall keine SA mehr akkumulieren, die Expression SAR-spezifischer Gene unterbleibt und die Pflanzen sind weiterhin anfällig gegenüber einer sekundären

Infektion. Pfropfungsexperimente an Tabakpflanzen von VERNOOIJ *et al.* (1994) zeigen, daß infizierte Wurzelstöcke von *NahG*-Pflanzen auch ohne Akkumulation von SA in aufgepfropften Wildtyp-Sprossen in der Lage sind, eine Resistenz zu induzieren. Andererseits sind Wurzelstöcke von nicht transgenen Wildtyppflanzen nicht in der Lage, in aufgepfropften *NahG*-Sprossen eine SAR aufzubauen. Im Gegensatz zu *NahG*-Pflanzen zeigen transgene Tabakpflanzen, welche eine konstitutiv erhöhte SA-Biosynthese haben (*CSA, constitutive SA biosynthesis*), auch eine konstitutive SAR-Genexpression sowie eine erhöhte Resistenz gegen Pathogene (VERBERNE *et al.* 2000). All diese Experimente belegen, daß SA nicht das in höher gelegene Bereiche der Pflanze translozierte Signalmolekül ist, aber trotzdem ein wichtiges Element bei der Etablierung der SAR ist. Das eigentliche systemische Signal entsteht unabhängig von SA und konnte bis heute nicht identifiziert werden.

In den letzten Jahren wurden die Experimente von ROSS (1961) von vielen Arbeitsgruppen wieder aufgegriffen und das breite Spektrum der SAR demonstriert. Mittlerweile konnte für viele, meist jedoch dikotyle Pflanzen die Ausprägung der SAR nachgewiesen werden (STICHER *et al.* 1997). Zu den am besten charakterisierten Pflanzen gehören Tabak und Gurke, aber auch *Arabidopsis thaliana*. Die Modellpflanze der Pflanzengenetik wird häufig dazu verwendet, die Mechanismen, welche der SAR zugrunde liegen, aufzuklären (UKNES *et al.* 1992, KESSMANN *et al.* 1994, LAWTON *et al.* 1994, VAN WEES *et al.* 2000). Das Spektrum an Pathogenen, gegen welche die SAR wirksam ist und die biochemischen Schutzmechanismen, die eingeleitet werden, sind charakteristisch für die Pflanzenart und unabhängig vom auslösenden Pathogen (MADAMANCHI und KUĆ 1991, Oostendorp *et al.* 1996).

PIETERSE *et al.* (1998), VAN LOON *et al.* (1998), PIETERSE und VAN LOON (1999) fanden neben der durch Pathogene ausgelösten Form der IR eine weitere, welche durch wurzelbesiedelnde Bakterien bewirkt wird. Da diese Form der IR einerseits durch nicht-pathogene Organismen hervorgerufen wird und andererseits über andere Signalkaskaden (Jasmonat- und Ethylen-abhängig) abläuft als die SAR, führten sie zur Abgrenzung von dieser den Begriff *induced systemic resistance* (ISR) ein.

Neben den biologisch induzierten Resistenzen gibt es eine weitere Form der Resistenz, welche durch Applikation natürlicher oder auch chemischer Substanzen hervorgerufen werden kann. Diese Form der IR nennt man chemisch induzierte Resistenz (CIR).

### 1.2.2.2 Chemisch Induzierte Resistenz

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl natürlich vorkommender und synthetischer Substanzen auf eine resistenzinduzierende Wirkung untersucht. Substanzen, welche diese Wirkung haben, nennt man Resistenzinduktor. Nach SCHNEIDER *et al.* (1996) und KESSMANN *et al.* (1994) sollte ein potentieller Resistenzinduktor folgende Eigenschaften haben:

- a) Durch Applikation kommt es zu einer andauernden Aktivierung pflanzlicher Abwehrmechanismen, die zumindest zu einer partiellen Resistenz führen.
- b) Die Substanz sollte Schutz gegen ein breites Spektrum an Pathogenen vermitteln.
- c) Der Induktor selbst, oder seine Metabolite, sollten keine antimikrobielle Wirkung haben.

#### 1.2.2.2.1 Salicylsäure und ihre Derivate

Salicylsäure (SA) spielt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion nach einer Infektion durch Pathogene (vgl. Kap. 4.1). Dies führte zu der Annahme, daß exogen applizierte SA möglicherweise als Resistenzinduktor agieren könnte. Es zeigte sich, daß eine exogene Applikation von SA und einigen ihrer Derivate, wie Acetylsalicylsäure (Aspirin) oder 3,5-Dichlorsalicylsäure (DCSA) die Kriterien für Resistenzinduktoren erfüllten (WHITE 1979, KESSMANN *et al.* 1994, KOGEL *et al.* 1995, BECKHOVE 1995 unveröffentlicht). Im Gegensatz zu DCSA erwies sich die reine Form der SA jedoch als ungeeignet für eine lang anhaltende Wirkung der CIR, da sie einerseits schnell zu nicht aktiven  $\beta$ -Glycosiden umgewandelt wird (ENYEDI und RASKIN 1993, BIERMANN und KOGEL unveröffentlicht) und andererseits schon bei geringer Überdosierung zu phytotoxischen Effekten führt (KESSMANN *et al.* 1994).

#### 1.2.2.2.2 BTH und DCINA

In Anlehnung an die essentielle Rolle der SA bei der Ausprägung der SAR wurden synthetische, funktionsanaloge Substanzen gefunden, welche in der Signaltransduktionskaskade der SAR direkt am oder unterhalb (*downstream*) des Wirkortes der SA wirken. BTH (Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester, auch Azibenzolar-S-thylester) und DCINA (2,6-Dichlorisonikotinsäure) gelten derzeit als die potentesten Resistenzinduktoren für dikotyle wie auch monokotyle Pflanzen (KOGEL *et al.* 1994, GÖRLACH *et al.* 1996, STICHER *et al.* 1997). Für dikotyle Pflanzen konnte gezeigt werden, daß beide Induktoren eine Resistenz gegen das gleiche Pathogenspektrum bewirken und

auch das gleiche Set an Genen exprimiert wird wie bei der durch Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze) ausgelösten SAR (FRIEDRICH *et al.* 1996, LAWTON *et al.* 1996, MÉTRAUX *et al.* 1991, WARD *et al.* 1991). In Monokotylen (Gerste, Weizen, Reis und Mais) dagegen ist bisher nur eine Wirkung gegenüber Pilzen beschrieben worden (KOGEL *et al.* 1994, GÖRLACH *et al.* 1996, SCHWEIZER *et al.* 1997, MORRIS *et al.* 1998). KOGEL *et al.* (1994) konnten anhand des Pathosystems Gerste-Echter Gerstemehltau zeigen, daß CIR durch DCINA die Phänokopie eines auf einem Resistenzgen (*Mlg*) basierenden Abwehrmechanismus darstellt. In Weizen und Gerste wurden nach Behandlung mit Resistenzinduktoren eine Reihe von pathogeneseunabhängigen Genen identifiziert, welche aufgrund ihrer hohen Spezifität für chemische Induktion als Markergene für die CIR angesehen werden (GÖRLACH *et al.* 1996, BEBER *et al.* 2000). Das Spektrum dieser Gene ist weit gefächert, doch ihre Bedeutung für die CIR konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. GÖRLACH *et al.* (1996) identifizierten nach Induktor-Behandlung (BTH, DCINA, SA) von Weizen fünf *WCI*-Gene (*wheat chemically induced genes*). Unter den Genprodukten befinden sich eine Lipoxygenase (WCI-2), eine Cysteinproteinase (WCI-4) sowie drei weitere mit unbekannter Funktion (WCI-1, WCI-3, WCI-5). WCI-3 weist am C-Terminus eine Homologie zu dem Produkt eines Stressgens von Reis auf.

BEBER *et al.* (2000) identifizierten über ein differentielles screening (suppressive Subtraktionshybridisierung) in DCINA-behandelter Gerste neun chemisch induzierte Gene, welche sie als *BCI*-Gene (*barley chemically induced genes*) bezeichneten. Die *BCI*-Gene codieren für eine Lipoxygenase (BCI-1), ein Thionin (BCI-2), eine saure Phosphatase (BCI-3), ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes *EF-hand*-Protein (BCI-4), ein Serin-Proteinaseinhibitor (BCI-7), eine Fettsäuredesaturase (BCI-8), eine Apyrase (BCI-9) sowie zwei weitere Proteine mit unbekannter Funktion (BCI-5, BCI-6). Für BCI-4 konnte gezeigt werden, daß eine transiente Überexpression des Gens in nicht induzierten, anfälligen Gerstensorten zu einer deutlichen Reduktion der Penetrationseffizienz von Echtem Gerstemehltau führt (BEBER 2001).

Für BTH wurde die Genehmigung für die Anwendung als Pflanzenstärkungsmittel im Anbau von Weizen, Reis, Bananen, Gemüse und Tabak erteilt (ROBERTS und HUTSON 1999) und ist seitdem auch kommerziell erhältlich. Das BTH-Produkt für den Weizenanbau wurde vor kurzem, aufgrund der geringen Akzeptanz der meisten Landwirte gegenüber Substanzen, welche keinen 100%igen Schutz gegen phytopathogene Organismen bewirken, aus ökonomischen Gründen aus dem Handel genommen.

### 1.2.2.2.3 BABA

Einige Untersuchungen belegen, daß die nicht-proteinogene Aminosäure D,L- $\beta$ -Aminobuttersäure (BABA) oder ihr 3-(S)-Enantiomer zumindest in dikotylen Pflanzen eine Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen bewirkt (SCHNEIDER *et al.* 1996, HWANG *et al.* 1997, SIEGRIST *et al.* 2000, ZIMMERLI *et al.* 2000). Teilweise konnten auch kurative Effekte einer BABA-Behandlung dokumentiert werden (COHEN 1995, TOSI *et al.* 1998). Die genaue Wirkung von BABA ist jedoch ungeklärt und wird kontrovers diskutiert. BABA wird systemisch in der Pflanze transportiert und führt zur Induktion von Abwehrmechanismen, die teilweise für SAR typisch sind. COHEN *et al.* (1994) fanden heraus, daß eine Behandlung von Tomatenpflanzen mit BABA zu einer Akkumulation von PR1, einem Marker der SAR in Dikotylen, führt. In Tabak wurde die resistenzinduzierende Wirkung von BABA gegenüber TMV als Folge der Bildung nekrotischer Mikro-Läsionen und der damit verbundenen Induktion des SA-abhängigen SAR-Signalweges erklärt (SIEGRIST *et al.* 2000). Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse von MAUCH-MANI (1999) und ZIMMERLI *et al.* (2000), die zeigen, daß in *Arabidopsis* die Resistenzinduktion nicht über Akkumulation von SA und den Signaltransduktionsweg der SAR abläuft und auch kein Zusammenhang mit dem Jasmonat- und Ethylen-abhängigen Signalweg der ISR besteht.

### 1.2.2.2.4 Andere Substanzen

Neben den bereits erwähnten Resistenzinduktoren gibt es noch eine Anzahl an weiteren Substanzen, welche nach lokaler Applikation oft Läsionen hervorrufen und so die biologische Induktion der SAR kopieren. Hierzu gehören verschiedene Salze, wie anorganische Phosphate, Silicate und Oxalate (MUCHARROMAH und KUĆ 1991, STICHER *et al.* 1997) sowie ungesättigte Fettsäuren (Cohen *et al.* 1991). Eine weitere Gruppe von Substanzen mit resistenzinduzierender Wirkung bilden verschiedene Elicitormoleküle biologischen Ursprungs wie Arachidonsäure, Chitosan, cytotoxische Elicitine (z.B. Cryptogenin), Harpine von phytopathogenen Bakterien und einem unbekanntem Wirkstoff aus dem Kulturfiltrat eines *Bacillus subtilis*-Stammes (B50; SCHNEIDER *et al.* 1996, STEINER *et al.* 1988). Für B50 konnte eine gute Wirksamkeit in einer Reihe von Wirt-Parasit-Systemen insbesondere mit Echten und Falschen Mehltreibern sowie Rosten gezeigt werden (STEINER *et al.* 1988, STEINER und SCHÖNBECK 1997). Die Isolation der wirksamen Komponente steht bis heute noch aus.

### **1.3 Abwehrmechanismen der Pflanze und Signalwege der IR**

#### **1.3.1 Präformierte Komponenten der Abwehr**

Unter präformierten Komponenten der Abwehr werden physikalische und biochemische Abwehrmechanismen der Pflanze zusammengefaßt, welche nicht induziert werden und bereits vor dem Kontakt mit einem Pathogen vorhanden sind. Die Ausprägung der einzelnen Faktoren ist vom physiologischen Zustand und Entwicklungsstatus der Pflanze abhängig und leistet somit auch einen Beitrag zur sogenannten Altersresistenz.

Zu den physikalischen Abwehrmechanismen gehören einerseits mechanische Barrieren, wie die epikutikuläre Wachsschicht, die Kutikular, die Zellwand, wobei Aufbau und Zusammensetzung (z.B. Lignifizierungsgrad) eine entscheidende Rolle spielen, andererseits aber auch das Fehlen bestimmter struktureller Erkennungsfaktoren für das Pathogen (AGRIOS 1997, SCHLÖSSER 1997).

Die biochemischen Komponenten der Abwehr können einfach strukturiert oder sehr komplex aufgebaut sein und stammen aus den unterschiedlichsten Stoffwechselwegen der Pflanze. Zu den einfacher aufgebauten Molekülen gehören Metaboliten des Sekundärstoffwechsels wie Senföle, Saponine und andere Phytotoxine, Stoffe mit enzyminhibierender Wirkung wie verschiedene Proteaseinhibitoren, Gerbstoffe und Phenole aber auch einfache Peptide mit antimikrobieller Wirkung in Speicher- und generativem Gewebe. Zu den komplexer aufgebauten Komponenten zählen kohlenhydratbindende Lectine, hydrolytische und inhibierende Enzyme wie RIPs (ribosomeninaktivierende Proteine), Defensine und Snakins (STIRPE *et al.* 1992, BROEKAERT *et al.* 1995, AGRIOS 1997, SCHLÖSSER 1997, SEGURA *et al.* 1999, HEATH 2000). Wie auch bei den physikalischen Komponenten der Abwehr kann das Fehlen von Faktoren, wie für das Pathogen essentielle Substanzen oder Rezeptoren für wirtsspezifische Toxine, zu einer Resistenz führen (AGRIOS 1997, SCHLÖSSER 1997).

#### **1.3.2 Aktivierte Abwehrmechanismen**

Durch den Kontakt eines Pathogens mit einer Pflanze wird eine Reihe verschiedener pflanzlicher Abwehrmechanismen, welche physikalischer oder biochemischer Natur sind, ausgelöst. Die Erkennung des Pathogens erfolgt hierbei über direkt oder indirekt vom Pilz freigesetzte Stoffe, sogenannte Elicitoren. Elicitoren können das Produkt eines Avirulenzgens oder durch Enzymaktivität freigesetzte Zellwandbestandteile des Pathogens bzw. der

Pflanze sein. Die Erkennung des Elicitors erfolgt über plasmamembrangebundene oder cytosolische Rezeptoren der attackierten Pflanzenzelle und führt über verschiedene Signaltransduktionswege zu einem komplexen Netzwerk an Abwehrmechanismen (SCHEEL 1998).

Die meisten phytopathogenen Organismen müssen für eine erfolgreiche Besiedlung in das Gewebe der Pflanze eindringen. Durch Abgabe von lytischen Enzymen und Einsatz von oft hohem mechanischen Druck versucht das Pathogen die Zellwand zu penetrieren. Die Pflanze versucht ihrerseits dieses durch eine Verstärkung der Zellwand an der Penetrationsstelle zu verhindern. Dies wird durch Ablagerung von Zellwandmaterial, insbesondere Callose (poly- $\beta$ -1,3-Glucan), Lignin (AIST und ISRAEL 1986, MOERSCHBACHER *et al.* 1990), Suberin, und hydroxyprolinreiche Glykoproteine (BESTWICK *et al.* 1995) sowie deren Vernetzung oder Polymerisation (BRISSON *et al.* 1994) erreicht. Dieser sehr früh in die Wirt-Parasit-Interaktion eingreifende lokal eng begrenzte Abwehrmechanismus der Bildung von Zellwandappositionen (Papillen) verwehrt vor allem Pilzen aber auch Bakterien den Zugang in die Zelle und stellt damit eine der wichtigsten Resistenzantworten der Pflanze dar (AGRIOS 1997, SCHIFFER 1998). Weitere im Bereich der Zellwand tätige Komponenten sind Extensine, reaktive Sauerstoffintermediate (ROIs, *reactive oxygen intermediates*, z.B.  $H_2O_2$ ) und diverse Phytoalexine (HAMMOND-KOSACK und JONES 1996). Diese Substanzen wirken auf verschiedene Art und Weise toxisch auf das Pathogen und somit verstärken sie indirekt die Penetrationsresistenz, da das Pathogen in seiner Vitalität beeinträchtigt wird.

Versagt die pflanzliche Abwehr auf der ersten Ebene und die attackierte Zelle wird vom Pathogen penetriert, kommt es häufig zu einem weiteren induzierten Abwehrmechanismus der Pflanze. Die Hypersensitive Reaktion (HR), die zum schnellen Absterben der betroffenen oder auch mehrerer umgebener Zellen führt ist ebenfalls eine effektive Maßnahme, um viele Pathogene an ihrer Weiterentwicklung zu hindern. Besonders obligat biotrophen Pathogenen, die für ihre Entwicklung auf intakte, lebende Zellen angewiesen sind, wird durch das aktive Absterben einer einzelnen oder mehrerer Zellen die Lebensgrundlage entzogen. Nekrotrophe Organismen könnten hierdurch einen Vorteil erlangen, da sie sich von abgestorbenen Zellen ernähren. Bei der HR kommt es jedoch zu einer Dekompartimentierung der Zelle, wobei möglicherweise antimikrobielle Substanzen wie Phytoalexine aus der Vakuole oder anderen Zellkompartimenten freigesetzt werden.

Außerdem werden phenolischen Komponenten angereichert, die durch Polymerisation eine Eingrenzung und auch Abtötung der Pathogene zur Folge haben können (KUĆ 1995, HAMMOND-KOSACK und JONES 1996, SCHEEL 1998).

Nach einem Befall durch Pilze, Bakterien und Viren oder einer Elicitorapplikation kommt es während der Pathogenese zur Akkumulation einer Reihe definierter Transkripte, deren zugehörige Proteine kurze Zeit später nachzuweisen sind (BOWLES 1990, BOYD *et al.* 1994). Diese intra- oder extrazellulär lokalisierten Proteine werden als *pathogenesis related proteins* (PR-Proteine) bezeichnet. PR-Proteine haben unterschiedlichste Funktionen werden heute in 14 Klassen eingeteilt, welche mit PR-1 bis PR-14 bezeichnet werden (VAN LOON und VAN STRIEN 1999, COLLINGE *et al.* 2001). In Weizen konnten bisher eine Reihe von PR-Proteinen nachgewiesen werden, welche 9 der 14 Klassen zuzuordnen sind (MUTHUKRISHNAN *et al.* 2000). Hierunter befinden sich neben der PR-1-Familie, deren Funktion bis heute unbekannt ist, auch noch hydrolytische Enzyme wie Glucanasen (PR-2) und Chitinasen (PR-3), welche eine direkte zersetzende Wirkung auf pilzliche Zellwände haben sowie chitinbindende Proteine (PR-4) ohne Chitinaseaktivität (BRUNNER *et al.* 1998), Thaumatin ähnliche Proteine (PR-5), Proteinaseinhibitoren (PR-6), Peroxidasen (PR-9), fungitoxische Thionine (PR-13) und Lipid-Transfer-Proteine (LTP, PR-14).

In vereinzelt Fällen ist zwar die biologische Bedeutung von PR-Proteinen aufgeklärt, doch geht man davon aus, daß es nach einem Pathogenbefall etwa 1000 Gene neu exprimiert werden (COLLINGE *et al.* 2001). Nicht alle Genprodukte entsprechen der klassischen Vorstellung eines PR-Proteins, da sie, neben der Induktion durch Pathogene, teilweise auch gewebespezifisch in nicht infizierten Pflanzen, oder in verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze nachgewiesen werden können. Sie werden deshalb als *PR-like-proteins* bezeichnet (VAN LOON 1999). Es zeigte sich jedoch, daß dies auch für einen Teil der "klassischen" PR-Proteine zutrifft, da sie oftmals bei verschiedenen Stressen oder in keimenden Samen exprimiert werden (COLLINGE *et al.* 2001), letzteres dient wohl einem frühen Schutz des empfindlichen Keimlings vor einem Pathogenbefall. In verschiedenen Experimenten mit transgenen Tabakpflanzen konnte gezeigt werden, daß die konstitutive Expression eines einzelnen oder einer Kombination von PR-Genen eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen bewirkte (ALEXANDER *et al.* 1991, JACH *et al.* 1995, STICHER *et al.* 1997). Es konnte allerdings bis heute noch nicht eindeutig gezeigt

werden, daß das Ausschalten eines einzelnen PR-Gens zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Pathogenen führt (MUTHUKRISHNAN *et al.* 2000). Neuste Untersuchungen (SCHULTHEIB, HÜCKELHOVEN, KOGEL, unveröffentlicht) deuten jedoch darauf hin, daß die Unterdrückung der *PR1b*-Translation durch RNA *interference* (RNAi) zu einer erhöhten Anfälligkeit von Gerste gegenüber dem Echten Gersten Mehltaupilz führt.

## **1.4 Das Pathosystem Weizen-Echter Weizenmehltau**

### **1.4.1 Der Weizen**

Im Laufe des letzten Jahrhunderts entwickelte sich Weizen neben Reis zum wichtigsten Grundnahrungsmittel weltweit. Mit einer Jahresproduktion von derzeit knapp 600 Mio. Tonnen (nach Angaben der FAO, *Food and Agricultural Organisation of the United Nations*) wird mit Weizen ca. 35 % des Weltjahresbedarfs an Getreide gedeckt.

Die Kultivierung des Weizens begann um 7000 v.Chr. im euroasiatischen Raum. Hier wurden Wildformen zunächst nur gesammelt und dann auch gezielt angebaut. Aus spontanen Kreuzungen und natürlichen Mutationen wurden neue Formen ausgelesen und weiter vermehrt. Der heute zu 90% angebaute hexaploide Weich- oder auch Brotweizen (*Triticum aestivum* L.) ist aus drei verschiedenen Wildformen entstanden. Vermutlich entstand zuerst aus Wildformen des Einkorn (*T. urartu*) und des Spelzweizens (*Aegilops speltoides*) unter Beibehaltung der beiden vollständigen (diploiden) Chromosomensätze der tetraploide wilde Emmer (*T. dicoccoides*). Durch Zusammenlagerung mit einem weiteren Wildweizen (*T. tauschii*) sind schließlich Dinkel (*T. spelta*) und der Kulturweizen (*T. aestivum*) hervorgegangen. Der tetraploide Hartweizen (*T. durum*), dem mit 10 % Anteil an der Weltweizenernte ebenfalls eine wirtschaftliche Bedeutung zukommt, ist auf die Linie des wilden Emmers zurückzuführen (FRANKE 1989).

Durch Anpassung und Selektion entstanden viele verschiedene Weizensorten mit unterschiedlichsten Eigenschaften. Noch Ende des 19. Jahrhunderts gab es in Mitteleuropa über tausend verschiedene Sorten, deren Namen häufig etwas über das Herkunftsgebiet aussagten (z.B. Hessischer Landweizen, Angerer Früh oder Nordstrandweizen). Durch die Entwicklung moderner Hochleistungssorten, die in einer vereinheitlichten landwirtschaftlichen Praxis mit mineralischer Düngung, synthetischem Pflanzenschutz und gegebenenfalls Bewässerung hohe Erträge bringen, ging jedoch die genetische Vielfalt des

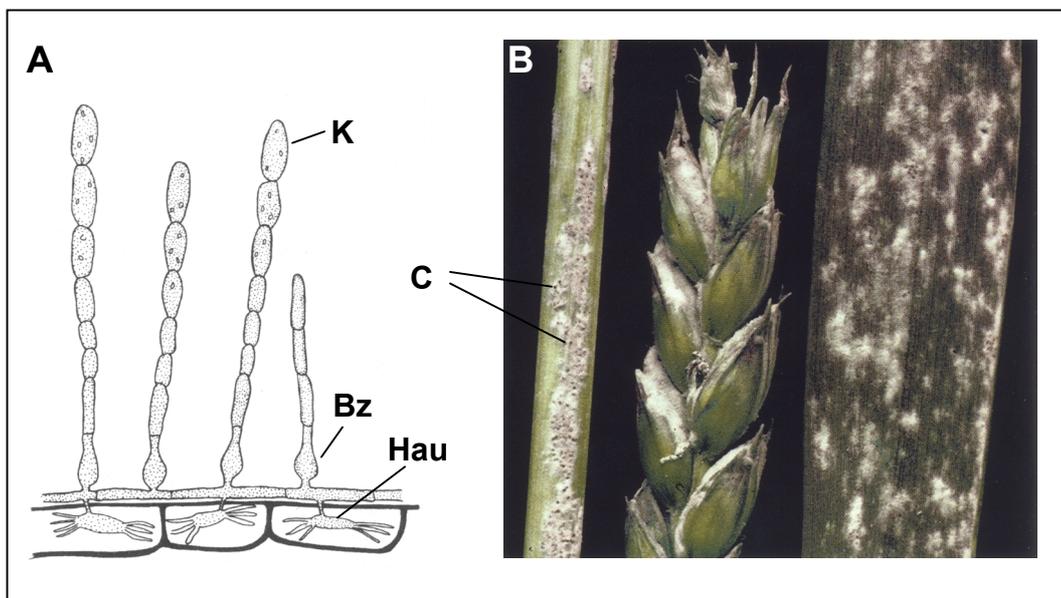
Weizen verloren. Der wichtigste Verwendungszweck des Weizens ist die Herstellung von Mehl für Brot und Gebäck. Er wird außerdem bei der Herstellung von Frühstücksflocken und Weizenkeimöl sowie in begrenztem Maße zur Produktion von Bier (Weißbier), Whisky, industriellem Alkohol, Kaffee-Ersatz und Stärke eingesetzt. Qualitativ geringwertige Sorten und Nebenprodukte, die beim Mahlen, Brauen und Destillieren anfallen, verwendet man als Viehfutter. Der Hartweizen wird hauptsächlich zur Herstellung von Teigwaren (Nudeln) und Grieß verwendet.

In den gemäßigten Zonen Mitteleuropas wird hauptsächlich die gegen Kälte unempfindliche Winterform des Weichweizens in Kultur genommen. Winterweizen wird Ende Oktober bis in den Dezember hinein ausgesät. Niedrige Temperaturen knapp über dem Gefrierpunkt bewirken bei der keimenden Saat einerseits eine Anpassung gegenüber Frösten während der Wintermonate, andererseits lösen sie gleichzeitig den Vernalisationsreiz aus, der zu einer beschleunigten Blühentwicklung im Frühjahr führt (SCHUCHERT und MEYER 1992). Während der Vegetationsperiode kommt der Weizen mit einer Vielzahl an phytopathogenen Organismen in Kontakt, unter denen Mehltaupilze zu den größten Ernteverlusten beitragen (KOLBE *et al.* 1984). Weizen besitzt gegenüber dem Echten Mehltau eine Reihe an Resistenzgenen ( $Pm_x$  (1-21)). POWERS und SANDO (1957) konnten zeigen, daß das Gen-für-Gen Modell von FLOR (*review* 1971) auch auf das Pathosystem Weizen-Weizenmehltau übertragbar ist (vgl. auch Kap. 4.3).

Aufgrund der extrem schnellen Windverbreitung von Mehltausisolaten, von ca. 110 km/Jahr (LIMPERT 1987), konnte sich bisher keine Sorte mit neu eingekreuzten Resistenzgenen lange gegen das Auftreten von virulenten Isolaten behaupten (HERMANSEN *et al.* 1978, FELSENSTEIN 1991). Obwohl es schon verschiedene Ansätze der Züchter gab, verschiedene Resistenzgene miteinander zu kombinieren, ist der Einsatz von Fungiziden bis heute noch das einzige zuverlässig wirkende Mittel zur Mehltaubekämpfung im Weizenanbau. Aus ökologischen Gründen ist es deshalb unabdingbar, neue Pflanzenschutzkonzepte zu entwickeln, welche die Umwelt schonen und trotzdem eine wirtschaftlich vertretbare Bekämpfung des Mehltaus ermöglichen.

### 1.4.2 Der Echte Weizenmehltaupilz

Der Echte Weizenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Synonym: *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, s. Abb. 1) ist im mittel- und nordeuropäischen Raum ein wirtschaftlich sehr bedeutendes Pathogen. Er tritt wegen der für ihn günstigen Bedingungen eines gemäßigten Klimas regelmäßig und oftmals epidemisch auf und kann beachtliche Schäden verursachen, welche im Einzelfall 25 % Ertragsverlust übersteigen (HOFFMANN und SCHMUTTERER 1983). Systematisch gehört der Echte Weizenmehltau zu den *Erysiphales*, einer Ordnung des Stammes der *Ascomycota*. Er ist ein obligat biotrophes Pathogen, welches sich durch ein ektoparasitisches Myzel und eine intrazelluläre Haustorienbildung im periplasmatischen Raum der Epidermiszellen des Wirtes auszeichnet (JØRGENSEN 1988).



**Abb. 1: *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* auf Weizen.**

**A:** Schematische Darstellung mehltauinfizierter Epidermiszellen. Der Pilz hat die Epidermiszellen penetriert und fingerförmige Haustorien (Hau) ausgebildet. An Sporenträgern mit keuliger Basalzelle (Bz) entstehen Sporenketten mit 8-10 Konidien (K), die über den Wind verbreitet werden. **B:** Befall mit Echtem Weizenmehltau an Stengel, Ähre und Blatt. Vor der Abreife des Weizens bildet das Pilzmyzel schwarze, kugelige Cleistothecien (C) mit Ascosporen, die aus der (pseudo)sexuellen Vermehrung des Pilzes stammen (entnommen aus: HOFFMANN & SCHMUTTERER 1999).

Der asexuelle Entwicklungszyklus von *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* beginnt sobald eine Konidiospore auf die Oberfläche eines Weizenblattes gelangt. Bereits nach ca. 15 min. beginnt die Keimung der Spore mit einem primären Keimschlauch (PGT; *primary germ tube*). Dieser dient der Spore als Haftorgan und zur Wasseraufnahme. Dies bedingt, daß die Kutikula der Weizenzelle zumindest angelöst werden muß, da sie nicht permeabel für Wasser ist. Die Zellwand wird hierbei nicht penetriert. Nach ca. einer weiteren Stunde können erste Reaktionen der Pflanzenzelle auf den Pathogenbefall beobachtet werden. In der Zelle kommt es unterhalb des PGT zu einer Aggregation von Cytoplasma (BECKHOVE *et al.* 1996, HEITEFUSS 2001). Als erste sichtbare Abwehrreaktion der Pflanze beginnt hiermit die Bildung einer Papille (Zellwandapposition) unterhalb des PGT. Dieser Vorgang dauert etwa 7 Stunden an. Während dieser Zeit (ab ca. 3 hpi) keimt der appressoriale Keimschlauch der Konidie aus und krümmt sich nach einer Septenbildung auf die Zelle. Dort wird ein Appressorium (APP) ausgebildet, welches beginnt die Zellwand aufzulösen, um diese anschließend mit einem Penetrationskeil zu durchdringen. Ab ca. 12 hpi kommt es in der Pflanzenzelle zu starken Cytoplasmaaggregationen unterhalb des Appressoriums. Die Zelle beginnt mit der Bildung einer Papille, um den Pilz daran zu hindern die Zellwand zu penetrieren. In kompatiblen Interaktionen schafft es der Pilz meistens die Papille zu durchbrechen (ca. 16-20 hpi) und im periplasmatischen Raum ein Haustorium (HAU), das Ernährungsorgan des Pilzes, zu differenzieren. Über das Haustorium werden der Pflanzenzelle Nährstoffe entzogen und der Pilz beginnt verlängerte sekundäre Hyphen (ESH; *elongated secondary hyphae*) zu bilden. Auf die Penetration der Zelle reagiert die Pflanze in manchen Fällen, wie auch von resistenten Weizensorten bekannt, mit einer HR (vgl. Kap. 3.2). Das bedeutet, daß die infizierte Zelle aktiv abstirbt und somit dem obligat biotrophen Pilz die Nahrungsgrundlage entzieht. Bei diesem altruistischen Zelltod werden phenolische Substanzen in die Zellwand eingelagert, die bei UV Anregung im Mikroskop durch ihre Autofluoreszenz gut sichtbar sind. Kommt es nicht zu einer HR, verzweigt sich im weiteren Verlauf der Infektion das Pilzmyzel, und weitere Zellen werden penetriert. Es bilden sich sekundäre Haustorien, die wiederum der Pflanze Nährstoffe entziehen. Nachdem sich der Mehltau netzartig über das Blatt ausgebreitet hat, wird der asexuelle Entwicklungszyklus des Mehltaus nach ungefähr 7 Tagen abgeschlossen. Es bilden sich Konidienträger, an denen Sporen abgeschnürt werden, die nun über den Wind verbreitet in der Lage sind, weitere Weizenpflanzen zu infizieren. Vor der Abreife des Weizens vollendet der Pilz

seinen Lebenszyklus mit einer sexuellen Phase. Die Ascocarpentwicklung von *Blumeria* entspricht nicht der im Allgemeinen beschriebenen Vorstellung der sexuellen Entwicklungsphase von Ascomyceten und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zusammenfassend beschreibt BRAUN (1995) die Entwicklung des Ascocarps als pseudosexuellen Typ, bei dem es zur Cystogamie der einkernigen, haploiden Gametangien mit den Ascogonien kommen kann, aber nicht muß. Der Kontakt des Ascogoniums mit dem Gametangium kann ausreichend sein die Entwicklung des Ascocarps zu initiieren, so daß es im Endeffekt ohne Cystogamie zur Entwicklung von Cleistothecien kommen kann. Durch Autolyse mehrerer Zellen des Ascocarps und anschließender sekundärer Dikaryotisierung kommt es zur Initialisierung der Ascusbildung mit anschließender Meiose. Das Ascocarp wächst zu einem Cleistothecium aus, in dem sich zahlreiche Asci mit jeweils (4 –) 8 haploiden Ascosporen befinden (ELLINGBOE 1972, GÄUMANN 1946, HOFFMANN & SCHMUTTERER 1999). Der Mehltau überdauert so an Ernterückständen die Nachernteperiode und die heißen Sommermonate. Bei zunehmender Feuchtigkeit werden die Ascosporen aktiv heraus geschleudert und beginnen erneut zu keimen. Der Mehltau überwintert in den gemäßigten Breiten Mitteleuropas hauptsächlich als Myzel auf aufgelaufenem Ausfallgetreide oder der neuen Generation des Winterweizens (WIESE 1977). In den trockenen und kalten Regionen Nordamerikas und Kanadas überwintert der Pilz als Ascospore (JØRGENSEN 1988).

## **1.5 Zielsetzung**

Die systemisch Induzierte Resistenz (SIR) ist ein seit langem bekanntes Phänomen, welches einer Pflanze durch Aktivierung der pflanzeigenen Abwehrmechanismen einen lang anhaltenden Schutz gegenüber einem breiten Spektrum an Pathogenen verleiht. In letzter Zeit wurden chemische Substanzen gefunden, welche das biologische Prinzip der SAR kopieren, und ebenfalls eine lang anhaltende Resistenz von Pflanzen bewirken. Mit solchen sogenannten Resistenzinduktoren, welche keine direkte Wirkung auf Pathogene haben, besteht heute die Möglichkeit, neue umweltschonende Pflanzenschutzkonzepte zu entwickeln. Über die Wirkungsweise von Resistenzinduktoren in Getreide ist bis heute wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von BTH, einem neu entwickelten Resistenzinduktor, den Mechanismus der chemisch induzierten Resistenz (CIR) im Pathosystem Weizen-Echter Weizenmehltau aufzuklären. Ein wichtiger Aspekt war die cytologische Analyse der induzierten pflanzlichen Abwehrmechanismen, welche die Resistenz des Weizens gegenüber dem Echten Mehltau verursachen. Aufgrund voran gegangener Untersuchungen zur Wirkungsweise von DCINA und DCSA im System Gerste-Echter Gerstenmehltau war ein zentraler Punkt die Bedeutung von Papillenbildung und HR für die Resistenzantwort des Weizens aufzuklären.

In Weizen und Gerste wurden nach chemischer Induktion der Resistenz eine Reihe von Genen (*BCI*- und *WCI*-Gene) identifiziert, welche als Markergene für die CIR in Getreiden angesehen werden. Die Bedeutung dieser Gene für die CIR konnte bisher nicht geklärt werden. Ein Ziel war deshalb, in histologischen, biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen, Hinweise auf die Rolle von *WCI-1*, *WCI-3*, *LOX2Hv1* (*BCI-1*) und *PR-1* bei der Pathogenabwehr des Weizens zu finden. In *Northernblot* Analysen sollten die zeitlichen Expressionsmuster der Gene bei unterschiedlichen Applikationsarten des Induktors (Bodenbehandlung, Sprühapplikation) analysiert werden. Ebenfalls sollten nach zusätzlicher Inokulation chemisch induzierter Pflanzen *Priming*-Effekte bezüglich der Genexpression aufgezeigt werden.

*In situ* Hybridisierungen geben aufgrund der gewebespezifischen Lokalisation spezifischer m-RNAs Einblicke in die Funktion der untersuchten Gene. Deshalb mußte zunächst ein Protokoll zur *in situ* Hybridisierung in Getreideblättern erstellt und im Labor etabliert werden. Anschließend galt es durch *in situ* Expressionsanalysen zu mehreren, frühen Zeitpunkten nach einer Induktorbehandlung Auskunft über die Lokalisation von Transkripten, Gewebedispositionen, die Ausbreitung von Signalen innerhalb des Blattes und eine direkte Beteiligung der Genprodukte an der Pathogenabwehr geben zu können. Auch hierbei war es wichtig zu zeigen, ob verschiedene Applikationsarten einen Einfluß auf die Genexpressionsmuster in unterschiedlichen Gewebestrukturen haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzen und Pathogenmaterial

#### 2.1.1 Weizenkultivar

Das in allen Versuchen mit Weizen verwendete Weizenkultivar war Kanzler. Die suszeptible Sorte Kanzler ist ein Winterweichweizen, der keine bekannten Resistenzgene gegen Weizenmehltaupilze trägt.

Das Saatgut stammte von der Saatzucht Engelen-Büchling oHG, Büchling/Oberschneiding.

#### 2.1.2 Gerstenkultivar

Das zu Kontrollzwecken bei den *in situ* Hybridisierungen verwendete Gerstenkultivar war Sultan 5. Das Kultivar Sultan 5 trägt doppelhaploid das Resistenzgen *Mla-12*.

Die Sorte Sultan 5 stammte von DR. J.H. JØRGENSEN, Agricultural Research, Risø National Laboratory, Roskilde, Dänemark.

Die Vermehrung der Gerstenpflanzen wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ) in Köln durchgeführt. Das Saatgut wurde von Dr. PAUL SCHULZE-LEFERT, MPIZ, Köln, zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.3 Anzuchtbedingungen der Pflanzen

Vor der Aussaat der Pflanzen wurden die Körner 24 h in mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Petrischalen vorgekeimt. Anschließend wurden jeweils 5 Körner in 200 ml Töpfen in einer Reihe ausgelegt, mit Erde bedeckt und bewässert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte entweder in einem Gewächshaus mit 16 h Zusatzbeleuchtung oder in Phytokammern unter kontrollierten Bedingungen, bei 16 - 18 °C, 60 % relativer Luftfeuchtigkeit und einer Lichtperiode von 16 h mit einer Intensität von ca. 100  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Die Pflanzen wurden täglich mit Leitungswasser gegossen.

#### 2.1.4 Pathogenmaterial

Für Inokulationsexperimente mit Echtem Weizenmehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici* [Bgt]; Synonym: *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*) wurde ein in Aachen selbst isoliertes Freilandisolat verwendet.

Für Experimente mit Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei* [Bgh]; Synonym: *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) wurde die Rasse *Egh* A6 eingesetzt, welche das mit dem Resistenzgen *Mla-12* korrespondierende Avirulenzgen *Avr a-12* trägt.

Die Mehltaurasse *Bgh* A6 stammte von DR. J. H. JØRGENSEN, Agricultural Research, Risø National Laboratory, Roskilde, Dänemark.

#### 2.1.5 Nachzucht der Pathogene

Eine Nachzucht der obligat biotrophen Mehltaupilze wurde jeweils auf dem entsprechenden anfälligen Pflanzenmaterial durchgeführt. Die Vermehrung des Weizenmehltaus fand auf der Weizensorte Kanzler, die des Gerstenmehltaus auf der Gerstensorte Golden Promise statt.

Hierzu wurden wöchentlich die entsprechenden Konidien stark befallener Pflanzen aus den vorhergegangenen Nachzuchten über 7 Tage alten Pflanzen abgeschüttelt und diese somit infiziert. Die Nachzucht der Pathogene fand unter den in Kapitel 2.1.3 genannten Anzuchtbedingungen statt. Nach etwa einer Woche hatten die Mehltaupilze ihren vegetativen Entwicklungszyklus auf den Pflanzen beendet und sporulierten. Das so gewonnene Sporenmaterial konnte etwa eine Woche für Inokulationsexperimente verwendet werden. Am Tag vor der Inokulation der Versuchspflanzen wurden die alten, teilweise verklumpten Konidien von den Pflanzen der Nachzucht abgeschüttelt. Die sich neu bildenden frischen Sporen hatten auf diese Art und Weise den gleichen Entwicklungszustand, ließen sich gleichmäßig verteilen und wiesen eine hohe Keimrate auf.

## 2.2 Behandlung der Pflanzen mit BTH

Der Resistenzinduktor BTH ist ein Benzothiadiazolderivat (Benzo[1,2,3]thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester; CGA-245704, Novartis, Basel, Schweiz), welches zur besseren Applizier- und Lösbarkeit in einer Formulierung (WP; *wettable powder*) mit 50 %

aktiver Substanz vorlag. Zur Untersuchung der Wirkungsweise von BTH wurde an 14 Tage alten Pflanzen entweder eine Sprühbehandlung oder eine Applikation der Substanz über den Boden (*soil drench*) durchgeführt. Im Falle einer Sprühbehandlung wurde eine Lösung von 100 ppm aktiver Substanz in A. dest. mit einer Zerstäuberflasche aus etwa 50 cm Entfernung über den Pflanzen verteilt bis die Blattoberflächen gleichmäßig benetzt waren und noch keine Tropfen der Lösung an den Blättern herunter liefen. Für eine Applikation der Substanz über den Boden wurde zunächst eine höher konzentrierte Lösung angesetzt, welche nach Applikation über das Gießwasser eine Endkonzentration von 100 ppm aktiver Substanz bezogen auf das Bodenvolumen ergab. Mit einer Pipette wurde eine Menge von 10 ml pro 200 ml Erde fassenden Topf gleichmäßig über dem Substrat verteilt. Um einen eventuellen Effekt der Formulierung ausschließen zu können, wurden die Kontrollpflanzen mit der entsprechenden Konzentration an reinem WP behandelt.

### **2.3 Makroskopische Untersuchungen**

Für makroskopische Untersuchungen wurden 14 Tage alte Pflanzen mit BTH oder WP behandelt und die Blätter 4 Tage später (4 dpt, *days post treatment*) beidseitig mit einer Dichte von 3-5 Konidien pro mm<sup>2</sup> inokuliert. Diese Inokulationsdichte gewährleistet, daß sich die einzelnen Mehltaupusteln bei der Entwicklung der Sporenträger nicht überschneiden und so klar als Einzelereignis gewertet werden konnten. Nach 7 Tagen wurde die Befallsdichte anhand der Anzahl der Mehltaupusteln auf der abaxialen und adaxialen Seite der ersten, zweiten und dritten Blätter ausgezählt.

### **2.4 Mikroskopische Untersuchungen**

#### **2.4.1 Inokulation**

Für mikroskopische Untersuchungen wurden die adaxialen Seiten der Blätter mit einer Dichte von 5-20 Konidien pro mm<sup>2</sup> inokuliert. Eine horizontale Lage der Blätter während der Inokulation, welche durch vorsichtige Fixierung mit Klebestreifen auf der Unterlage erreicht wurde, sorgte für eine gleichmäßige Verteilung der Konidien.

Das Blattmaterial für *in situ* Hybridisierungen (siehe unten) wurde beidseitig durch einmaliges Wenden der Töpfe um 180° mit einer Dichte von 1-5 Konidien pro mm<sup>2</sup> inokuliert.

### 2.4.2 Entfärben und Fixieren von Ganzblattpräparaten

Durch Überführung von infiziertem Blattmaterial in Entfärbelösung wurde das Wachstum von Pilz und Pflanze abgestoppt sowie das Chlorophyll, welches eine mikroskopische Betrachtung des Pilzes stark beeinträchtigt, entfernt. Für den Entfärbvorgang wurden die Blätter 7 cm unterhalb der apikalen Spitze abgeschnitten und in Entfärbelösung überführt. Nach einem Tag wurde die Lösung erneuert und die Blattsegmente für mindestens einen weiteren Tag entfärbt. Eine Lagerung der Blätter in der Entfärbelösung ist in geschlossenen Gefäßen für mehrere Monate möglich. Durch den Entfärbvorgang wurden ungekeimte Konidien abgespült, so daß es in der späteren Auswertung nicht möglich war Aussagen über einen möglichen Einfluß von BTH auf die Keimrate zu treffen.

- Entfärbelösung: Trichloressigsäure 0,15 % (w/v)  
in Ethanol (96 %)/Chloroform 4 : 1 (v/v)

### 2.4.3 Färben des Pilzgewebes

Zur besseren Identifizierung der einzelnen Pilzstrukturen wurden diese mittels eines proteinspezifischen Farbstoffes angefärbt. Hierzu wurden die Blattsegmente für 15 s in frisch angesetzter Färbelösung inkubiert, mit A. dest. gewaschen und anschließend in die Mikroskopierlösung überführt.

- Färbelösung: Coomassie Brilliant Blau R-250 in 0,6 % (w/v)  
Methanol (vor Gebrauch 1x filtrieren)  
TCA in H<sub>2</sub>O 15 % (w/v)

Die Färbelösung wird aus beiden Komponenten im Verhältnis 1 : 1 frisch angesetzt

- Mikroskopierlösung: Glycerol / A. dest. 1 : 1 (v/v)

Eine weitere Methode, welche ähnlich gut im Färbeergebnis jedoch weniger beständig bei längerer Lagerung der Proben ist, war eine Färbung der Pilze mit essigsaurer Tinte. Hierbei wurden die Blattsegmente 1 min in essigsaurer Tinte inkubiert, mit A. dest. gewaschen und dann in Mikroskopierlösung überführt.

- Essigsaurer Tinte: 25 % Essigsäure : Tinte 9 : 1 (v/v)  
(Königsblau 4001, Pelikan, Hannover)

#### **2.4.4 Mikroskopie**

Die mikroskopischen Auswertungen der Blattpräparate wurden an einem Universalmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Göttingen) mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung durchgeführt. Die Fluoreszenzeinrichtung für die UV-Anregung war mit einer Quecksilberhochdrucklampe (HBO 50 W, Osram) bestückt. Für eine selektive Anregung im UV-Licht standen mehrere Filterkombinationen zur Verfügung. Für die Beobachtung von autofluoreszierenden pflanzlichen Strukturen wurde eine Filterkombination mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm (BP 485), einem Farbteiler bei 510 nm (LT 510) und einem Langpaßfilter bei 520 nm (LP 520) genutzt. Für eine bessere Auflösung von schwach kontrastierten Feinstrukturen beim Mikroskopieren mit Durchlicht wurde mit differenziellem Interferenz Kontrast (DIC) gearbeitet.

Die Auswertung der Mikroautoradiogramme der *in situ* Hybridisierungen wurde im Dunkelfeld mit einem hochauflösenden Ultrakondensator (1,2/1,4 Öl; Zeiss; Nr. 445323) durchgeführt. Eine zusätzliche Anregung mit UV-Licht sorgte, aufgrund unterschiedlicher Emissionsspektren einzelner Zellstrukturen, für eine detailliertere Darstellung der verschiedenen Blattgewebe.

#### **2.4.5 Fotografie**

Zum Fotografieren der Präparate wurde eine dem Mikroskop aufgesetzte Kamera mit separater Belichtungseinrichtung verwendet. Als Filmmaterial für Durchlichtaufnahmen wurden Ektachrom 64 T Kunstlichtdiafilme der Firma Kodak verwendet. Bilder bei UV-Anregung sowie den radioaktiven *in situ* Hybridisierungen wurden mit lichtempfindlicheren Elitechrome Diafilmen (400 ASA; Kodak) aufgenommen.

## 2.5 Grundlegende molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Plasmidvektoren

Die zu den mRNA der untersuchten Gene komplementären cDNA waren in verschiedene handelsübliche Plasmidvektoren inkloniert. Die cDNA von *WCI-1* und *pHvPR-1b* waren in pBlueskript SK(+/-) (Stratagene, Heidelberg), die von *WCI-3* in pCGN 1761 und die der *LOX2Hv1* in pBK CMV (Stratagene) integriert. Im Laufe der Versuche wurden zur späteren Herstellung von RNA-Sonden Teile der *LOX2Hv1* und *WCI-3* in pGem-T (Promega Corporation, Madison, WI USA) umklontiert. Die Plasmide mit *WCI-1* und *WCI-3* (GÖRLACH *et al.* 1996) wurden von JÖRN GÖRLACH (Triangle Research Park, NC USA), das Plasmid mit *pHvPR-1b* (BRYNGELSSON *et al.* 1994) von DAVID COLLINGE (Kopenhagen, Dänemark) und das Plasmid mit der *LOX2Hv1* (VÖRÖS *et al.* 1998) von CLAUD WASTERNAK (IPB, Halle a. d. Saale, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die Plasmide pBlueskript SK(+/-) und pBK CMV besitzen Promotoren für die T3- und die T7-RNA-Polymerase, pGem-T für die T7- und SP6-RNA-Polymerase. Das Plasmid pCGN 1761 besitzt keine Promotoren für RNA-Polymerasen, welche bei der Herstellung von RNA-Sonden genutzt werden konnten.

Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen sind die Plasmide pBlueskript SK(+/-) und pGem-T mit einer Ampicillin-Resistenz und pBK-CMV mit einer Neomycin- sowie einer Kanamycin-Resistenz ausgestattet. Die *multiple cloning site* (MCS) der Plasmide ist neben den Promotoren für die RNA-Polymerasen noch mit verschiedenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme ausgestattet und liegt innerhalb eines lacZ- $\alpha$ -Fragments der  $\beta$ -Galaktosidase.

### 2.5.2 Klonierung von cDNA-Fragmenten

Da das Plasmid pCGN 1761 keine Promotoren für RNA-Polymerasen besitzt, mußte für die Herstellung von RNA-Sonden zur Detektion von Transkripten im *Northernblot* sowie den radioaktiv durchgeführten *in situ* Hybridisierungen die cDNA von *WCI-3* in den Plasmidvektor pGem-T inkloniert werden. Bei den radioaktiven *in situ* Hybridisierungen wurden neben den *antisense* Sonden *sense* Transkripte als Kontrollen benötigt. Da die Herstellung von beiden umgekehrt orientierten Strängen über die gesamte Länge der

*LOX2Hv1* – cDNA (3054 bp) durch *in vitro* Transkription nicht möglich war, wurde ein 1004 bp (2051 – 3054) umfassendes Teilstück der *LOX2Hv1* ebenfalls in pGem-T einkloniert. Für die Klonierung der cDNA-Fragmente von *WCI-3* und der *LOX2Hv1* wurden PCR-Produkte verwendet. Für diese PCR wurde eine DNA-Polymerase ohne 3'→5'-Exonucleaseaktivität verwendet. Dies führt dazu, daß in den meisten Fällen ein Desoxyadenosin ans 3'-Ende des Amplifikats angehängt und nicht wieder entfernt wird. Dieser sogenannte "A-Überhang" wurde für die Methode des "*T-A-cloning*" benötigt.

Für die Klonierung wurde das pGEM<sup>®</sup>-T Vector System I (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Die Klonierungsreaktion und die damit verbundene Zyklisierung des linearisierten Plasmides durch eine T4-Ligase wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt.

### 2.5.3 Transformation

Für die Anreicherung der rekombinanten Plasmide wurden diese in chemisch kompetente Bakterienzellen transformiert. Die kompetenten *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 $\alpha$ , hergestellt nach einer Methode von SAMBROOK *et al.* (1989), wurden von BIRGIT JAROSCH zur Verfügung gestellt.

Für die Transformation wurden je 5  $\mu$ l des Ligationansatzes (vgl. Kap. 2.5.3) zu 70  $\mu$ l frisch aufgetauter kompetenter *E. coli*-Zellen gegeben, vorsichtig vermengt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen wurde anschließend durch einen 45 s dauernden Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad initiiert. Nach dem Abkühlen der Probe auf Eis wurden 250  $\mu$ l LB-Medium zugesetzt und 1h bei 37 °C geschüttelt. Aliquots des Ansatzes wurden dann auf antibiotikumhaltige LB-Platten ausplattiert und der Selektion auf erfolgreich transformierte Zellen unterzogen.

- LB-Medium:  
10 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; ad 1 l mit A. dest. aufgefüllt ; pH 7,0 mit NaOH eingestellt; autoklaviert

#### 2.5.4 Selektion

Die Selektion erfolgreich transformierter Zellen fand auf LB- Platten statt, welche mit dem Antibiotikum angereichert waren, für das die Plasmide die entsprechenden Resistenzgene tragen. pBlueskript SK(+/-) und pGem-T tragen eine Ampicillin-Resistenz, pBK-CMV eine Neomycin- sowie eine Kanamycin-Resistenz. Durch Aktivierung des ebenfalls auf den Plasmiden lokalisierten mit Isopropylthiogalaktosid (IPTG) und Zugabe von 5-Brom-4chlor-3indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (xGal) als Substrat für die Galaktosidase konnte gleichzeitig eine sogenannte Blau-Weiß-Selektion auf korrekt insertierte cDNA vorgenommen werden. Bei Insertion von cDNA in die MCS kann es nicht zur Bildung einer funktionsfähigen  $\beta$ -Galaktosidase kommen. In Anwesenheit einer intakten  $\beta$ -Galaktosidase wird xGal gespalten und ein blauer Farbstoff gebildet. Erfolgreich transformierte Zellen mit insertierter cDNA im Plasmid konnten dementsprechend als weiße Kolonien identifiziert werden.

Hierzu wurden antibiotikumhaltige LB-Agarplatten mit einer Mischung aus 4  $\mu$ l IPTG- und 40  $\mu$ l xGal-Stammlösung bestrichen und nach dem Trocknen Aliquots von 50 und 200  $\mu$ l des Transformationsansatzes ausplattiert. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C für 16 h inkubiert.

- LB<sup>Antibiotikum</sup>-Agarplatten:  
1,5 % Agar in LB-Medium; nach dem Autoklavieren Zugabe von 100  $\mu$ g/ml Ampicillin oder 50  $\mu$ g/ml Kanamycin
- Ampicilin-Stammlösung:  
50 mg/ml Ampicillin; unter Zugabe von 2 N NaOH in A. dest. gelöst und sterilfiltriert
- Kanamycin-Stammlösung:  
50 mg/ml Kanamycin; in A. dest. gelöst und sterilfiltriert
- xGal-Stammlösung:  
20 mg/ml xGal; in Dimethylformamid
- IPTG-Stammlösung:  
200 mg/ml IPTG; in A. dest. gelöst und sterilfiltriert

### 2.5.5 Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* Kulturen (Miniprep)

Zur Amplifikation und Isolierung der rekombinanten Plasmide wurden von als positiv identifizierten Kolonien eine Flüssigkultur angesetzt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden die einzelnen Kolonien in 4 ml LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikums enthielt, überführt und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. In zwei nacheinander folgenden Zentrifugationen in einem 2 ml Reaktionsgefäß bei 20.000 g für je 10 min wurden die Bakterienzellen pelletiert und die Überstände verworfen. Der Aufschluß der Zellen und die Isolation der Plasmide wurde nach dem standardisierten Protokoll für "*boiling miniprep with STET-solution*" (AUSUBEL *et al.*, 1999), oder mit dem QIAprep<sup>®</sup> Miniprepkit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.5.6 Restriktionsanalysen

Ein Verdau von DNA mit spezifisch schneidenden Restriktionsenzymen wurde in unterschiedlichen Versuchen angewendet. Einerseits dienten Restriktionsanalysen zur Kontrolle der isolierten rekombinanten Plasmide, andererseits wurden spezifisch geschnittene cDNA-Fragmente als Matrize bei der DNA-Sondenherstellung für die nicht radioaktiven *in situ* Hybridisierungen eingesetzt. Zur Kontrolle der rekombinanten Plasmide wurde ein Doppelverdau mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen durchgeführt. Die beiden Restriktionsenzyme wurden so gewählt, daß eines der Enzyme im Vektor und das andere innerhalb der cDNA schneidet. Im Idealfall sollten beide Enzyme jeweils nur einmal schneiden. Die Lage der Restriktionsstellen konnte anhand der Vektorkarten und der bekannten Sequenz der jeweiligen cDNA ermittelt werden und die Größe der erwarteten DNA-Fragmente abgeleitet werden. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung der geschnittenen DNA im Agarosegel konnte anhand der Größe der einzelnen Fragmente die Richtigkeit und die Orientierung der insertierten cDNA im Vektor ermittelt werden. Zur Bereitstellung des *templates* für die DNA-Sondenherstellung wurde die im rekombinanten Plasmid enthaltene cDNA heraus geschnitten. Dies geschah mit zwei Restriktionsenzymen, deren Schnittstellen in der MCS des Plasmides liegen und beidseitig das *insert* flankieren. Für einen Restriktionsansatz wurden je 2 µg der rekombinanten Plasmid-DNA, 1 µl des entsprechenden 10x Restriktionspuffers

(Boehringer Mannheim) und 1  $\mu$ l (10 u) des Restriktionsenzym (Boehringer Mannheim) mit A. dest. auf 10  $\mu$ l aufgefüllt und 2 h bei 37 °C inkubiert.

### **2.5.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) an einem UV-Spektrophotometer (DU 7400; Beckmann) bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Der OD-Quotient 260 / 280 nm gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Probe und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. Bei der Extinktionsmessung mit 260 nm entspricht eine OD von 1 einer RNA-Menge von 40  $\mu$ g/ml und einer DNA-Menge von 50  $\mu$ g/ml. Für die Messungen wurden die aufgereinigten Nukleinsäureextrakte 1 : 200 mit A. dest. verdünnt und mit reinem A. dest. als Referenzlösung verglichen.

### **2.5.8 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen durch nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophoresen wurden zur Kontrolle und Größenbestimmung der Nukleinsäuren durchgeführt. Die in den Versuchen verwendeten Agarosekonzentrationen von 1 – 1,5 % in TBE ermöglichten eine gute Auftrennung im Größenbereich von 0,1 – 3 kB. Durch eine Einlagerung von Ethidiumbromid [EtBr<sup>-</sup>; 0,025  $\mu$ g/ml (Stammlösung 1 mg/ml; dunkel gelagert)] in die Nukleinsäuren konnten diese im UV-Licht sichtbar gemacht werden und deren Größe anhand von definierten Größenstandards bestimmt werden.

Die Nukleinsäureproben wurden mit 0,1 Vol 10x TBE und 0,1 Vol 10x Farbmarker versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung bei 100 V dauerte je nach Größe des Gels zwischen 30 min und 2 h.

- 10x TBE:  
0,9 M Tris; 0,9 M Borsäure; 25 mM EDTA; in A. dest.; pH 8,3 mit HCl eingestellt
- 10x Farbmarker:  
30 % [v/v] Glycerin; 0,25 % [w/v] Bromphenolblau; 0,25 % [w/v] Xylencyanol; in A. dest.

## 2.6 Nicht-radioaktive *Northern*blot Analyse

*Northern* Analysen dienen dem Nachweis der mRNA exprimierter Gene nach einer Resistenzinduktion durch BTH. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung von extrahierter Gesamt-RNA in einem denaturierenden Agarosegel wurden die Transkripte durch einen Kapillartransfer auf eine immobilisierende Membran übertragen. Der Prozeß der Übertragung und die Immobilisierung der RNA wird als *Northernblotting* bezeichnet. Im Anschluß an eine Hybridisierung von genspezifischen, markierten *antisense* RNA-Sonden mit der komplementären einzelsträngigen mRNA auf der Membran, erfolgte der Nachweis der Hybride über ein Antikörper-Enzym-Konjugat.

### 2.6.1 Extraktion von RNA aus Weizenblättern

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Weizenblättern erfolgte weitgehend nach Herstellerangaben mit dem RNA-Clean-Puffer der Firma AGS.

Hierzu wurden 5 – 10 tiefgefrorene Weizenblätter in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen. Mit dem zerriebenen Blattmaterial wurde ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß zu etwa einem Drittel gefüllt und 1,7 ml RNA-Clean hinzugegeben. Die Proben mußten dann, ohne aufzutauen, zügig vermengt und anschließend auf Eis gestellt werden. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben kräftig durchmischt und für 30 min in waagerechter Position geschüttelt. Im Anschluß hieran wurden die Proben 15 min in einer Eppendorfzentrifuge (5417 R) bei 4 °C mit 20.000 g zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde abgenommen, in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl Chloroform gründlich vermischt. Nach einer weiteren 15 minütigen Zentrifugation bei 4 °C mit 20.000 g wurde die obere wäßrige Phase in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 850 µl Isopropanol für 30 min auf Eis gefällt. Durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 4 °C mit 20.000 g wurde die RNA pelletiert. Nach dem Abdekantieren des Überstands wurde das Pellet 2x mit 700 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50 µl DEPC-behandeltem A. bidest. aufgenommen. Um eventuell vorhandene Reste von Polysacchariden zu entfernen wurde erneut 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bevor die Proben bei –80 °C gelagert wurden, erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA. Wenn möglich, wurde eine Konzentration von 1 µg/µl mit DEPC-behandeltem A. bidest eingestellt.

### 2.6.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der RNA-Moleküle nach Größe erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem Gel aus 1,5 % Agarose [w/v] in 1x MOPS-Puffer mit 5 % [v/v] einer konzentrierten Formaldehydlösung (37 % [v/v]). Zu 2 – 10 µl RNA (1 µg/µl) wurden 15 µl RNA-Ladepuffer zugesetzt, die Gemische 5 min bei 95 °C denaturiert und nach dem Abkühlen auf Eis auf das Gel aufgetragen. Die Trennung der RNA-Moleküle erfolgte bei 100 V für 2 - 4 h in Elektrophoresekammern mit 1x MOPS. Im Anschluß hieran wurde die Qualität der RNA unter UV-Licht kontrolliert und fotografisch festgehalten.

- 10x MOPS:  
0,2 M Morpholin-3-propansulfonsäure; 0,05 M Natriumacetat; 0,01 M EDTA; in A. dest gelöst und pH 7,0 mit 10 M NaOH eingestellt
- RNA-Ladepuffer:

Formamid	720 µl
10x MOPS	160 µl
A. bidest. DEPC behandelt	100 µl
Formaldehyd	260 µl
Ethidiumbromid (EtBr <sup>-</sup> ; 10 mg/ml)	100 µl
Glycerol	80 µl
gesättigte Bromphenolblau-Lösung	80 µl

### 2.6.3 Immobilisierung der RNA mittels Kapillarblot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA im Agarosegel wurden die Transkripte durch einen Kapillartransfer auf eine immobilisierende Membran übertragen. Dabei wurde Blottingpuffer aufgrund von Kapillarkräften aus einer Schale über Filterpapier durch das Gel und die positiv geladene Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) in einen Stapel aus Papierhandtüchern gesogen. Um einen gleichmäßigen Flüssigkeitsstrom zu erreichen wurden die Papierhandtücher mit einer Glasplatte abgedeckt und mit etwa 300 g beschwert. Die Übertragung der RNA auf die Membran fand bei RT über Nacht statt. Eine dauerhafte Fixierung der Nukleinsäuren auf der Membran erfolgte anschließend mittels UV-*cross-linking* (GS Gene Linker, BioRad) bei 254 nm und 125 mJ.

- Blottingpuffer:

25 mM Natriumphosphatpuffer	pH 6,5
-----------------------------	--------

#### 2.6.4 Amplifikation von insertierter Plasmid-DNA zur Sondenherstellung

Zur Detektion einzelner Transkripte auf der Nylonmembran wurden mit Digoxigenin (DIG) oder Fluorescein-markierte *antisense* RNA-Sonden mittels *in vitro* Transkription hergestellt. Als Matrize für die Sondenherstellung diente jeweils eine cDNA, welche zuvor durch eine PCR (*polymerase chain reaction*) aus den entsprechenden Vektoren amplifiziert wurden. Bei der PCR wurden die MCS der Vektoren flankierende Primer eingesetzt, so daß die resultierenden Amplifikate sowohl den Promotor für die RNA-Polymerase als auch die insertierte cDNA enthielten. Für die Amplifikation der cDNA, welche in pGEM-T oder pBlueskript SK(+/-) einkloniert waren, wurden die Primern M13fw(-40) und M13rev verwendet. Aufgrund der Größe der *LOX2Hv1* cDNA (> 3 kb), welche in pBK CMV kloniert war, wurden die Primer (LOX2Hv13, T7/22) für die PCR so gewählt, daß ein 1,1 kb langes Teilstück der cDNA mit dem Promotor für die T7-Polymerase amplifiziert wurde.

Nach der PCR in einem "Gene Amp PCR-System 240" (Perkin Elmer) wurden die Produkte mit dem "High Pure PCR Product Purification Kit" (Boehringer Mannheim) nach Herstellerangaben aufgereinigt, anschließend im 1,5 %igen [w/v] Agarosegel überprüft und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

<u>Primer:</u>	M13fw(-40)	5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'
	M13rev	5' AAC AGC TAT GAC CAT GA 3'
	LOX2Hv13	5' AGT ACT CCT TGG AGC TCA GCT 3'
	T7/22	5' GTA ATA GGA CTC ACT ATA GGG C 3'
<u>PCR-Ansatz:</u>	0,1 Vol	10x PCR-Puffer (Eurogentec)
	0,2 mM	Desoxynukleotide (dNTPs)
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 µM	je Oligonukleotid (MWG Biotech GmbH)
	10 – 100 ng	rekombinantes Plasmid
	2 u	Taq-Polymerase (Silverstar, Eurogentec)
	ad 50 µl	mit A. bidest auffüllen

<u>PCR-Programm:</u>	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	3 min	94 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	↑
Primeranlagerung	30 s	58 °C	35x
DNA-Synthese	90 s	72 °C	↓
<i>fill-in</i>	5 min	72 °C	
	∞	4 °C	

### 2.6.5 Herstellung Digoxigenin- und Fluorescein-markierter RNA-Sonden

Die Markierung der *antisense* RNA-Sonden erfolgte durch eine *in vitro* Transkription, wobei die aufgereinigten PCR-Produkte den verschiedenen RNA-Polymerasen als Matrize dienten. Während der Polymerisation der RNA wurden DIG- oder Fluorescein-markierte UTPs in den Strang eingebaut. Die Wahl der Polymerase war hierbei abhängig vom verwendeten Plasmid und der Orientierung der cDNA innerhalb der MCS.

Die Markierungsreaktionen wurden mit dem "DIG RNA Labeling Mix, 10x conc." oder dem "Fluorescein RNA Labeling Mix, 10x conc." und den entsprechenden RNA-Polymerasen (T3, T7, SP6) der Firma Boehringer Mannheim nach Herstellerangaben durchgeführt.

Nach einer Überprüfung der Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese wurden zur Quantifizierung und Qualitätskontrolle verschiedene Verdünnungen der Sonden auf eine Nylonmembran aufgebracht und anschließend detektiert. Hierzu wurden Aliquots der Sonden mit RNA-Verdünnungspuffer (A. dest / 20x SSC / Formaldehyd, 5:3:2 [v/v/v]) von 1:1 bis 1:10000 jeweils um den Faktor 10 verdünnt, 1 µl jeder Verdünnung auf eine Nylonmembran aufgebracht (Dot-Blot) und im UV-cross-linker fixiert. Der Nachweis auf Röntgenfilmen erfolgte dann über Antikörperkonjugate mittels Chemilumineszenz, wie in Kapitel 2.6.7 beschrieben. Anhand der Signalstärke konnte dann die Verdünnungsstufe für den Einsatz in die Hybridisierungsreaktion abgeschätzt werden.

### 2.6.6 Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurden die Nylonmembranen 3x 20 min in 2x SSC mit 0,1 % SDS auf einem Schüttler gewaschen und eine Prähybridisierung durchgeführt. Hierzu wurden die Membranen mit der RNA-Seite nach innen eingerollt und in mit 10 ml *DIG-Easy*-Hybridisierungspuffer (Boehringer Mannheim) gefüllte Hybridisierungsröhren überführt. Während der 30 minütigen Inkubation bei 68 °C im Hybridisierungssofen wurden 10 µl der Sondenlösung in 80 µl Hybridisierungspuffer bei 95 °C für 5 min denaturiert, anschließend auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Die denaturierten Sonden wurden in 10 ml frischen, vorgewärmten Hybridisierungspuffer gegeben und die Lösung mit dem Prähybridisierungspuffer in den Röhren ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei 68 °C über Nacht. Im Falle der *LOX2Hv1*-Sonde wurde die Hybridisierung bei 64 °C durchgeführt.

### 2.6.7 Immunodetektion

Der Nachweis spezifisch an mRNA gebundener Sonden erfolgte nach mehreren stringenten Waschschritten durch Bindung eines Antikörper-Enzym-Konjugats, welches eine Substratumsetzung katalysiert bei der Chemilumineszenz entsteht, die auf Röntgenfilm dargestellt werden konnte.

Die Stringenz der Waschschrritte ist von der Temperatur und der Salzkonzentration des Puffers abhängig und kann je nach Signalstärke oder Hintergrundsignalen durch unspezifisch gebundene Sonden variiert werden. Bei Standardapplikationen wurden die Membranen erst 2x 5 min bei RT in 2x SSC mit 0,1 % SDS und anschließend in 0,2x SSC mit 0,1 % SDS 3x 20 min bei 68 °C im Schüttelwasserbad gewaschen. Die folgende Blockierung der Membran und die Detektion der RNA-Hybride erfolgten bei RT. Nachdem die Membranen 1 min mit Waschpuffer ohne Tween gewaschen worden waren, wurde die Lösung durch 1x Blockingreagenz ersetzt und für weitere 30 min geschwenkt. Anschließend wurden die entsprechenden mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper (anti-Fluorescein-AP, anti-DIG-AP, Fab fragments [Boehringer, Mannheim]) in einer Verdünnung von 1 : 10000 [v/v] hinzu gegeben und unter leichtem Schütteln für 1 h inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden dann durch 3 x 20 min Waschen in Waschpuffer mit 0,3 % Tween 20 [v/v] entfernt. Die Membranen wurden im Folgenden 2 min in Substratpuffer äquilibriert und danach zusammen mit 1,5 ml Detektionsreagenz in

Klarsichtfolie luftblasenfrei eingeschweißt. Die Lumineszenz, welche bei der Dephosphorilierung des Substrates freigesetzt wurde, konnte dann durch Auflegen eines Röntgenfilms (X-OMAT AR, Kodak) sichtbar gemacht werden. Die Expositionszeit des Films wurde je nach Signalstärke von 1 min bis 2 h variiert. Für die Entwicklung des Films wurde Agfa G 153 Entwickler und Fixierer verwendet.

Alle Lösungen wurden, falls nicht anders gekennzeichnet mit DEPC-behandeltem A. bidest aus folgenden ebenfalls DEPC-behandelten Stammlösungen angesetzt.

- DEPC-Wasser:

A. bidest. mit 0,1 % [v/v] Diethylpyrokarbonat versetzt, über Nacht bei 37 °C und inkubiert anschließend autoklaviert

- 20x SSC:

3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat (Dihydrat); pH mit 4 M NaOH eingestellt

- 1 % SDS:

1 % Natriumdodecylsulfat [w/v] in A. bidest. ohne DEPC

- 10x Waschpuffer:

1 M Maleinsäure; 1,5 M NaCl; pH 7,5 mit NaOH-Plättchen eingestellt

- 10x Blockingreagenz:

10 % [w/v] Blockingpulver (Boehringer Mannheim) in Waschpuffer

- 10x Substratpuffer:

1 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 9,5 mit 4 N HCl eingestellt

- Detektionsreagenz:

CDP-Star™ (Boehringer Mannheim) in Substratpuffer

1 : 100

## **2.7 *In situ* Hybridisierungen**

Die Technik der *in situ* Hybridisierung stellt einen eleganten Weg dar, die zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster bestimmter Gene zu dokumentieren. Das Prinzip dieser Methode ist die Anlagerung und die anschließende Detektion markierter Nukleinsäuresonden an die komplementäre mRNA innerhalb von fixierten Gewebeschnitten auf Objektträgern.

Die Verwendung von Gewebeschnitten fixierten Blattmaterials ermöglicht den Nukleinsäuresonden den freien Zugang zu der mRNA am Ort ihrer Bildung.

Für den Nachweis spezifischer mRNA kann sowohl DNA als auch RNA als Sondenmaterial verwendet werden. Die Markierung der Sonden, welche der eigentlichen Detektion der Nukleinsäurehybride dient, kann über den Einbau von Antigen tragenden Nukleotiden, oder auch den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide erfolgen. Im ersten Fall werden die Antigene durch Antikörper-Enzym-Konjugate, welche eine Farbreaktion katalysieren, nachgewiesen. Im zweiten Fall findet der Nachweis der Hybride über Mikroautoradiografie statt.

### **2.7.1 Vorbereitung der Blattproben**

#### **2.7.1.1 Fixierung des Blattmaterials**

Die Blätter wurden hierzu in einer mit Fixierlösung gefüllten Petrischale in ca. 2x 3 mm große Segmente geschnitten. Die Mittelrippen der Blätter wurden verworfen. Anschließend wurden die Blattsegmente durch vorsichtiges Entlüften im Vakuum mit der Fixierlösung infiltriert und 2x 1 h unter ständiger, mäßiger Bewegung in geschlossenen Gefäßen mit der Fixierlösung inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Fixierlösung wurden die Blattsegmente 2x 15 min mit PBS (bei Einbettung in Polyethylenglykol) oder Natriumphosphatpuffer (bei Einbettung in Paraffin) gewaschen.

Um eine weitere Stabilisierung des Gewebes bei der Anfertigung der Mikrotomschnitte zu erreichen wurde ein Teil der Proben, welche für eine Einbettung in Polyethylenglykol (PEG) bestimmt waren, vor den Waschschrinen in 1 % Agar mit 3 % Gelatine in PBS bei 50 °C in Petrischalen voreingebettet. Nach dem Erkalten des Agar/Gelatine Gemisches wurden die Blattsegmente mit einem dünnen verbleibenden Rand des Gemisches einzeln ausgeschnitten und für 30 min nachfixiert.

Für die verschiedenen Einbettungsmethoden in PEG mit und ohne Voreinbettung in Agar/Gelatine, beziehungsweise in Paraffin wurden unterschiedliche Fixierlösungen verwendet.

- Fixierlösungen:

- bei Einbettung in PEG:

- 3 % (w/v) Paraformaldehyd; 0,1 % (w/v) Triton X100; in PBS unter Erwärmen frisch angesetzt

- bei Voreinbettung in Agar – Gelatine:

- 4 % (w/v) Paraformaldehyd; 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd; 0,1 % (w/v) Triton X100; in PBS zuerst das Paraformaldehyd unter Erwärmen frisch angesetzt; nach dem Abkühlen das Glutaraldehyd zugegeben.

- bei Einbettung in Paraffin:

- 1 % (v/v) Glutaraldehyd in Natriumphosphatpuffer

- PBS (1x):

- 135 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; in A. dest. gelöst und autoklaviert; pH 7,0 - 7,2

- Natriumphosphatpuffer:

- 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; in A. dest.; pH 7,0

### **2.7.1.2 Dehydratisierung des fixierten Pflanzenmaterials**

Bei der Dehydratisierung wurde das im Gewebe enthaltene Wasser schrittweise gegen Ethanol ausgetauscht. Dies geschah als Vorbereitung der Proben für die Infiltration mit den verschiedenen Einbettungsmedien. Bei einer Einbettung mit dem stark hydrophilen PEG würde Wasser das vollständige Aushärten des Einbettungsmittels verhindern. Eine Infiltration mit Paraffin wäre aufgrund seiner Wasserunlöslichkeit nicht möglich.

Die Entwässerung der Proben fand je nach Einbettungsmethode in verschiedenen aufsteigenden ethanolischen Reihen statt. Die Dehydratationen erfolgten in verschlossenen Gefäßen nach folgenden Schemata:

Dehydrationsreihe bei Einbettungen in PEG:

Ethanol in % (v/v)	Zeitdauer der Behandlung	Temperatur
10	30 min	RT
30	1 h	RT
50	1 h	RT
70	über Nacht	4 °C
70	10 min	RT
90	30 min	RT
100 (abs)	1 h	RT
100 (abs)	30 min	55 °C

Dehydrationsreihe bei Einbettungen in Paraffin:

Ethanol in % (v/v)	Zeitdauer der Behandlung	Temperatur
30	20 min	0 °C
50	20 min	0 °C
70	über Nacht	4 °C
85	20 min	RT
90	30 min	RT
100 (abs)	20 min	RT
100 (abs)	20 min	RT

## 2.7.2 Infiltrations- und Einbettungsmethoden

Eine Infiltration und das Einbetten der Blattproben in eine Matrix wird für die Stabilisierung des Gewebes bei der Herstellung von Semidünnschnitten am Mikrotom benötigt. Das in die Blattsegmente eindringende und aushärtende Einbettungsmedium verhindert ein Kollabieren des Gewebes beim Schneiden, so daß seine Struktur erhalten bleibt.

### 2.7.2.1 Infiltration und Einbettung in PEG

Die Verwendung von PEG als Einbettungsmedium hat aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit den Vorteil, daß es, nachdem die Schnitte auf Objektträger übertragen wurden, durch Waschen mit wäßrigen Puffern schnell und schonend entfernt werden kann.

Um ein gleichmäßiges Eindringen von PEG in die Blattsegmente zu erreichen, wurde mit ethanolischen Lösungen mit steigender PEG-Konzentration gearbeitet. Die Infiltration mit PEG wurde bei 55 °C im Thermoschrank durchgeführt. Die Arbeitsgeräte und Lösungen wurden vorgewärmt, um ein frühzeitiges Erstarren des PEG zu vermeiden. Mit PEG wird im Folgenden stets ein Gemisch aus PEG 1500 und PEG 4000 im Verhältnis 2 : 1 bezeichnet, welches vor dem Gebrauch intensiv gemischt werden mußte, um eine Phasentrennung zu verhindern. Aus diesem Grund mußten auch die Versuchsgefäße während des Infiltrationsvorganges in geschlossenen Gefäßen alle 15 min behutsam geschüttelt werden. Im Folgenden ist eine Übersicht über die Zusammensetzung der Infiltrationslösungen, die Mischungsverhältnisse und die Dauer der Behandlungen angegeben.

Zusammensetzung der Infiltrationslösung	Mischungsverhältnis	Zeitdauer der Behandlung
PEG : Ethanol	1 : 3	1 h
PEG : Ethanol	1 : 1	1,5 h
PEG : Ethanol	3 : 1	1,5 h
PEG 100 %		1 h
PEG 100 %		1 h

Vor dem Einbetten der Proben wurde das PEG unter ständigem Rühren langsam abgekühlt. Der Zeitpunkt für die Einbettung lag erst kurz vor dem Erstarren des PEGs.

Das PEG wurde dann mit einer temperierten Pipette in eine Einbettungsform gefüllt, einzelne Blattsegmente mit einer Pinzette in das PEG übertragen und ausgerichtet. Bei Raumtemperatur härteten die Proben über Nacht vollständig aus und konnten dann geschnitten, oder bei 4 °C mehrere Wochen gelagert werden.

#### 2.7.2.2 Infiltration und Einbettung in Paraffin

Die Vorteile einer Einbettung in Paraffin liegen darin, daß sich sehr einfach Semidünnschnitte aus dem Material fertigen lassen und Einbettungen in ein homogenes Medium leichter zu handhaben sind als bei der Einbettung in PEG. Die aufwendige Deparaffinisierung mit Xylol und die Wiederbewässerung stellen später allerdings

zusätzliche Belastungen für die Schnitte auf den Objektträgern dar. Die Einbettung in Paraffin erforderte, im Anschluß an die Dehydratisierung, den Austausch des Ethanols in den Blattsegmenten durch tertiäres Butanol, welches im Gegensatz zu Ethanol die Eigenschaft hat Paraffin zu lösen. Im Folgenden ist eine Übersicht über die Zusammensetzung der Lösungen, die Mischungsverhältnisse, die Dauer der Behandlungen sowie die Temperaturen in den einzelnen Schritten dieses Austausches dargestellt.

Zusammensetzung der Austauschlösung	Mischungsverhältnis	Zeitdauer der Behandlung	Temperatur
<i>t</i> -BuOH : EtOH	1 : 3	30 min	RT
<i>t</i> -BuOH : EtOH	1 : 1	30 min	RT
<i>t</i> -BuOH : EtOH	3 : 1	30 min	RT
<i>t</i> -BuOH	100 %	30 min	30 °C

Die Infiltration des Gewebes mit Paraffin erfolgte über bei unterschiedlichen Temperaturen gesättigte Lösungen von Paraffin in tertiärem Butanol. Mit einer Zunahme der Temperatur steigt die Löslichkeit des Paraffin in tertiärem Butanol an und somit auch die Konzentration.

Das Paraffin, welches in den Versuchen verwendet wurde war Paraplast Plus (Sherwood Medical Co., St. Louis, USA). Die Infiltration erfolgte in geschlossenen Gefäßen nach folgendem Schema:

Infiltrationslösung	Zeitdauer der Behandlung	Temperatur
<i>t</i> -BuOH gesättigt mit Paraffin bei 30 °C	4 – 6 h	30 °C
<i>t</i> -BuOH gesättigt mit Paraffin bei 30 °C	30 min	42 °C
<i>t</i> -BuOH gesättigt mit Paraffin bei 42 °C	über Nacht	42 °C
<i>t</i> -BuOH gesättigt mit Paraffin bei 42 °C	30 min	60 °C
Paraffin 100 %	über Nacht	60 °C

Für den letzten Schritt der Infiltration wurden die Blattsegmente in Petrischalen überführt, welche mit 60 °C warmen Paraffin gefüllt waren. Das Paraffin wurde dann noch zweimal gewechselt und die Petrischalen offen im Thermoschrank stehen gelassen, damit das restliche tertiäre Butanol abdampfen konnte. Zuletzt wurden die Blattsegmente einzeln ausgerichtet und das Paraffin für mehrere Stunden bei Raumtemperatur erkalten gelassen. Die so vorbereiteten Proben sind bei 4 °C für mehrere Jahre haltbar.

### **2.7.3 Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin**

Polylysin dient der besseren Haftung der Dünnschnitte auf den Objektträgern. Obwohl neue Objektträger benutzt wurden, mußten diese vor der Behandlung mit Poly-L-Lysin gründlich gesäubert werden. Hierzu kamen die Objektträger zuerst für 10 min in 0,2 M Salzsäure in Färbetrögen, wurden dann kurz mit A. dest. gespült und anschließend wurden sie für jeweils weitere 10 min erst mit Ethanol und dann in A. dest. gereinigt.

Nach der Reinigung kamen die Objektträger für 10 min in eine wässrige Lösung aus 0,1 % Poly-L-Lysin (MW: 70000 – 150000, Sigma, Taufkirchen) in Färbeküvetten. In Reagenzglasständern stehend war eine Lufttrocknung von mindestens 2 h nötig, bevor die Objektträger zum Aufbringen der Dünnschnitte verwendet, oder staubfrei gelagert werden konnten. Bei –20 °C waren sie mehrere Monate haltbar, sollten jedoch vor der Verwendung 30 min bei 40 °C in einem Wärmeschrank getrocknet werden.

## **2.8 *In situ* DNA-RNA-Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden**

### **2.8.1 Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden**

Die Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden für die nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierungen erfolgte über den Einbau von DIG-dUTPs während einer PCR. Hierzu wurde das "PCR DIG Labeling Kit" der Firma Boehringer Mannheim nach Anleitung verwendet. Als Matrize für die PCR wurden aufgereinigte genspezifische cDNA-Fragmente benutzt, die zuvor aus den entsprechenden rekombinanten Plasmiden mittels eines Restriktionsverdau (Eco R I; Xho I; vgl. Kap. 2.5.6) ausgeschnitten worden waren. Bei der Amplifikation der Sonden wurden genspezifische Primer eingesetzt, welche direkt am 5'- und 3'-Ende des *inserts* lagen. Die PCR wurde unter den Standardbedingungen einer U/R-PCR (vgl. Kap. 2.6.4) durchgeführt.

Nach der Markierungsreaktion wurden die PCR-Produkte aufgereinigt (High Pure PCR Product Purification Kit; Boehringer Mannheim) und die Sondenmenge mittels Dot-Blot (vgl. Kap. 2.6.5) quantifiziert.

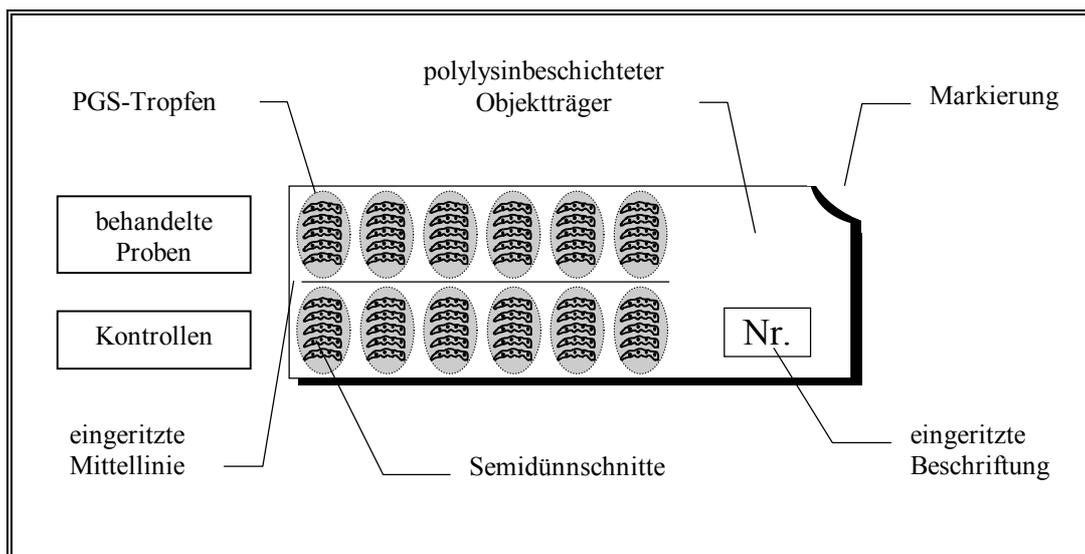
### 2.8.2 Herstellung kurzer Sonden

Um den Zugang der Sonden zu der komplementären mRNA während der Hybridisierung zu erleichtern wurden neben der Herstellung von Sonden über die gesamte Länge des *inserts* von *WCI-3* und *HvPR-1b* auch kurze Sonden mit einer Länge von 120 - 180 bp mittels PCR hergestellt. Durch eine geeignete Auswahl mehrerer genspezifischer Primer, welche in einer Serie immer den nächst folgenden Abschnitt des *templates* flankierten, konnten die cDNAs über einen großen Bereich in mehrere Teilstücke aufgeteilt werden. Die Markierungsreaktion mit dem "PCR DIG Labeling Kit" (Boehringer Mannheim) fand jeweils einzeln mit einem zusammengehörigen Primerpaar statt. Nach der Aufreinigung wurden die verschiedenen Sondenteilstücke in einem Ansatz vereinigt und so für die Hybridisierung eingesetzt.

Primer	Sequenz	Länge des Amplifikats
T-WCI-3/5'-1	5'-CTCCTTTCCAGAGCTAGCC-3'	175 bp
T-WCI-3/3'-1	5'-GGAGCAGATGCAGTCAGTG-3'	
T-WCI-3/5'-2	5'-CTGTGCTTGTGCAGGAAAGT-3'	165 bp
T-WCI-3/3'-2	5'-GCATGGCTGAAGAAGCTCC-3'	
T-WCI-3/5'-3	5'-TGAGGTCTGCGTCCACAAG-3'	128 bp
T-WCI-3/3'-3	5'-AGCTGTGACCGGGAAACCA-3'	
T-WCI-3/5'-4	5'-CTGCCAGTCACGTGTACGA-3'	124 bp
T-WCI-3/3'-4	5'-CACTTGTTGTCATGCTCCAG-3'	
T-PR1b/5'-1	5'-GAATCCGTTGCTGTCGAGC-3'	164 bp
T-PR1b/3'-1	5'-GTGATACGTAGTCCTGCGG-3'	
T-PR1b/5'-2	5'-AAGCTGCAAGCGTTCGCC-3'	184 bp
T-PR1b/3'-2	5'-AGGTGTTGGAGCCGTAGTC-3'	
T-PR1b/5'-3	5'-AACAACAACCGCGGCGTCT-3'	183 bp
T-PR1b/3'-3	5'-TTACTCGCTCGGTCCCTCT-3'	

### 2.8.3 Die Herstellung von Semidünnschnitten in PEG eingebetteter Proben

Das Schneiden der Proben erfolgte an einem Rotationsmikrotom (HM 335 E; Microm; Walldorf) mit Metallklingen (N 35; Feather; Osaka; Japan). Nach dem Trimmen der Probenblöcke in Trapezform wurden 5 µm dicke Querschnitte der Blattsegmente angefertigt. Die Schnittbänder wurden in einer Pappschachtel gesammelt und mit einem Skalpell in 6 - 8 Schnitte umfassende Teilstücke zerteilt. Anschließend werden die Schnittbänder mit einem Tropfen aus 40 % (v/v) PEG 6000 in PBS (vgl. Kap. 2.7.1.1) einer Öse aufgenommen und auf polylysinbeschichteten Objektträger übertragen. Die Schnitte befanden sich auf der Unterseite des Tropfens und wurden dort, während sich das feste PEG innerhalb des Gewebes auflöst, durch die Oberflächenspannung gestreckt. Pro Objektträger wurden zwei Reihen mit jeweils sechs Tropfen aufgetragen (s. Abb. 2). Eine Reihe wurde dabei von Schnitten aus den Kontrollansätzen gebildet.



**Abb. 2:** Anordnung der Semidünnschnitte nach dem Auftragen mit PBS-Tropfen auf markierte, polylysinbeschichtete Objektträger. Eine der beiden Reihen wird aus Schnitten der Kontrollpflanzen gebildet. Eine eingeritzte Mittellinie befindet sich auf der Rückseite des Objektträgers.

### 2.8.4 Blockierung freier Aldehyde und unspezifischer Bindungsstellen

Direkt nach dem Auftragen der Schnitte wurden die Objektträger (OT) in sterile Färbeküvetten überführt und das restliche PEG durch 2x 5 minütiges Waschen in Tris / HCl aus dem Gewebe entfernt. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde durch acetyliertes BSA (Aurion) erreicht. Hierzu wurden die Objektträger 10 min in

Blockierungslösung inkubiert und nachfolgend zur Entfernung überschüssiger Lösung 2x 5 min mit A. dest. gewaschen.

Für die Blockierung freier Aldehyde durch Acetanhydrid wurden die Gewebeschnitte zunächst für 3 min mit frisch angesetztem Acetylierungspuffer äquilibriert und anschließend für 10 min mit einer ebenfalls frisch angesetzten Acetylierungslösung unter Rühren behandelt. Zur Vorbereitung für die *in situ* Hybridisierung wurden die Objektträger noch 2x 5 min mit 2x SSC gewaschen.

- 10x Tris / HCl:  
0,1 M Tris; pH 8,0 mit HCl eingestellt
- 20x SSC:  
3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat (Dihydrat); pH 7.0 mit 4 M HCl eingestellt
- Blockierungslösung:  
0,1 % (w/v) acetyliertes BSA in PBS; mehrfach verwendbar; bei – 20 °C lagern
- Acetylierungspuffer:  
100 mM Triethanolamin in A. dest.; pH 8,0 mit HCl eingestellt
- Acetylierungslösung:           Acetanhydrid in Acetylierungspuffer           0.25 % (v/v)

### **2.8.5 Hybridisierung**

Die spezifische Anlagerung der markierten DNA-Sonden an die komplementäre mRNA ist ein temperaturabhängiger Vorgang. Die Zugabe von Formamid zu den Hybridisierungslösungen ermöglicht eine Herabsetzung der Hybridisierungstemperatur und führt somit zu einer schonenden Behandlung der Gewebeschnitte.

Die im Folgenden beschriebenen Schritte der Hybridisierung wurden in einer feuchten Kammer bei 45 °C durchgeführt. Als feuchte Kammer diente hierbei eine Objektträgeraufbewahrungsdose, welche im Boden und im Deckel mit in 50 %igem Formamid getränkten Zellstofftüchern ausgelegt war.

Für die Prähybridisierung wurden die Objektträger auf der Rückseite abgetrocknet, auf einer 45 °C warmen Streckplatte verteilt, mit je 1 ml Prähybridisierungslösung überschichtet und mit dem Deckel einer feuchten Kammer zugedeckt.

Während der Prähybridisierungsdauer von 1 h wurde die Hybridisierungslösung vorbereitet. Pro Objektträger wurden 100 µl Hybridisierungslösung, mit einer Sondenkonzentration von 100 ng/ml benötigt. Hierzu wurde die entsprechende Menge DIG-markierter DNA-Sonde in Prähybridisierungslösung pipettiert, 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde RNase-Inhibitor (Boehringer) für eine Endkonzentration von 40 u/ml hinzugegeben.

Für die Hybridisierung wurden, nach dem Entfernen der Prähybridisierungslösung und dem Abtrocknen der Objektträgerrückseiten, je 100 µl Hybridisierungslösung über den Schnitten verteilt und mit einem Deckglas (24 x 60 mm) luftblasenfrei abgedeckt. Um einen direkten Kontakt der Schnitte mit dem Deckglas zu vermeiden, wurde einseitig ein schmaler Deckglasstreifen als Abstandhalter (*spacer*) untergelegt und zusätzlich die Objektträger umgedreht ("hängender Tropfen"). Die Hybridisierung in einer feuchten Kammer erfolgte über Nacht bei 45 °C im Thermoschrank.

- Prähybridisierungslösung:

50 % [v/v] Formamid; 50 % [v/v] 4x SSC; 150 µg/ml t-RNA (Boehringer Mannheim); 0,5 % Blockingreagenz (Boehringer Mannheim); (bei – 20 °C lagern)

- Hybridisierungslösung:

100 ng/ml DIG-markierter DNA-Sonde; 40 u/ml RNase-Inhibitor (Boehringer Mannheim); in Prähybridisierungslösung

### **2.8.6 Immunodetektion**

Voraussetzung für den spezifischen Nachweis der DNA-RNA-Hybride war, daß überschüssige, oder unspezifisch gebundene Sonde vollständig von den Gewebeschnitten und den Objektträgern entfernt wurde. Wie auch bei *Northernblot* Analysen bestimmte die Stringenz der einzelnen Waschschrte wieviel der überschüssigen Sonden entfernt werden konnte. Nach den Waschschrten erfolgte der Nachweis spezifisch an mRNA gebundener Sonde über Antikörper-Enzym-Konjugate, welche nach Zugabe eines Substrates eine

Farbreaktion katalysierten. Zur Verstärkung der Signale wurde teilweise mit zwei Antikörpern gearbeitet. Der erste Antikörper (anti-DIG-FITC) detektierte hierbei die DIG-Markierung der Hybride und war mit mehreren FITC-Molekülen (Fluoresceinisothiocyanat) konjugiert. Der zweite Antikörper (anti-FITC-AP) war gegen FITC gerichtet und mit dem Enzym (alkalische Phosphatase; AP) für die Farbreaktion konjugiert.

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläser bei 45 °C auf 50 % Formamid in 2x SSC abfloatiert und die Objektträger auf einer Streckplatte 2x 10 min bei mit je 1 ml 50 % Formamid in 2x SSC überschichtet. Die Objektträger wurden hierbei mit dem Deckel einer feuchten Kammer abgedeckt. Anschließend kamen die Objektträger in einer Färbeküvette in ein Wasserbad (45 °C) und wurden unter leichter Bewegung 2x 10 min mit 2x SSC und 5 min mit A. dest. gespült.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper bei der Immunodetektion zu vermeiden wurden die Objektträger bei Raumtemperatur 5 min mit TBS äquilibriert und 30 min mit 1 % Blockingreagenz (Boehringer Mannheim) in TBS behandelt. Die jeweils einstündige Inkubation mit den Antikörpern erfolgte bei Raumtemperatur mit je 100 µl Lösung pro Objektträger mit Deckglas und *spacer* in oben beschriebener Weise. Die feuchte Kammer war hierbei mit Zellstofftüchern ausgelegt die nur mit Wasser befeuchtet waren. Der 1. Antikörper (anti-DIG-FITC) wurde in einer Endkonzentration von 25 µg/ml Blockinglösung eingesetzt, wobei aufgrund der Lichtempfindlichkeit von FITC das Labor abgedunkelt wurde. Nachdem Abfloatieren der Deckgläser auf TBS, wurde 3x 10 min mit 0,1 % BSA in TBS in einer dunklen Küvette (Alufolie) gewaschen. Anschließend wurde der 2. Antikörper (anti-FITC-AP) in einer Endkonzentration von 5 u/ml Blockinglösung aufgetragen.

Bei guten Sonden und starken Signalen konnte direkt mit einem anti-DIG-AP-Konjugat gearbeitet werden. Hierzu wurde, nach den Waschsritten und dem Blockieren, der Antikörper 1:3000 verdünnt in Blockinglösung (ohne acetyliertes BSA) verwendet. Die restlichen Schritte blieben gleich.

Überschüssige Antikörper wurden nach dem Entfernen der Deckgläser 2x 15 min mit TBS abgewaschen. Nach 5 minütiger Äquilibrierung in Substratpuffer wurden je 100 µl NBT-Substratlösung auf den Objektträgern verteilt und ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt. Die Objektträger wurden umgedreht und in einer feuchten Kammer (H<sub>2</sub>O) bei

37 °C für 24 - 72 h inkubiert. Die Entwicklung des lilabraunen Farbniederschlages (Formazanfärbung) konnte während dieser Zeit durch kurze Betrachtungen unter dem Mikroskop überprüft werden und so der Zeitpunkt für das Abstoppen der Reaktion bestimmt werden.

Hierzu wurden die Deckgläser in TBE abfloatiert und 5 min in TBE gewaschen. Zur Herstellung von Dauerpräparaten wurden 50 µl TBE über den Schnitten verteilt, ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und mit Nagellack versiegelt.

- 10x TBS:  
1 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,5 mit HCl eingestellt
- TBE:  
10 mM TRIS; 1 mM EDTA; pH 8,0
- Substratpuffer:  
0,1 M Tris; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl<sub>2</sub> (Hexahydrat); pH 9,5 mit HCl eingestellt
- Blockinglösung:  
1 % Blockingreagenz (Boehringer); 0,1 % acetyliertes BSA; in TBS; die Lösung ist mehrfach verwendbar; bei – 20 °C lagern
- Substratlösung:  
3,5 µl/ml BCIP Stammlösung; 4,5 µl/ml NBT Stammlösung; in Substratpuffer
- BCIP-Stammlösung:  
50 mg/ml BCIP; in 100 % Dimethylformamid
- NBT-Stammlösung:  
75 mg/ml NBT; in 70 % (v/v) Dimethylformamid
- 1. Antikörper:  
anti-DIG-FITC (Boehringer Mannheim); Lyophilisat in 1 ml A. dest. lösen (200 µg/ml); in Aliquots a' 50 µl, bei -20 °C einfrieren

- 2. Antikörper:  
anti-FITC-AP (Boehringer Mannheim); fertige Lösung 1:150 verdünnen;  
Endkonzentration 5 u/ml
- wenn nur ein Antikörper verwendet wurde:  
anti-DIG-AP (Boehringer Mannheim); fertige Lösung 1:3000 verdünnen

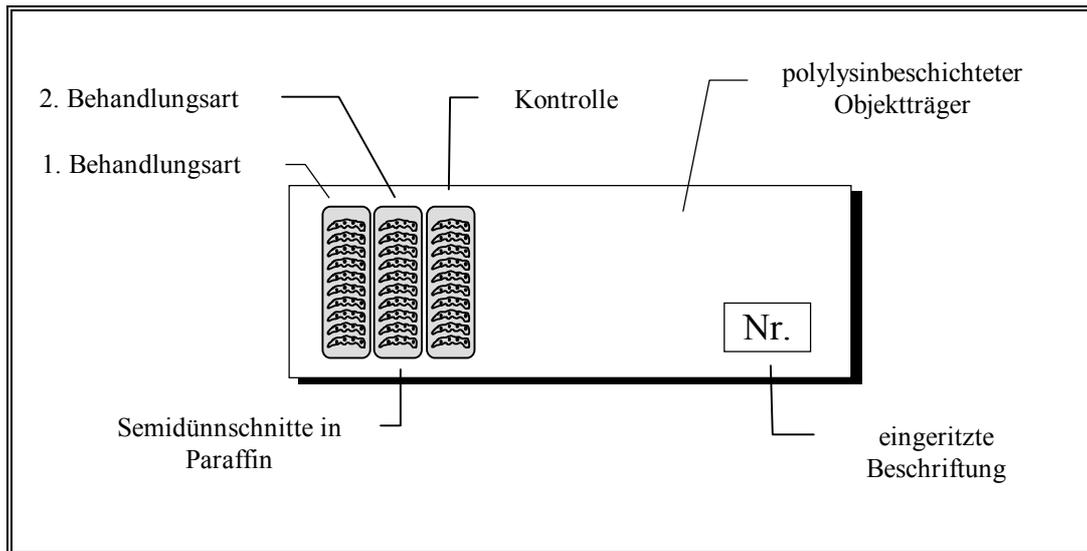
## **2.9 Radioaktive *in situ* RNA-RNA-Hybridisierung**

### **2.9.1 Vorbereitung der eingebetteten Blattsegmente**

#### **2.9.1.1 Anfertigung von Semidünnschnitten in Paraffin eingebetteter Proben**

Das Schneiden der Proben erfolgte teilweise an einem gekühlten Rotationsmikrotom (Reichert Jung; Cryostat 2800 Frigocut E) bei 5 - 10 °C oder an einem ungekühlten Rotationsmikrotom (Microm, HM 335 E). Im letztern Fall wurde zur Erhöhung der Schnittqualität der Messerhalter des Mikrotoms im Gefrierschrank auf ca. 4 °C gekühlt und die Proben bis kurz vor der Verwendung auf Eis gestellt.

Zum Schneiden der Proben wurden einzelne Blöcke mit Blattsegmenten aus den Paraffinplatten ausgeschnitten, auf Probenhalter aufgebracht und trapezförmig getrimmt. Danach wurden 12 – 16 µm dicke Blattquerschnitte angefertigt. Die Schnittbänder wurden in 10 – 20 Schnitte umfassende Teilstücke zerteilt und direkt auf polylysinbeschichtete Objektträger übertragen. Hierzu wurde ein Tropfen A. dest. auf den Objektträger gegeben und das Schnittband obenauf gelegt. Auf einer Streckplatte wurden die Schnitte bei 37 - 40 °C über Nacht gestreckt. Die geringe Menge an radioaktiv markierter Sonde, welche bei den Hybridisierungen eingesetzt werden konnte, erlaubte nur das Auftragen von drei Schnittbandreihen pro Objektträger. Die ersten beiden Reihen wurden jeweils aus Blattsegmenten unterschiedlich behandelte Pflanzen gebildet. Die letzte Reihe bestand aus Blattsegmenten von Kontrollpflanzen (s. Abb. 3). Die einzelnen Objektträger wurden so mit Schnitten bestückt und sortiert, daß direkt aufeinander folgende Schnittserien mit unterschiedlichen Sonden untersucht werden konnten. Dies geschah einerseits zum direkten Vergleich mehrerer exprimierter Gene in benachbarten Blattabschnitten, andererseits wurden hier auch *sense* Sonden als Kontrollen eingesetzt.



**Abb. 3:** Anordnung der Semidünnschnitte nach dem Austragen auf polylysinbeschichtete Objektträger. Die ersten beiden Reihen wurden aus Schnitten unterschiedlich behandelter Pflanzen gebildet die letzte von denen der Kontrollpflanzen.

### 2.9.1.2 Deparaffinisieren der Semidünnschnitte

Aufgrund der Wasserunlöslichkeit des Paraffins mußten die Gewebeschnitte nach dem Strecken deparaffiniert und für den anschließenden enzymatischen Abbau der Proteine wieder bewässert werden. Dies geschah mittels Xylol und einer absteigenden ethanolischen Reihe nach folgendem Behandlungsschema.

Lösungsmittel	Konzentration [Mischungsverhältnis]	Zeitdauer der Behandlung
Xylol	100 %	10 min
Xylol : Ethanol	[1 : 1]	5 min
Ethanol	100 %	5 min
Ethanol	95 %	5 min
Ethanol	80 %	5 min
Ethanol	60 %	5 min
Ethanol	30 %	5 min

Hiernach wurden die Objektträger luftgetrocknet und konnten bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung mehrere Tage gelagert werden.

### 2.9.1.3 Pronase-Verdau und Nachfixierung des Gewebes

Der *in situ* Nachweis spezifischer mRNA stellte bestimmte Anforderungen an das zu untersuchende Blattmaterial. Einerseits mußte die freie Zugänglichkeit der Sonden in einer vernetzten und eingebetteten Matrix zu der Ziel mRNA gewährleistet werden. Andererseits mußte ebenfalls der Verbleib der mRNA am Ort der Bildung im Gewebe gesichert bleiben. Eine teilweise Proteolyse erleichterte den Zugang der markierten Sonden zu den zellulären mRNA's und bewirkte zusätzlich einen Schutz vor Degradation durch Nukleasen. Die Nachfixierung des Gewebes sicherte den Erhalt der mRNA und festigte die Haftung der Schnitte auf den Objektträgern.

Für die Proteolyse wurden die Objektträger zuerst für 5 min mit 0,2 molarem Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) äquilibriert und anschließend 10 min bei Raumtemperatur mit Pronaselösung behandelt. Die Endkonzentration der Pronase (nucleasefrei; Boehringer Mannheim) betrug hierbei 250 µg/ml und wurde aus einer Stammlösung und Pronasepuffer frisch hergestellt.

Im Anschluß hieran wurden die Blattsegmente für 20 min im gleichen Fixativ wie bei der Einbettung (1 % Glutaraldehyd in Natriumphosphatpuffer) nachfixiert und in einer aufsteigenden ethanolischen Reihe nach folgendem Schema dehydratisiert.

Ethanol in % (v/v)	Zeitdauer der Behandlung
30	2 min
60	2 min
80	5 min
95	2 min
100 (abs)	2 min

Nach dem Lufttrocknen der Objektträger war eine Lagerung bei 4 °C für mehrere Tage möglich.

- Pronasepuffer  
50 mM Tris; 5 mM EDTA; pH 7,5 mit HCl eingestellt
- Pronasestammlösung:  
40 mg/ml Pronase (Boehringer Mannheim); in Pronasepuffer; 4 h bei 37 °C inkubiert und in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.
- Pronaselösung:  
Endkonzentration 250 µg/ml; 1 ml Stammlösung in 160 ml Pronasepuffer; ausreichend für 4 Färbeküvetten

## 2.9.2 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Als Sonden bei den radioaktiv durchgeführten *in situ* Hybridisierungen wurden einzelsträngige *antisense* RNAs verwendet. Diese wurden durch eine *in vitro* Transkription hergestellt, bei der der Einbau von radioaktivem [<sup>35</sup>S]-UTP in das Sondenmaterial erfolgte. Über die radioaktiv markierten Nukleotide in den Transkripten erfolgt letztlich nicht nur die Detektion der spezifischen mRNA sondern auch die Bestimmung der Sondenkonzentration durch Messung des radioaktiven Zerfalls. Bei der *in vitro* Transkription können neben den zur mRNA komplementären Sonden, *sense* Transkripte in umgekehrter Orientierung hergestellt werden, welche als Kontrollen für unspezifische Hybridisierungen dienen. Für große Sonden ist es schwierig über Diffusionsprozesse in die fixierten und vernetzten Blattproben einzudringen. Eine teilweise Hydrolyse der Transkripte in kleinere Fragmente erleichtert später bei der Hybridisierung den Zugang der Sonden zur komplementären mRNA in den Gewebeschnitten.

### 2.9.2.1 *In vitro* Transkription

Für die Herstellung der RNA-Sonden wurden je 200 ng aufgereinigte PCR-Produkte (vgl. Kap. 2.6.4) als *template* eingesetzt. Die radioaktive Markierung der Sonden geschah während der *in vitro* Transkription über den Einbau von  $\alpha$ [<sup>35</sup>S]-Uridin 5'-Thiotriphosphat-Triethylammoniumsalz ( $\alpha$ [<sup>35</sup>S]-UTP; Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH; 400 Ci/mmol). Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemixt, zentrifugiert und anschließend für 35 min bei 37 °C inkubiert.

- Reaktionsansatz der radioaktiven Markierung:

x $\mu\text{l}$	A. bidest. (DEPC behandelt)
2,5 $\mu\text{l}$	10 x Transkriptionspuffer (Boehringer Mannheim)
3,5 $\mu\text{l}$	rNTP-Mix (G, C, A, je 10 mM)
y $\mu\text{l}$	<i>template</i> (= 200 ng aufgereinigtem PCR-Produkt)
1 $\mu\text{l}$	0,75 M DTT (Dithiothreitol, in A. bidest. DEPC behandelt)
1 $\mu\text{l}$	RNAsin (RNase-Inhibitor; 40 u/ $\mu\text{l}$ ; Boehringer)
5 $\mu\text{l}$	$\alpha[^{35}\text{S}]$ -UTP (50 $\mu\text{Ci}$ )
1 $\mu\text{l}$	RNA-Polymerase (T3, T7, oder SP6; Boehringer)
<hr/>	
$\Sigma$ 25 $\mu\text{l}$	

### 2.9.2.2 Verdau der *templates*

Um ungewollte Bindungen der Sonden-RNA an die *template*-DNA zu verhindern, wurde direkt im Anschluß an die *in vitro* Transkription eine DNase-Behandlung durchgeführt. Hierzu wurden zu jedem Reaktionsansatz 1  $\mu\text{l}$  DNase (10 u; Boehringer Mannheim) hinzugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend auf Eis durch die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA abgestoppt.

### 2.9.2.3 Aufreinigung der Sonden über Sephadex G25 Säulen

Um fehlerhafte Messungen durch nicht eingebaute radioaktive Nukleotide bei Konzentrationsbestimmung der Sonden zu vermeiden, wurden die überschüssigen Nukleotide durch Zentrifugation über Sephadex G25 Säulen (Quick Spin™ Columns; Boehringer Mannheim) abgetrennt. Zum Einstellen des Elutionsvolumen wurden 100  $\mu\text{l}$  1x TE auf die Säulen gegeben und für 3 min bei 600 g zentrifugiert. Danach wurden die Reaktionsansätze mit 65  $\mu\text{l}$  1x TE auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, auf die Säulen gegeben und ebenfalls bei 600 g für 3 min zentrifugiert. Zuletzt wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  für die Konzentrationsbestimmung und 5  $\mu\text{l}$  für den Gelcheck der Sonden abgenommen und die Eluate anschließend bei -20 °C eingefroren.

#### 2.9.2.4 Bestimmung der Sondenmenge über die eingebaute Radioaktivität

Durch die Messung des radioaktiven Zerfalls von  $^{35}\text{S}$  in einem bestimmten Probenvolumen konnte neben der Einbaurrate auch die Menge des markierten Transkriptes bestimmt werden. Für die Messungen wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  Sonde in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotizint 22; Roth; Karlsruhe) gegeben und im Szintillationszähler analysiert. Ausgehend davon das bei  $^{35}\text{S}$  die Zerfallsrate (dpm) ungefähr gleich der Anzahl an gemessenen Zerfallsereignissen (cpm) ist, berechnet sich die Einbaurrate nach folgender Formel:

$$\text{Einbaurrate [\%]} = \frac{\text{gemessene cpm der Gesamtprobe}}{\text{dpm der eingesetzten Radioaktivität*}}$$

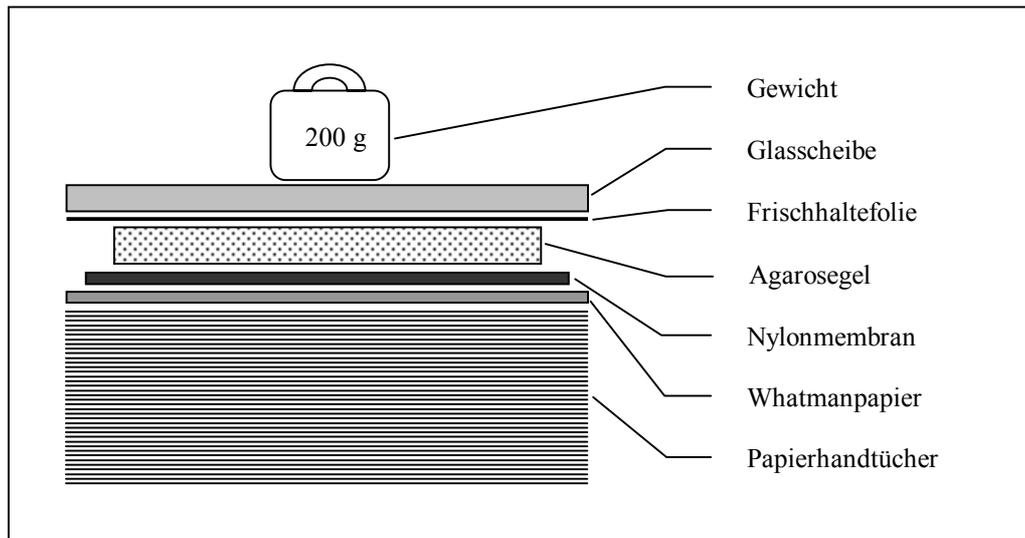
Die Einbaurrate betrug in den Versuchen zwischen 60 % und 90 %. Die Transkriptmenge in den einzelnen Proben konnte über folgenden Zusammenhang bestimmt werden.

$$5,2 \times 10^5 \text{ cpm} = 1 \text{ ng RNA} \times \mu\text{l}^{-1}$$

#### 2.9.2.5 Kontrolle und Größenbestimmung der radioaktiv markierten Sonden

Eine Kontrolle der Sondenqualität und der Größe ist wichtig, da während der *in vitro* Transkription die [ $^{35}\text{S}$ ]-UTP's viel geringer konzentriert eingesetzt werden als die restlichen NTP's. Dies hat zur Folge, daß es zu Kettenabbrüchen während der Transkription kommt und die entstehenden Sonden meist kleiner als die entsprechenden *templates* sind. Die unterschiedlich großen Fragmente ergeben dem entsprechend bei einer elektrophoretischen Auftrennung keine distinkten Banden, sondern größere Spots, deren mittlere Größe für die partielle Hydrolyse der Sonden bestimmt werden muß.

Für die Größenbestimmung wurden 5  $\mu\text{l}$  der Sonden in einem denaturierenden 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kap. 2.6.2), auf eine Nylonmembran geblottet und mittels Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Zur Vermeidung überflüssigen radioaktiven Abfalls wurde ein einfacher abwärtsgerichteter "Trocken"-Kapillarblot ohne Blottingpuffer über Nacht durchgeführt (s. Abb. 4). Danach wurde die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt, ein Röntgenfilm aufgelegt und nach einer Expositionszeit von 3,5 h entwickelt. Die Bestimmung der mittleren Sondenlänge erfolgte anhand eines aufgetragenen Größenstandards.



**Abb. 4: Aufbau eines "Trocken"-Kapillarblots**

Die im Gel enthaltene Feuchtigkeit wurde durch Kapillarkraft in die Papierhandtücher gesogen. Hierbei wurden die im Agarosegel enthaltenen RNA-Sonden durch den gerichteten Flüssigkeitsstrom auf eine immobilisierende Nylonmembran transferiert.

#### 2.9.2.6 Teilweise alkalische Hydrolyse der Sonden

Aufgrund der besseren Gewebegängigkeit kleiner Sondenfragmente wurde eine partielle Hydrolyse der Sonden durchgeführt. Die ideale Größe der Sondenfragmente liegt zwischen 100 und 150 Nukleotiden. Nachdem die mittlere Größe der Produkte der *in vitro* Transkription bestimmt worden war, wurde die Hydrolysedauer und somit der Grad der Fragmentierung über folgende Formel berechnet.

$$\text{Hydrolysedauer [min]} = \frac{L_0 - L_f}{k \times L_0 \times L_f}$$

$L_0$  = Sondenlänge vor der Hydrolyse [kB]

$L_f$  = Sondenlänge nach der Hydrolyse [kB]

$k$  = 0,11 kB / min (Konstante bei 60 °C)

Für die Durchführung der limitierten Hydrolyse wurde eine äquivalente Menge an Hydrolysepuffer zu den aufgereinigten Sonden (vgl. Kap. 2.9.2.3) gegeben und bei 60 °C für die errechnete Hydrolysedauer inkubiert. Das Sondenvolumen mußte hierfür erneut bestimmt werden, da es bei der Aufreinigung der Sonden zu unterschiedlichen

Elutionsvolumen gekommen war. Die Hydrolyse der Sonden wurde anschließend auf Eis durch Neutralisation mit Natriumacetat und Essigsäure gestoppt und die RNA-Fragmente durch Zugabe von Ethanol und denaturierter Lachsspermien-DNA für 30 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt. Bei einem Gesamtvolumen des Hydrolyseansatzes von  $200\text{ }\mu\text{l}$  wurden hierzu in gegebener Reihenfolge folgende Mengen an Lösungen hinzugegeben.

- $6,75\text{ }\mu\text{l}$       3 M Natriumacetat (pH 6,0)
- $1\text{ }\mu\text{l}$         1 M Essigsäure
- $550\text{ }\mu\text{l}$      Ethanol ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )
- $12\text{ }\mu\text{l}$         denaturierte Lachsspermien-DNA (5 mg/ml)

Nach der Fällung wurden die Präzipitate bei  $20.000\text{ g}$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in  $50\text{ }\mu\text{l}$  1x TE resuspendiert. Zur Bestimmung der Sondenkonzentration wurde der radioaktive Zerfall von  $1\text{ }\mu\text{l}$  der Lösung im Szintillationszähler gemessen. Der Verlust an Sonde durch die Hydrolyse kann bis zu 50 % betragen. Die Sonden wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und konnten 3 Monate für Hybridisierungsexperimente eingesetzt werden.

- Hydrolysepuffer:

80 mM Natriumhydrogencarbonat; 120 mM Natriumcarbonat; pH 10,2

### 2.9.3 Hybridisierung

Im Anschluß an den Pronaseverdau (vgl. Kap. 2.9.1.3) erfolgte die Hybridisierung unter Abschluß von Deckgläser auf den Objektträgern. Abhängig von der Schnittdicke werden pro Objektträger  $10 - 20\text{ }\mu\text{l}$  Hybridisierungslösung mit einer Sondenkonzentration von  $1 - 2\text{ ng} / 10\text{ }\mu\text{l}$  benötigt. Für  $16\text{ }\mu\text{m}$  dicke Dünnschnitte wurde in den Versuchen  $20\text{ }\mu\text{l}$  Hybridisierungslösung mit einer Sondenkonzentration von  $1,5\text{ ng} / 10\text{ }\mu\text{l}$  eingesetzt. Für die Hybridisierung wurden jeweils  $20\text{ }\mu\text{l}$  Hybridisierungslösung über den Schnitten verteilt und ein Deckglas ( $18 \times 18\text{ mm}$ ) luftblasenfrei aufgelegt. Die Ränder der Deckgläser wurden danach mit 50 % Fixogum (Marabuwerke GmbH & Co., Tamm) in Petroleumbenzin abgedichtet und die Objektträger waagrecht in eine feuchte Kammer (2x SSC) gelegt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Ansatz für 100 µl Hybridisierungslösung (ausreichend für 5 OT):

50 µl	Formamid
20 µl	Dextransulfat (50 %)
6 µl	5 M NaCl
2 µl	50x TE
2 µl	50x Denhardt Reagenz
6 µl	0,75 M DTT
x µl	A. bidest. (DEPC behandelt)
y µl	= 15 ng RNA-Sonde
<hr/>	
Σ 100 µl	(x + y = 14 µl)

- 50x Denhardt Reagenz:

0,1 g Ficoll 400; 0,1 g PVP (Polyvinylpyrolidol); 0,1 g BSA (Fraktion V);  
auf 10 ml mit A. bidest. auffüllen; sterilfiltrieren und in 1 ml Aliquots einfrieren

- 50x TE:

0,5 M Tris; 50 mM EDTA; pH 8,0 mit HCl eingestellt

#### 2.9.4 Waschen und RNase-Verdau

Nach der Hybridisierung wurde das Fixogum mit einem spitzen Skalpell abgelöst und die Objektträger solange in separate gekennzeichnete Färbeküvetten mit 2x SSC gestellt bis sich die Deckgläser von selbst abgelöst hatten. Im Anschluß hieran wurden die Objektträger in den selben Färbeküvetten im Wasserbad bei 45 °C 2x 45 min mit Waschpuffer und 5 min bei RT mit 10 mM DTT in 1x SSC gewaschen. Um später bei der Detektion Signale von unspezifisch gebundener einzelsträngiger RNA zu vermeiden wurde diese nach der Hybridisierung durch eine RNase-Behandlung abgebaut. Dieses geschah wiederum in extra gekennzeichneten Färbeküvetten durch eine 30 minütige Behandlung mit RNase-Lösung bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Objektträger erneut 2x 45 min bei 45 °C mit Waschpuffer und 2x 5 min mit 10 mM DTT in 1x SSC bei RT gewaschen. Zuletzt wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden ethanolischen Reihe (vgl. Kap. 2.7.1.2) dehydratisiert und konnten dann, bis zur weiteren Bearbeitung, bei 4 °C gelagert werden.

- Waschpuffer:  
10 mM DTT; in 1x SSC mit 50 % Formamid
- RNase-Puffer:  
0,5 M NaCl; 10 mM TRIS; 1 mM EDTA; pH 8,0 mit HCl eingestellt
- RNase-Stammlösung:  
10 mg/ml RNase A in 10 mM TRIS/HCl (pH 8,0); 10 mM NaCl; 20 % Glycerin  
in Aliquots bei -20 °C einfrieren
- RNase-Lösung:  
Endkonzentration 20 µg/ml; 65 µl RNase-Stammlösung; in 32,5 ml RNase-Puffer

### **2.9.5 Mikroautoradiographie**

Die Detektion der radioaktiv markierten RNA-Hybride erfolgte über die sensitive Methode der Mikroautoradiographie. Bei der Mikroautoradiographie werden die Gewebeschnitte mit flüssigem Röntgenfilm überschichtet, welcher durch die  $\beta$ -Strahlung beim radioaktiven Zerfalls des  $^{35}\text{S}$  Schwefels lokal belichtet wird. Die Verwendung von Flüssigfilm ermöglicht den direkten Kontakt des Films zu den Hybriden und somit eine genaue Lokalisierung der spezifischen mRNA am Ort ihrer Bildung. Nach der Entwicklung des Films lassen sich die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen anhand der geschwärzten Silberkörner leicht am Mikroskop auswerten.

#### **2.9.5.1 Beschichten der Objektträger mit Flüssigfilm**

Als Filmmaterial für die Mikroautoradiographie wurde eine NTB 2 Nuclear Track Emulsion (Tecnomara, Fernwald) verwendet. Aufgrund der hohen Lichtempfindlichkeit des Flüssigfilms mußten alle Arbeiten bis nach der Entwicklung des Films in absoluter Dunkelheit durchgeführt werden. Das Filmmaterial, welches bei Raumtemperatur eine zähe Masse ist, wurde im Wasserbad bei 42 °C in 5 ml Aliquots aufgeteilt und in Szintillationsgefäßen bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Das Beschichten der Objektträger fand einzeln, in einer speziell angefertigten Färbeküvette (Reservoir: 32 x 5 x 70 mm, l x b x h), mit nach oben offenem Führungstrichter statt.

Für die Beschichtung der Objektträger wurden in einem Wasserbad 5 ml 600 mM Ammoniumacetat sowie ein 5 ml Aliquot des Films für 30 min bei 42 °C erwärmt und anschließend in die ebenfalls vorgewärmte Färbeküvette gegeben. Mit einem sauberen Objektträger wurden die Lösungen behutsam gemischt und für 10 min stehengelassen. Durch Eintauchen mehrerer einzelner Objektträger wurden aufgestiegene Luftblasen solange entfernt bis die Glasoberfläche mit einem ebenmäßigen Film überzogen war. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten konnten nun durch Eintauchen und gleichmäßiges Herausziehen aus dem Film beschichtet werden. Im Anschluß hieran wurden sie für 2 h in senkrechter Position auf Filterpapier stehend an der Luft getrocknet. Die Exposition für 3 - 6 d (1 d - mehrere Wochen möglich) fand in schwarzen, lichtundurchlässigen Plastikboxen mit Tragegestell bei 4 °C statt. In den Plastikboxen deren Deckel zusätzlich mit schwarzem Gewebepband abgedichtet wurden, befanden sich zur Entwässerung der Luft Säckchen mit Trockenmittel ( $\text{CuSO}_4$ ).

#### **2.9.5.2 Entwicklung des Films und Versiegelung der Präparate**

Um eine Reißbildung bei der Entwicklung des Films zu vermeiden, war es wichtig, daß Entwickler (Kodak D-19), Fixierer (Kodak Fixierbad für Film und Papier), das Wasserbad sowie die Objektträger annähernd die gleiche Temperatur von 15 °C hatten. Die Objektträger wurden mit dem Tragegestell erst für 4 min in Entwickler gestellt, dann 15 s in A. dest. gewaschen und anschließend 5 min fixiert. Nach dem Fixierbad wurden die Objektträger weitere 15 min bei Licht mit A. dest. gewaschen und für 1 h an der Luft getrocknet.

Für die Herstellung von Dauerpräparaten wurden 30 µl Eindeckmittel (Histofluid; Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Bad Mergentheim) nach Herstellerangaben über den Schnitten verteilt und ein Deckglas (18 x 18 mm) luftblasenfrei aufgelegt. Bevor das Eindeckmittel fest wurde, konnte es auf einer Streckplatte gleichmäßig verteilt werden. Die fertigen Präparate wurden am Mikroskop ausgewertet und konnten bei Raumtemperatur für mehrere Monate gelagert werden.

## 2.10 *Western* Analysen

Der Nachweis von geringen Mengen bestimmter Proteine gelang mit dem sogenannten *Immuno-Western-blotting*. Bei dieser immunologischen Methode wurden einzelne Proteine nach Auftrennung eines Gesamtproteingemisches in einer denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und dem Transfer auf eine immobilisierende Membran mittels spezifischer Antikörpern nachgewiesen.

### 2.10.1 Proteinextraktion

Die Extraktion von Proteinen aus Weizenblättern wurde nach einer Methode von BRYNGELSSON und GREEN (1989) durchgeführt. Hierzu wurden fünf Blätter in flüssigem Stickstoff gemörsert, das Pulver in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 1,5 ml kalter Extraktionspuffer hinzugegeben. Danach wurden die Probe gründlich durchmischt und 20 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch Filtration mit einem Papierfilter von Schwebstoffen befreit. Zur Entsalzung des Proteingemisches wurden die Proben in einem Spectra/Por<sup>®</sup> Dialyseschlauch (Ausschluß 6-8 kD; Spectrum Medical Industries; Los Angeles; USA) gegen 1 mM Tris/Cl pH 6,8 über Nacht dialysiert. Zum Einengen des Probenvolumens auf etwa 150 µl wurden die Dialyseschläuche für 1 h mit PEG 20000 bedeckt. Nach dem Säubern der Schläuche mit A. dest. wurden die Proteinextrakte in Reaktionsgefäße überführt und 15 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

- Extraktionspuffer:

32 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 84 mM Zitronensäure; 14 mM Mercaptoethanol; pH 2,8

### 2.10.2 Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach einer Methode von BRADFORD (1976), die auf einer Reaktion des Coomassie-Reagenz mit den freien Aminogruppen der Proteine beruht. Der Nachweis wurde über den entstehenden Farbkomplex photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm geführt. Für die Konzentrationsbestimmung wurde der Proteinextrakt mit Coomassie-Reagenz im Verhältnis 1 : 1 gemischt und die Extinktion nach einer 15 minütigen Inkubationszeit bei RT am Photometer gemessen. Anhand einer

Eichgeraden, welche mit BSA erstellt wurde, konnte die Konzentration in BSA-Äquivalenten errechnet werden. Die Herstellung des Coomassie-Reagenz erfolgte nach einer veränderten Anleitung von SCOPES (1988).

- Coomassie-Reagenz:

600 mg/l Coomassie-Brilliant-Blue G250; in 2 % [v/v] Perchlorsäure

Coomassie bei 4 °C über Nacht lösen und anschließend 2x filtrieren; die Extinktion bei  $\lambda = 465$  nm sollte zwischen 1,3 und 1,5 liegen

### **2.10.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Das Gießen der Polyacrylamidgele und Auftrennung der Proteinextrakte erfolgte in einer Mini-Protean II Kammer der Firma BioRad (Hercules; USA). Die Polyacrylamidgele bestanden aus einem 15 %igen Trenngel und einem 4 %igen Sammelgel. Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Hierzu wurden die Monomerstammlösung, das A. dest. und der Puffer gemischt und in einer Saugflasche im Vakuum entgast. Nach Zugabe des Radikalbildners APS (Ammoniumpersulfat) und des Katalysators TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin) wurde die Lösung vorsichtig vermischt und zügig in die Gelkassette pipettiert. Während der Polymerisation des Gels wurde es mit Isopropanol überschichtet. Analog zum Trenngel wurde dann das Sammelgel aus den einzelnen Komponenten hergestellt. Nachdem das Isopropanol mit Filterpapier abgesaugt war, wurde das Sammelgel über dem Trenngel in die Gelkassette eingefüllt und ein Probenkamm eingesetzt.

In der Zeit bis zur vollständigen Polymerisation des Sammelgels wurden die Proben vorbereitet. Von den Proteinextrakten wurde eine Menge, welche 2  $\mu$ g BSA-Äquivalenten entsprach, mit A. dest. auf 8  $\mu$ l aufgefüllt und mit 2  $\mu$ l SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden dann 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Nachdem die Gelkassette in die Elektrophoresekammer eingebaut und die Pufferreservoirs mit 4 °C kaltem Elektrophoresepuffer befüllt waren, wurden die Proben kurz herunter zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Während der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine bei 200 V wurde die Elektrophoresekammer mit Eis gekühlt. Nach ca. 60 min hatte das als Laufmarker fungierende Bromphenolblau das Gel passiert und die Elektrophorese konnte gestoppt werden. Das Gel wurde vorsichtig aus den Glasscheiben gelöst, das Sammelgel entfernt und einem Elektrobplot unterzogen.

- 15 % Trenngel:  
2,5 ml A. dest.; 2,5 ml 1,5 M Tris/Cl (pH 8,8); 5 ml Acrylamid/Bis-Stammlösung (37 % T, 1 % C; Boehringer Mannheim); 50 µl 10 % APS; 5 µl TEMED
- 4 % Sammelgel:  
6,2 ml A. dest.; 2,5 ml 0,5 M Tris/Cl (pH 6,8); 1,3 ml Acrylamid/Bis-Stammlösung (37 % T, 1 % C; Boehringer Mannheim); 50 µl 10 % APS; 10 µl TEMED
- 5x SDS-Probenpuffer:  
1 ml 2 M Tris/Cl (pH 6,8); 3,2 ml 20 % [w/v] SDS; 3,2 ml Glycerin; 0,2 ml 4 % [w/v] Bromphenolblau; 1,45 ml 1 M DTT
- Elektrophoresepuffer:  
25 mM Tris/Cl (pH 8,3); 192 mM Glycin; 0,1 % [w/v] SDS

#### **2.10.4 Elektroblob**

Der Proteintransfer auf eine immobilisierende Nitrocellulosemembran (Hybond™ ECL™, Amersham) wurde in einer Mini-Protean Elektroblobting Kammer der Firma BioRad nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Blobtingpuffer sollte während des Proteintransfers eine Temperatur von 4 °C haben. Aus diesem Grund wurde der Puffer vorgekühlt und die Blobtingapparatur während des Blobtvorganges auf Eis gestellt. Der Proteintransfer wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt und dauerte etwa 60 min.

- Blobtingpuffer:  
25 mM Tris/Cl (pH 8,3); 192 mM Glycin; 20 % [v/v] Methanol

#### **2.10.5 Immunodetektion**

Die Detektion spezifischer Proteine wurde mit dem "BM Chemiluminiszenz Westernblobting Kit (Mouse/Rabbit)" von Boehringer Mannheim durchgeführt. Der Nachweis der Proteine erfolgt hierbei über die Bindung eines primären proteinspezifischen Antikörper, der anschließend über die Bindung eines sekundären Peroxidase-gekoppelten

Antikörper detektiert wird. Die Peroxidase am sekundären Antikörper katalysiert später die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von  $H_2O_2$ . Bei dem einsetzenden Zerfall des Reaktionsprodukts entsteht Chemiluminiszenz, welche auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden kann.

Der in den Versuchen zur Detektion von pRHv-4-Homologen in Weizen eingesetzte primäre polyklonale Antikörper (anti-HvPR-1a, hergestellt in Kaninchen) wurde von DR. T. BRYNGELSSON, Swedish University of Agricultural Science, Svalöv, Schweden zur Verfügung gestellt.

Vor der Immunodetektion wurden die zunächst die freien Bindungsstellen auf den Membranen durch Schwenken in 1 % Blockingreagenz 1 h blockiert. Hierauf wurden die Membranen 1 h in 0,5 % Blockingreagenz mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 1000 inkubiert. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch 2x 10 min Waschen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wurden die Membranen 2x 10 min in 0,5 % Blockingreagenz inkubiert und dann der sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 5000 hinzu gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit folgten vier weitere jeweils 10-minütige Waschschrte mit Waschpuffer. Nachdem Entfernen der unspezifisch gebundenen Antikörper wurden die Membranen 1 min in Detektionsreagenz geschwenkt, leicht feucht in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm (X-OMAT AR, Kodak) für 1 - 10 min aufgelegt. Für die Entwicklung der Filme wurde Agfa G 153 Entwickler und Fixierer verwendet.

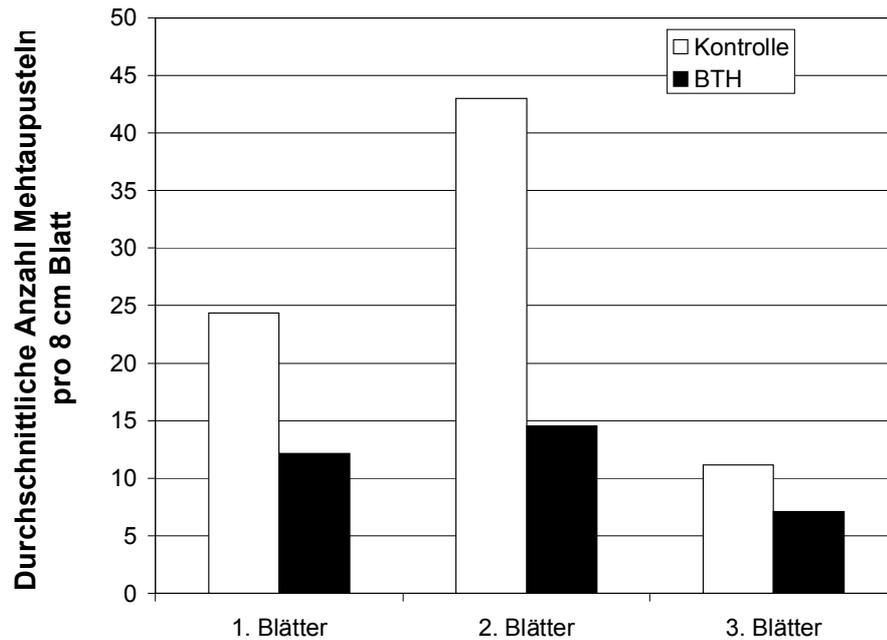
- TBS:  
50 mM Tris; 0,15 M NaCl; pH 9,5 mit HCl eingestellt
- Waschpuffer:  
0,1 % [v/v] Tween in TBS
- Blockingreagenz:  
10 % [v/v] Blocking-Stammlösung (BM Kit) in TBS
- Detektionsreagenz:  
Lösung A/Lösung B (BM Kit); 1:100 [v/v]

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Makroskopische Analyse des Mehлтаubefalls nach chemischer Induktion der Resistenz mit BTH

Begleitend zu den biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurde die Stärke der Resistenzinduktion durch BTH anhand der Reduktion des Mehлтаubefalls makroskopisch analysiert. Die Auswertung nach BTH-Behandlung erfolgte über Auszählen der Mehлтаupusteln auf den abaxialen und adaxialen Seiten der ersten, zweiten und dritten Blätter. Als Vergleich hierzu wurden Kontrollpflanzen herangezogen, welche nur mit der Formulierung (WP, *wettable powder*) ohne aktive Substanz behandelt worden waren (s. Abb. 6A).

Da die Inokulationsdichte und die Stärke der BTH-Wirkung innerhalb der Versuche oftmals stark variierten, ist in Abb. 5 nur das Ergebnis eines einzelnen Versuches dargestellt. Die Induktion einer Resistenz durch BTH konnte in mehreren Versuchen auf allen Blattetagen nachgewiesen werden. Unabhängig von der Blattetage kam es zwischen den Versuchen zu Schwankungen zwischen 10 und 70 % Reduktion des Mehлтаubefalls. Die Auswertung des Befalls auf den dritten Blättern erwies sich teilweise als schwierig, da zum Zeitpunkt der Inokulation erst ein Teil des Blattes ausgebildet war. Dies erklärt auch die geringere Anzahl an Mehлтаupusteln auf diesen Blättern. Um eine Induktion auch auf höheren Blattetagen zu dokumentieren, wurden in einem einmaligen Experiment zu einem späteren Zeitpunkt (10 dpt) voll entwickelte dritten und vierten Blätter inokuliert und nach weiteren 7 Tagen ausgewertet. Es konnte nach Induktorbehandlung eine Reduktion des Mehлтаubefalls um 60 % erreicht werden (Daten nicht gezeigt).



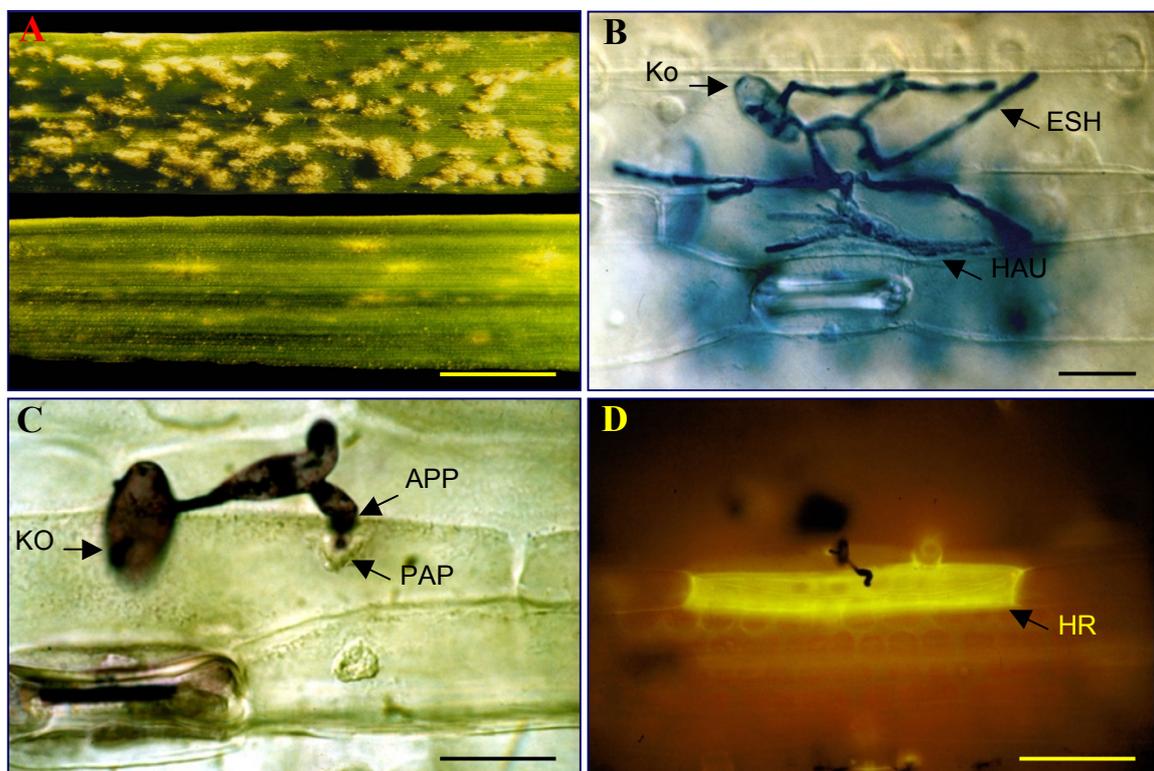
**Abb. 5: Quantitativ makroskopische Analyse des Mehltaubefalls auf verschiedenen Blattetagen induktorbekämpfter Weizenpflanzen 7 Tage nach Inokulation mit *Bgt*.** 14 Tage alte Pflanzen der Weizenlinie Kanzler wurden mit 100 ppm (bezogen auf das Bodenvolumen) des Resistenzinduktors BTH behandelt. Kontrollpflanzen wurden mit der entsprechenden Menge der nicht aktiven Leerformulierung WP behandelt. 4 Tage nach der Behandlung (4 dpt) wurden die Blätter beidseitig mit *Bgt* mit einer Dichte von 3-5 Konidien pro mm<sup>2</sup> inokuliert. 7 Tage später wurde auf je 25 Pflanzen die Anzahl der Mehltaupusteln auf der abaxialen und adaxialen Seite der ersten, zweiten und dritten Blätter auf 8 cm Länge 1 cm unterhalb der Blattspitzen bestimmt und zusammengezählt. Dargestellt ist das Ergebnis eines einzelnen Versuches. Die Daten wurden mit ähnlicher Tendenz in mehreren unabhängigen Versuchen reproduziert.

### 3.2 Qualitative und quantitative mikroskopische Analyse der pflanzlichen Abwehr nach Induktorbehandlung

Der Mechanismus, welcher der CIR in Gerste gegenüber *Bgt* zugrunde liegt, wurde bereits in vorangegangenen cytologischen Untersuchungen analysiert. Dabei zeigte sich, daß DCINA, DCSA und BTH zu einer verstärkten Bildung effektiver Papillen und Ausprägung von HR nach Befall mit *Bgh* führt (KOGEL *et al.* 1994, BECKHOVE 1995 unveröffentlicht, JAROSCH *et al.* 1997). Für Weizen fehlten bislang Daten bezüglich der Resistenzreaktionen der Pflanze gegenüber *Bgt* nach einer Induktorbehandlung.

Für die Untersuchungen wurden 14 Tage alte Weizenpflanzen über eine Bodenapplikation mit BTH (100 ppm, bezogen auf das Bodenvolumen) behandelt. Kontrollpflanzen wurden

nur mit einer entsprechenden Menge der Formulierung (WP) des Wirkstoffes behandelt. Die Inokulation mit dem Weizenmehltau erfolgte 4 Tage nach der Behandlung. Die Auswertung der Interaktionsstellen fand dann nach weiteren 48 Stunden statt. Da der morphologische Aufbau der Epidermis von Weizen in etwa dem von Gerste entspricht und bekannt ist, daß verschiedene Zelltypen unterschiedliche Reaktionen auf eine Mehltauinfektion zeigen, wurde für die Auswertung der Interaktionen eine Einteilung in kurze (A + B) und lange (C) Zellen nach KOGA *et al.* (1990) vorgenommen (s. Abb 7).



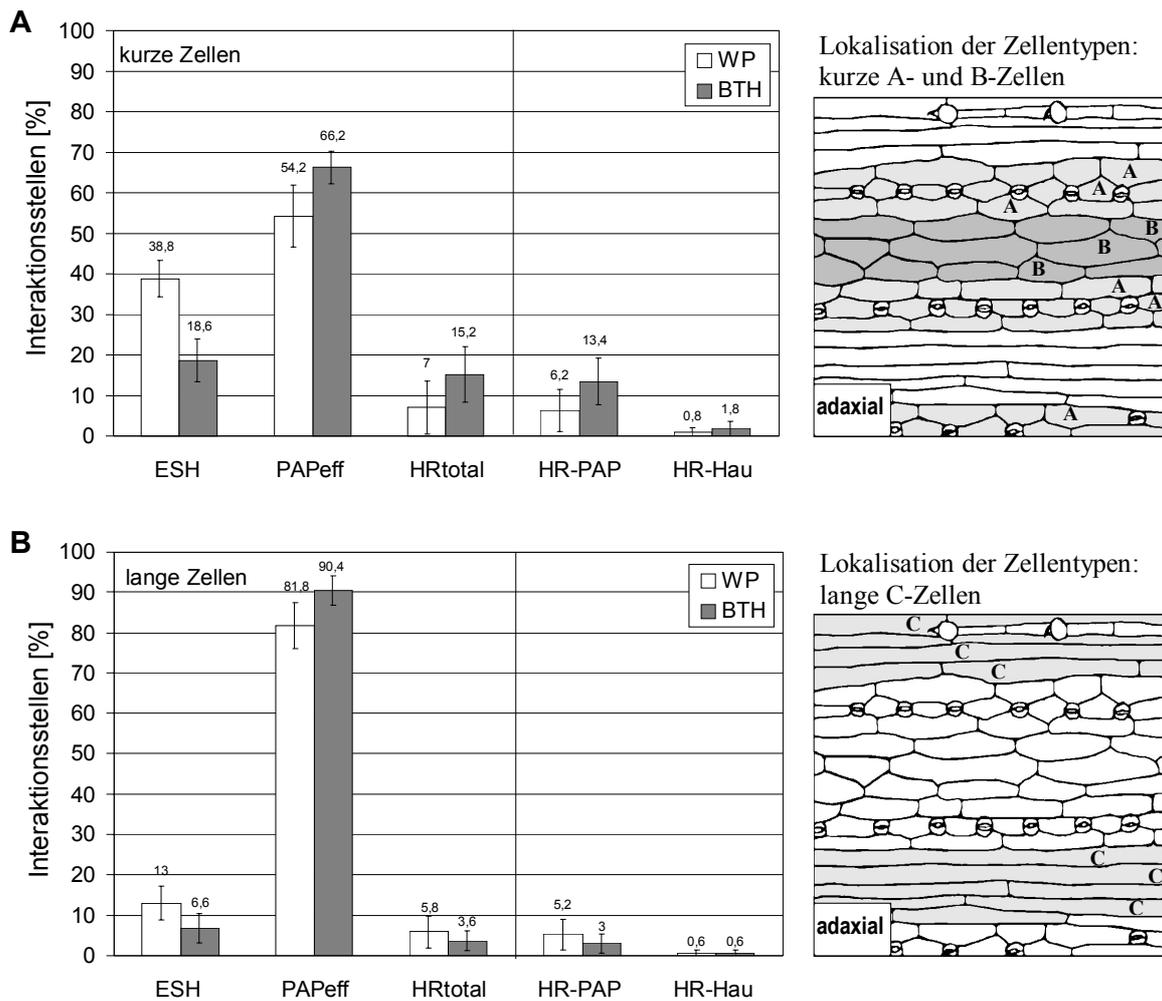
**Abb. 6: Makroskopische und mikroskopische Analyse der Resistenz-induzierenden Wirkung von BTH auf den Mehltaubefall in Weizen.** **A:** Makroskopischer Vergleich der Blätter einer WP-behandelten Kontrolle (oben) mit einer BTH-behandelten Pflanze (unten). **B, C, D:** Mikroskopische Analyse zur Wirkung der Resistenzinduktion durch BTH 48 hpi. **B:** WP-behandelte Kontrolle; Der Pilz konnte die Epidermiszelle penetrieren, ein Haustorium (HAU) im periplasmatischen Raum der Zelle ausbilden und mit verlängerten sekundären Hyphen (ESH) auswachsen. **C:** BTH-behandelte Probe; Der Pilz wurde durch eine effektive Papille (PAP) an der Penetration gehindert. **D:** BTH-behandelte Probe; m Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer einzelnen Epidermiszelle, welche mit einer HR aus den Pathogenbefall reagiert hat. Durch Einlagerung phenolischer Substanzen während der HR fluoresziert die Zelle bei UV Anregung ( $485 \pm 10$  nm) gelb. KO: Konidie, APP: Appressorium. Größenbalken = in A 5 mm, in B und C 10  $\mu$ m, in D 50  $\mu$ m. (quantitative Auswertung der Versuche s. Abb. 7)

Die genannten Zelltypen sind auf der adaxialen Seite eines Blattes parallel zu den Leitbündeln angeordnet. Die langen C-Zellen befinden sich jeweils über den Leitbündeln, die kurzen (A + B) Zellen in den Bereichen zwischen den Leitbündeln. A-Zellen grenzen im Gegensatz zu B-Zellen (und auch C-Zellen) direkt an Stomata an (s. Abb. 7 rechts).

Für die Analyse des Resistenzmechanismus wurden verschiedene pflanzlichen Abwehrreaktionen und Entwicklungsstadien des Pilzes in die Auswertung einbezogen. Für eine erfolgreiche Infektion wurde nach Penetration und Bildung eines Haustoriums die Entwicklung von sekundären Hyphen (ESH, s. Abb. 6B) als Hauptkriterium herangezogen. Als Abwehrmechanismen wurde einerseits die Bildung effektiver Papillen ( $PAP_{eff}$ , s. Abb. 6C), andererseits das Auftreten von hypersensitivem Zelltod ( $HR_{total}$ , s. Abb. 6D) bewertet. Für eine detailliertere Analyse wurde die HR klassifiziert in HR ohne Penetration (HR+PAP) und HR in Zellen, in denen ein Haustorium erkennbar war (HR+Hau).

Die in BTH-behandelten Weizenpflanzen vorherrschenden Resistenzmechanismen waren einerseits eine erhöhte Penetrationsresistenz und andererseits ein verstärktes Auftreten von Zellen mit HR ohne vorangegangene Penetration der Zellen. Wie in Abb. 7 dargestellt, bewirkte die Induktorbehandlung gegenüber den Kontrollen auf kurzen, wie auch auf langen Zellen eine Reduktion der Bildung von ESH von über 50 %. Insgesamt erwiesen sich kurze Zellen mit knapp 39 % ESH als deutlich anfälliger gegenüber dem Mehltau als lange Zellen mit 13 % ESH. Auf kurzen Zellen basierte die Reduktion des Mehлтаubefalls auf einer Erhöhung der Anzahl effektiver Papillen um 12 % sowie einer Zunahme der Zellen mit HR von 8 %. Grund für die Zunahme der HR waren hauptsächlich Ereignisse, bei denen der Pilz die Zellen nicht penetrieren konnte, und es zusätzlich zu Zelltod gekommen ist. Der Anteil an Zellen, welche nach einer erfolgten Penetration mit einer HR reagierten, war mit maximal 2 % gering und trug so kaum zur Ausprägung der Resistenz bei. Auf langen Zellen war die Bildung von effektiven Papillen der einzige Mechanismus, der für die Ausprägung der erhöhten Resistenz nach Induktorbehandlung verantwortlich war. Der ohnehin geringe Anteil an langen Zellen mit HR (5,8 %) sank sogar noch leicht ab.

Bei verschiedenen unabhängigen Reproduktionen der Versuche wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Das bedeutet, daß jeweils die Penetrationsresistenz in Blättern, die vor der Inokulation mit BTH behandelt worden waren, verstärkt ausgeprägt wurde. Dabei variierte das Verhältnis von nicht penetrierten Zellen mit und ohne zusätzliche Ausprägung einer HR von Experiment zu Experiment.



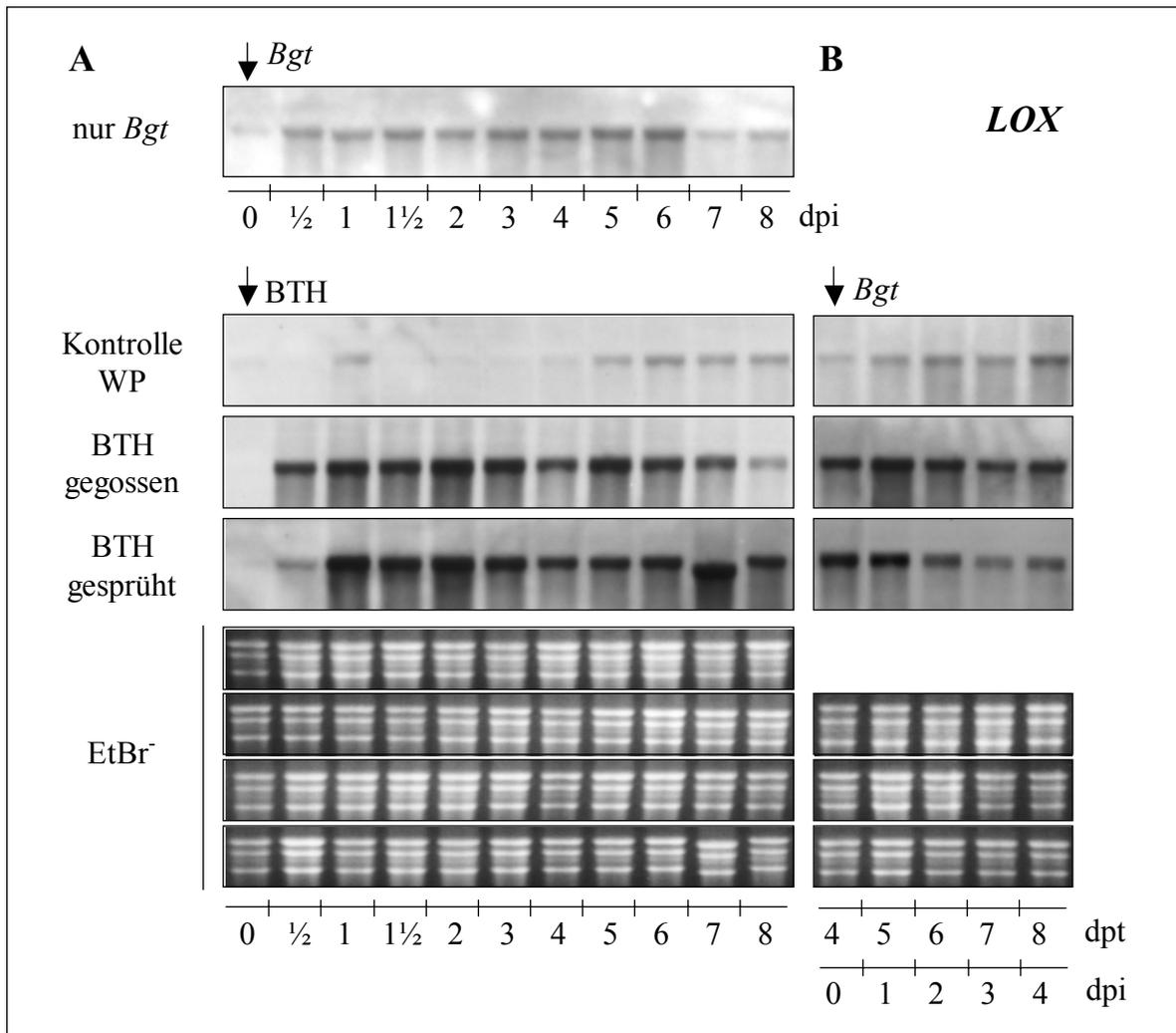
**Abb. 7: Qualitative und quantitativ mikroskopische Analyse der Abwehrreaktionen der genotypisch suszeptiblen Weizensorte Kanzler im Zustand chemisch induzierter Resistenz 48 Stunden nach Inokulation mit *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*.** 14 Tage alte Weizenpflanzen wurden über die Wurzeln mit 100 ppm BTH, bezogen auf das Bodenvolumen, behandelt (graue Säulen). Kontrollpflanzen wurden mit der entsprechenden Menge der Formulierung des Wirkstoffes behandelt (weiße Säulen, WP). Die Inokulation der adaxialen Seite der Blätter mit *Bgt* erfolgte 4 dpt mit einer Dichte von 5-20 Konidien pro mm<sup>2</sup>. Die Interaktionsstellen auf kurzen A- und B-Zellen (Teil A) wurden getrennt von denen auf langen C-Zellen (Teil B) untersucht. Die Lokalisation der kurzen und langen Zellen nach KOGA *et al.* (1990) ist rechts neben den Graphen dargestellt. Zur Bewertung einer erfolgreichen Infektion wurde die Bildung von verlängerten Sekundärhyphen (ESH) ausgezählt. Die Kriterien für eine Abwehr des Pathogens waren die Bildung effektiver Papillen (PAPeff) und die Ausprägung einer HR (HRtotal), welche aufgeteilt wurde in HR ohne Penetration (HR-PAP) und HR mit vorheriger Bildung eines Haustoriums (HR-Hau). Die Ergebnisse repräsentieren die Analyse von 5 ersten Blättern pro Behandlungsvariante, wobei jeweils 100 Interaktionsstellen pro Zelltyp auf jedem Blatt ausgezählt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen über die Mittelwerte von 5 Blättern. Die Ergebnisse wurden in ähnlicher Weise in mehreren unabhängigen Versuchen reproduziert. Die dargestellten Ergebnisse stammen von Blätter des gleichen Versuchansatzes, der auch für die *in vitro* und *in situ* Genexpressionsanalysen (Kap. 3.3 und 3.5.2) verwendet wurde.

### 3.3 Expressionsanalysen chemisch induzierter Gene

Die Behandlung von Weizenpflanzen mit BTH führt zu einer Aktivierung verschiedener Gene. Die Expression einzelner Gene wurde anhand der Akkumulation spezifischer Transkripte in einer Zeitkinetik mittels *Northernblot* Analysen nachgewiesen. Anhand der Expressionsstudien sollte geklärt werden, ob einerseits ein Einfluß verschiedener Applikationsarten (gesprüht, gegossen) auf Zeitpunkt und Stärke der Genaktivierung besteht und andererseits, ob die untersuchten Gene durch eine Infektion mit Weizenmehltau induzierbar sind (Teil A, Abb. 8-11). Die entsprechenden Kontrollpflanzen wurden mit der Leerformulierung (WP) behandelt. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Inokulation mit Weizenmehltau (4 dpt) nach erfolgter Resistenzinduktion zu einer Änderung im Expressionsprofil gegenüber nur behandelten Pflanzen führt (Teil B, Abb. 8-11). Dies sollte Aufschluß darüber geben, ob induzierte Pflanzen schneller (*priming* Effekt) oder durch eine verstärkte (*enhancement*) Genexpression auf den Pathogenbefall reagieren. Weiter dienten die *Northernblot* Analysen als Kontrolle und zur Bestimmung geeigneter Zeitpunkte für *in situ* Hybridisierungen.

Bei den untersuchten Genen handelte es sich um zwei *WCI*-Gene (*wheat chemically induced genes*), die nach einer BTH-Behandlung in Weizen induziert werden (GÖRLACH *et al.* 1996); eine Lipoxygenase, welche als molekularer Marker für Induzierte Resistenz in Gerste beschrieben ist (HAUSE *et al.* 1999) und *PR-1b*, einem PR-Protein, welches nach Pathogenbefall aktiviert wird und dessen Homologe in Dikotylen als Marker der IR angesehen werden (STICHER *et al.* 1997, RYALS *et al.* 1996)

Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach den Behandlungen die ersten Blätter geerntet, die Gesamt-RNA extrahiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen geblottet, die Transkripte mit den entsprechenden DIG- oder Fluorescein-markierten *antisense* RNA Sonden hybridisiert und über einen Antikörpervermittelten Chemilumineszenznachweis auf Röntgenfilmen detektiert. Die in Abb. 8-11 dargestellten *Northernblot* Analysen wurden mit Pflanzenmaterial desselben Versuchsansatzes gefertigt, der auch für die radioaktiven *in situ* Hybridisierungen verwendet wurde (Kap. 3.5.2).



**Abb. 8: Transkriptakkumulation einer Lipoxygenase (*LOX*) in der gegen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) anfälligen Weizensorte Kanzler im Zustand der chemisch induzierten Resistenz.**

Dargestellt sind die Transkriptakkumulationen in Kanzler nach alleiniger Boden- bzw. Sprühapplikation von BTH im Vergleich zu nur inokulierten Pflanzen (A) und Pflanzen, welche erst BTH-behandelt und 4 dpt zusätzlich mit *Bgt* inokuliert wurden (B).

14 Tage alte Weizenpflanzen wurden mit BTH bzw. der Leerformulierung (WP) über das Gießwasser (100 ppm, bezogen auf das Bodenvolumen) oder durch eine Sprühapplikation (100 ppm Lösung) behandelt. Im Falle einer Inokulation der Pflanzen mit *Bgt* erfolgte diese zu den angegebenen Zeitpunkten (↓ *Bgt*) mit einer Sporendichte von 1 - 5 Konidien pro mm<sup>2</sup>. Aus jeweils 5 Blättern der verschiedenen Varianten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Induktorbehandlung bzw. Inokulation die RNA extrahiert, jeweils 10 µg elektrophoretisch getrennt und auf Nylonmembranen immobilisiert. Der Nachweis der spezifischen Transkripte erfolgte durch Hybridisierung mit einer aus Gerste abgeleiteten Fluorescein-markierten *LOX2Hv1* Sonde und anschließender Detektion über einen Immuno-Chemilumineszenz-Assay. Durch Färbung der RNA mit EtBr<sup>-</sup> konnte die gleichmäßige Beladung der Gele dokumentiert werden.

### 3.3.1 *LOX* Expression

Die *Northernblot* Analysen in Abbildung 8 zeigen, daß eine Inokulation unbehandelter Weizenpflanzen der anfälligen Sorte Kanzler mit *Bgt* zu einer schwachen Expression der homologen Form (im folgenden vereinfacht nur *LOX* genannt) der Gersten-Lipoxygenase (*LOX2Hv1*) ab ½ dpi führte. Diese Erhöhung der Transkriptmenge hielt bis 6 dpi an und nahm dann wieder ab.

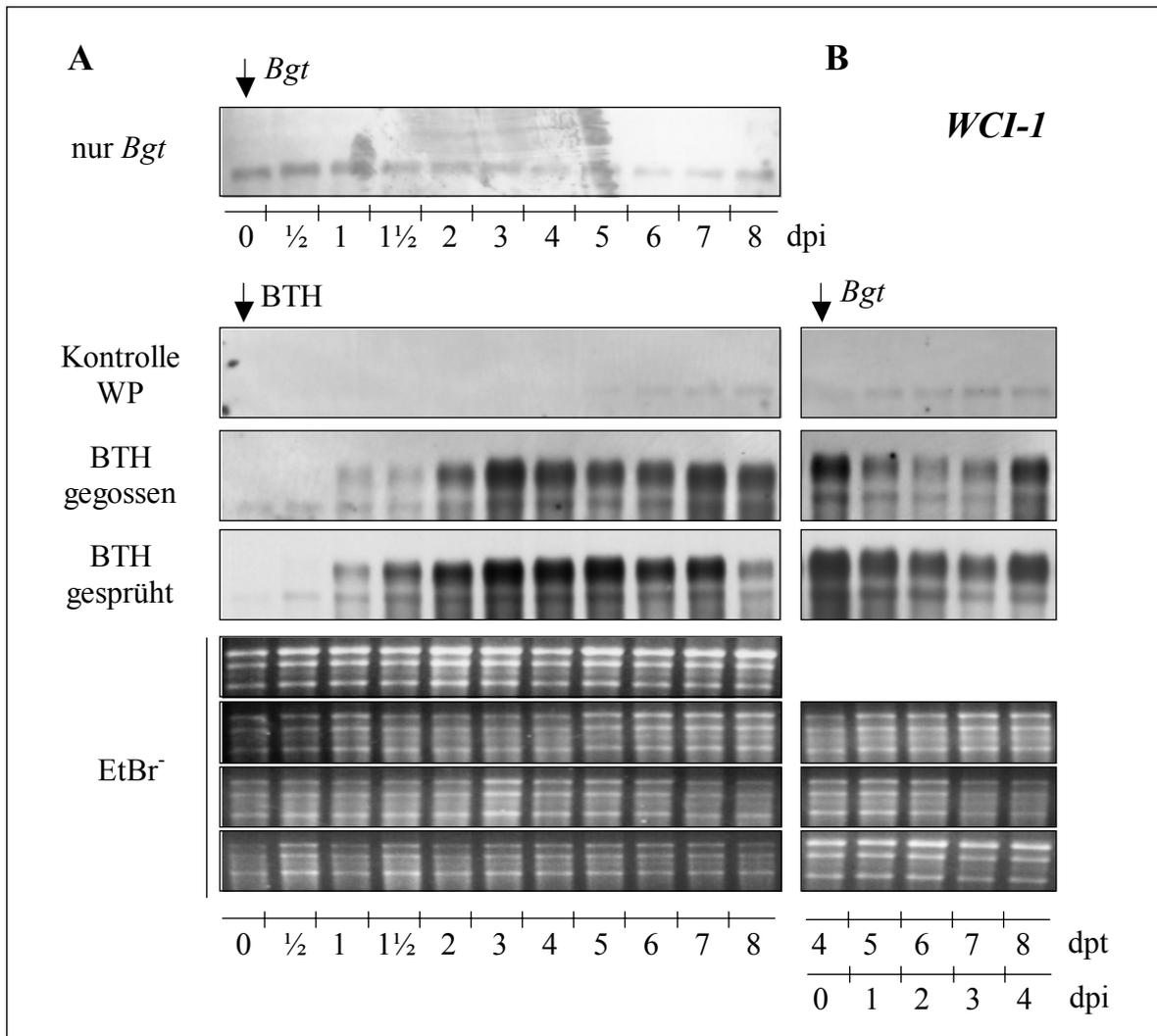
Sowohl Gieß- als auch Sprühapplikation von BTH führte zu einer starken Erhöhung der *LOX* Transkriptionsrate. Die Applikation über den Boden erwies sich als effektiver, da bereits ½ dpt ein deutlicher Anstieg zu registrieren war. Nach einer Sprühbehandlung kam es erst 1 dpt zu einem Anstieg der Transkriptmenge. Die Erhöhung der Transkriptionsrate konnte über die gesamte Dauer der Probennahme bis 8 dpt detektiert werden. Lediglich nach einer Bodenbehandlung war 8 dpt ein Rückgang der Transkriptmenge der *LOX* festzustellen.

Eine zusätzliche Inokulation mit *Bgt* zum Zeitpunkt 4 dpt führte in keiner der Varianten zu einer deutlichen Änderung im Expressionsprofil.

### 3.3.2 *WCI-1* Expression

Die Expressionsanalysen von *WCI-1* (Abb. 9) zeigten bei beiden Applikationsarten eine deutliche Induktion des Gens, nicht jedoch bei den Kontrollpflanzen (WP) oder nach einer Inokulation mit *Bgt*. Sowohl nach der Sprüh- als auch der Bodenbehandlung war von 1-8 dpt ein Anstieg in der *WCI-1* Transkriptmenge zu detektieren. Eine Applikation über die Blätter führte gegenüber der einer Bodenbehandlung zu einer etwas höheren Transkriptionsrate.

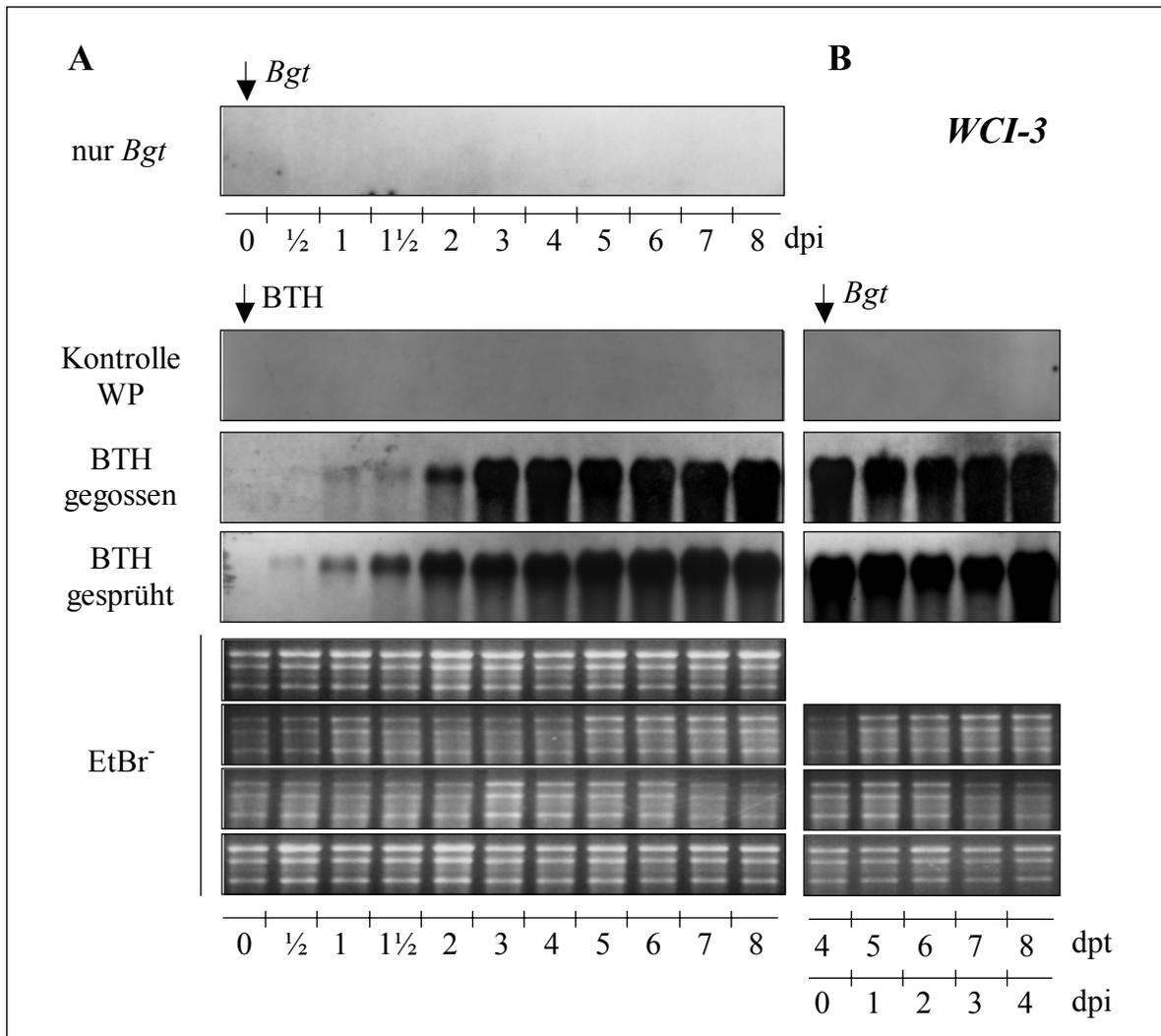
Eine zusätzliche Inokulation der behandelten Pflanzen mit *Bgt* zum Zeitpunkt 4 dpt bewirkte bis 8 dpt eine leichte, vorübergehende Abnahme der Transkriptmengen. 8 dpt waren sie wieder auf dem gleichen Level, wie bei den nur behandelten Pflanzen oder sogar etwas höher im Falle der Sprühbehandlung.



**Abb. 9: Transkriptakkumulation von *WCI-1* in der gegen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) anfälligen Weizensorte Kanzler im Zustand der chemisch induzierten Resistenz.**

Dargestellt sind die Transkript-akkumulationen in Kanzler nach alleiniger Boden- bzw. Sprühapplikation von BTH im Vergleich zu nur inokulierten Pflanzen (A) und Pflanzen, welche erst BTH-behandelt und 4 dpt zusätzlich mit *Bgt* inokuliert wurden (B).

14 Tage alte Weizenpflanzen wurden mit BTH bzw. der Leerformulierung (WP) über das Gießwasser (100 ppm, bezogen auf das Bodenvolumen) oder durch eine Sprühapplikation (100 ppm Lösung) behandelt. Im Falle einer Inokulation der Pflanzen mit *Bgt* erfolgte diese zu den angegebenen Zeitpunkten ( $\downarrow$  *Bgt*) mit einer Sporendichte von 1 - 5 Konidien pro  $\text{mm}^2$ . Aus jeweils 5 Blättern der verschiedenen Varianten wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Induktorbehandlung bzw. Inokulation die RNA extrahiert, jeweils 2  $\mu\text{g}$  elektrophoretisch getrennt und auf Nylonmembranen immobilisiert. Der Nachweis der spezifischen Transkripte erfolgte durch Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *WCI-1* Sonde und anschließender Detektion über einen Immuno-Chemilumineszenz-Assay. Durch Färbung der RNA mit EtBr konnte die gleichmäßige Beladung der Gele dokumentiert werden.



**Abb. 10: Transkriptakkumulation von *WCI-3* in der gegen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) anfälligen Weizensorte Kanzler im Zustand der chemisch induzierten Resistenz.**

Dargestellt sind die Transkript-akkumulationen in Kanzler nach alleiniger Boden- bzw. Sprühapplikation von BTH im Vergleich zu nur inokulierten Pflanzen (A) und Pflanzen welche erst BTH-behandelt und 4 dpt zusätzlich mit *Bgt* inokuliert wurden (B).

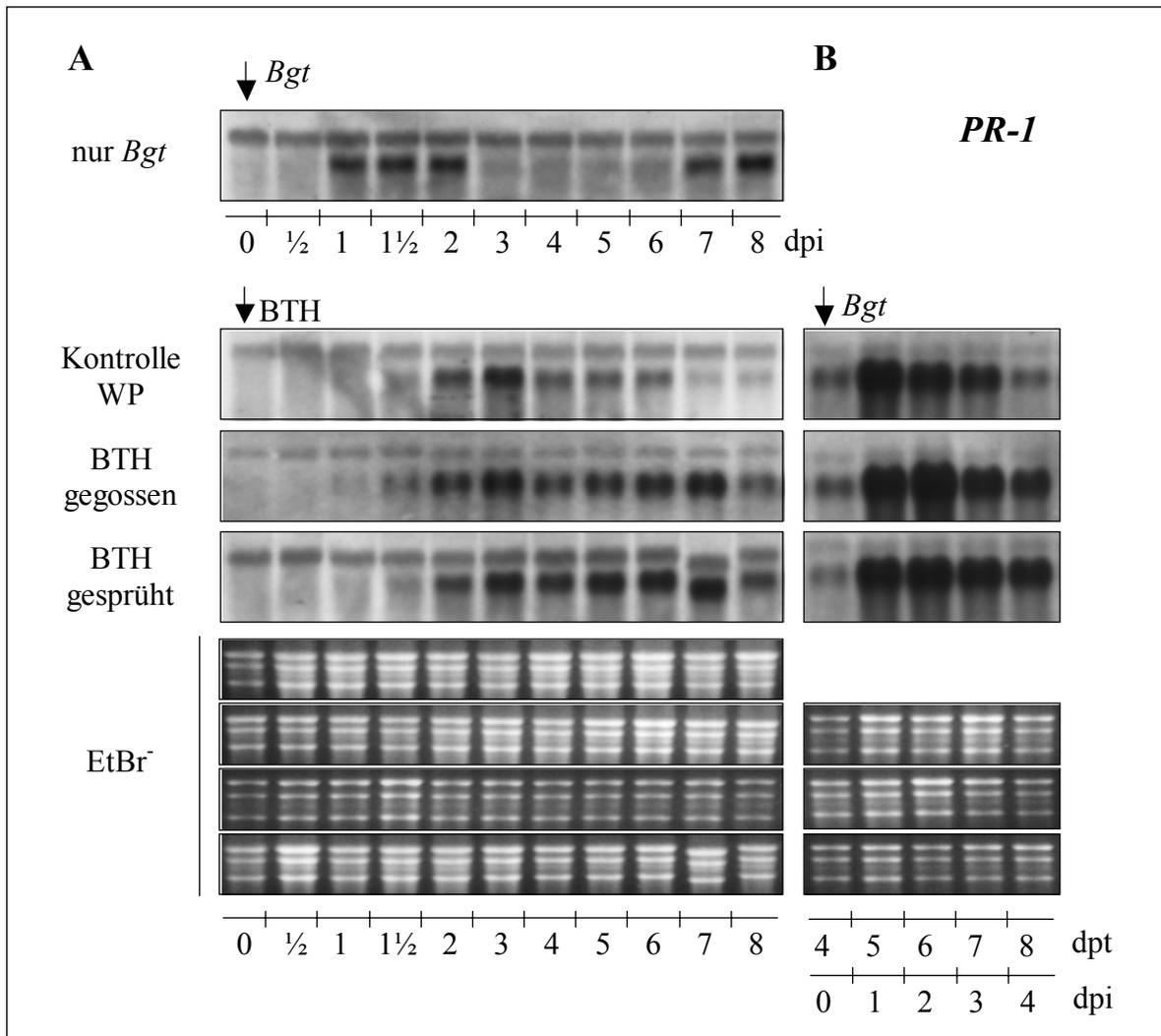
14 Tage alte Weizenpflanzen wurden mit BTH bzw. der Leerformulierung (WP) über das Gießwasser (100 ppm, bezogen auf das Bodenvolumen) oder durch eine Sprühapplikation (100 ppm Lösung) behandelt. Im Falle einer Inokulation der Pflanzen mit *Bgt* erfolgte diese zu den angegebenen Zeitpunkten ( $\downarrow$  *Bgt*) mit einer Sporendichte von 1 - 5 Konidien pro  $\text{mm}^2$ . Aus jeweils 5 Blättern der verschiedenen Varianten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Induktorbehandlung bzw. Inokulation die RNA extrahiert, jeweils 2  $\mu\text{g}$  elektrophoretisch getrennt und auf Nylonmembranen immobilisiert. Der Nachweis der spezifischen Transkripte erfolgte durch Hybridisierung mit einer Fluorescein-markierten *WCI-3* Sonde und anschließender Detektion über einen Immuno-Chemilumineszenz-Assay. Durch Färbung der RNA mit EtBr<sup>-</sup> konnte die gleichmäßige Beladung der Gele dokumentiert werden.

### 3.3.3 *WCI-3* Expression

Die Transkriptionsprofile von *WCI-3* (s. Abb. 10) zeigten einen ähnlichen Verlauf wie bei *WCI-1*. Nach Inokulation der Pflanzen sowie in den Kontrollen konnte keine Akkumulation von Transkripten detektiert werden. Eine Behandlung der Pflanzen mit BTH über den Boden führte ab 1 dpt zu einem kontinuierlichen Anstieg der *WCI-3* Transkriptmengen bis zum dritten Tag nach der Behandlung. Danach blieb die *WCI-3* Expression auf einem gleichbleibend hohen Niveau. Die Sprühapplikation von BTH bewirkte schon ½ dpt einen Anstieg der Genaktivität von *WCI-3* und war bis 2 dpt etwas stärker als bei den über den Boden behandelten Pflanzen. Im weiteren Verlauf des Versuches glichen sich die Mengen der *WCI-3* Transkripte in beiden Behandlungsvarianten an. Nach einer zusätzlichen Inokulation der induzierten Pflanzen konnte keine Änderung im Expressionsprofil von *WCI-3* festgestellt werden.

### 3.3.4 *PR-1* Expression

Aufgrund hoher Homologien in der stark konservierten Familie der PR-1 Proteine konnte die Hybridisierung mit einer Sonde durchgeführt werden, welche über *PR-1b* aus Gerste (*HvPR-1b*) generiert wurde. Eine Inokulation des Weizens mit *Bgt* führte zu einem biphasischen Verlauf der Expression des *PR-1b* Homologs (im folgenden vereinfacht als *PR-1* bezeichnet, s. Abb. 11). Zwischen dem ersten und dritten Tag nach der Inokulation kam es zum ersten Anstieg der Menge an *PR-1* Transkripten. Eine zweite Akkumulation fand dann ab 7 dpi statt. In allen Versuchen kam es auch in den WP-behandelten Kontrollpflanzen (meist 2-6 dpt) zu einer unregelmäßigen Expression von *PR-1*. Nach einer Sprüh- bzw. Bodenbehandlung der Pflanzen mit BTH konnten keine Unterschiede im Expressionsprofil von *PR-1* detektiert werden. In beiden Varianten kam es 1½ dpt zu einem Anstieg der Transkriptmenge. Im Weiteren blieb das *PR-1* Expressionsniveau konstant, bevor es dann 8 dpt wieder zurückging. Nach Inokulation (4 dpt) der BTH- und WP-behandelten Pflanzen kam es in allen Varianten bereits nach 1 d zu einer massiven Erhöhung der *PR-1* Transkriptmenge. Im Gegensatz zu den beiden BTH-behandelten Varianten ließ die Stärke der Expression von *PR-1* 8 dpt (4 dpi) bei den WP-Kontrollen wieder deutlich nach. Zu diesem Zeitpunkt erreichte die Transkriptmenge in den inokulierten Kontrollpflanzen etwa das Niveau der nicht inokulierten Pflanzen.



**Abb. 11: Transkriptakkumulation von *PR-1* in der gegen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) anfälligen Weizensorte Kanzler im Zustand der chemisch induzierten Resistenz.**

Dargestellt sind die Transkript-akkumulationen in Kanzler nach alleiniger Boden- bzw. Sprühapplikation von BTH im Vergleich zu nur inokulierten Pflanzen (A) und Pflanzen, welche erst BTH-behandelt und 4 dpt zusätzlich mit *Bgt* inokuliert wurden (B).

14 Tage alte Weizenpflanzen wurden mit BTH bzw. der Leerformulierung (WP) über das Gießwasser (100 ppm, bezogen auf das Bodenvolumen) oder durch eine Sprühapplikation (100 ppm Lösung) behandelt. Im Falle einer Inokulation der Pflanzen mit *Bgt* erfolgte diese zu den angegebenen Zeitpunkten ( $\downarrow$  *Bgt*) mit einer Sporendichte von 1 - 5 Konidien pro mm<sup>2</sup>. Aus jeweils 5 Blättern der verschiedenen Varianten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Induktorbehandlung bzw. Inokulation die RNA extrahiert, jeweils 10  $\mu$ g elektrophoretisch getrennt und auf Nylonmembranen immobilisiert. Der Nachweis der spezifischen Transkripte erfolgte durch Hybridisierung mit einer aus Gerste abgeleiteten Digoxigenin-markierten *HvPR-1b*-Sonde und anschließender Detektion über einen Immuno-Chemilumineszenz-Assay. Durch Färbung der RNA mit EtBr<sup>-</sup> konnte die gleichmäßige Beladung der Gele dokumentiert werden.

### 3.4 *Westernblot* Analysen von PR-1 Proteinen

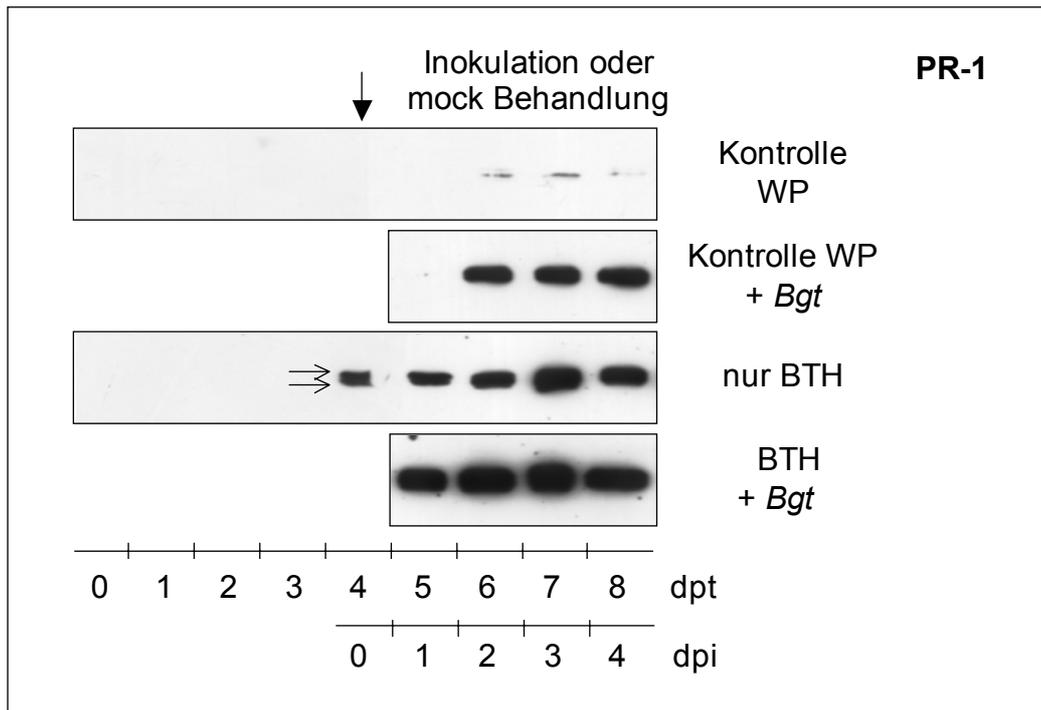
In vielen Pathosystemen kommt es während der Pathogenese zur Akkumulation einer Reihe von PR-Proteinen. Einige dieser Gene, darunter auch mehrere der PR-1 Familie, werden als Marker für Induzierte Resistenz in dikotylen und monokotylen Pflanzen beschrieben (WARD *et al.* 1991, UKNES *et al.* 1992, FRIEDRICH *et al.* 1996, LAWTON *et al.* 1996, KOGEL *et al.* 1994, MURADOV *et al.* 1993, MORRIS *et al.* 1998).

In Weizen wurden bis heute nur Vertreter der PR-1 Genfamilie beschrieben, welche durch Pathogen, nicht jedoch chemisch induzierbar sind (MOLINA *et al.* 1999). Zum Nachweis einer Beteiligung von PR-1 Proteinen bei der CIR in Weizen wurden neben den Genexpressionsstudien auch *Westernblot* Analysen durchgeführt. Aufgrund hoher Homologien in der stark konservierten Familie der PR-1 Proteine konnte die Immundetektion mit einem Antikörper (anti HvPR-1a) gegen basische PR-1 Proteine aus Gerste (HvPR-1a, HvPR-1b) durchgeführt werden.

Für die *Westernblot* Analysen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die ersten Blätter der einzelnen Versuchsvarianten geerntet und ein Gesamtproteinextrakt hergestellt. Je 2 µg der Proteine wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen geblotet und PR-1 Homologe mit einem spezifischen sowie einem Antikörper-Enzym-Konjugat über einen Chemilumineszenznachweis auf Röntgenfilmen dargestellt.

Die Ergebnisse der *Western* Analysen in Abb. 12 zeigen, daß mit dem Antikörper, der gegen Gersten PR-1 gerichtet ist, auch in Weizen PR-1 Homologe nachgewiesen werden konnten. Der Antikörper detektierte zwei nahezu gleich große Proteine (↑↑ in Abb.12), die gleichermaßen sowohl nach Pathogenbefall als auch nach einer BTH-Behandlung induziert wurden. WP-behandelte Kontrollpflanzen zeigten ab 6 dpt eine schwache Akkumulation von PR-1. Eine Inokulation der Kontrollpflanzen 4 dpt mit *Bgt* führte nach zwei weiteren Tagen (6-8 dpt) zu einer starken Anreicherung von PR-1. BTH-behandelte Pflanzen reagierten ab 4 dpt mit einer Akkumulation der Proteine, die in der Stärke der in inokulierten Pflanzen vergleichbar war. Bei BTH-behandelten Pflanzen, welche 4 dpt zusätzlich inokuliert wurden, stieg bereits am nächsten Tag die Menge an PR-1 im Vergleich zu den nur behandelten oder nur inokulierten Pflanzen deutlich an.

Für WCI-1, WCI-3 und LOX standen keine Antikörper für *Westernblots* zur Verfügung.



**Abb. 12: Vergleichende Kinetik der Akkumulation von PR-1 Proteinen in Weizen nach Applikation von BTH und zusätzlicher Inokulation 4 dpt (0 dpi) mit *Bgt*.** Als Kontrolle dienten Proteinextrakte, welche nur mit der Formulierung (WP) des Wirkstoffs behandelt waren. Es wurden jeweils 5 erste Blätter 14 Tage alter Weizenpflanzen mit BTH bzw. der Leerformulierung über eine Bodenapplikation (100 ppm, bezogen auf das Bodenvolumen) behandelt. Ein Teil der Pflanzen wurde 4 dpt (↓) mit *Bgt* mit einer Sporendichte von 5-20 Konidien pro mm<sup>2</sup> inokuliert. Ein Gesamtproteinextrakt wurde aus jeweils 5 ersten Blättern der verschiedenen Varianten zu den angegebenen Zeitpunkten nach Induktorbehandlung gewonnen. Nach elektrophoretischer Trennung und Immobilisierung der Proteine wurde die Immunodetektion mit einem pRHv-4 (PR-1a) Antikörper mittels Chemilumineszenz durchgeführt. Der Antikörper detektierte zwei nahezu gleich große Proteine, welche beide induziert wurden. Bei den verwendeten Bedingungen sind sie gerade noch als zwei überlappende Banden erkennbar (⇓, sichtbar bei "nur BTH").

### 3.5 *In situ* Hybridisierungen

Die *in situ* Hybridisierungen wurden dazu verwendet, die zeitlichen und gewebespezifischen Expressionsmuster bestimmter Gene zu dokumentieren. *In situ* wurde die Expression von *WCI-1*, *WCI-3*, einer LOX und von *PR-1* untersucht. Die gewebespezifische Lokalisation der mRNA dieser Gene sollte Hinweise auf eine mögliche Funktion der Genprodukte geben. So muß z. B. für Proteine, welche antifungale Wirkung haben, postuliert werden, daß sie einerseits frühzeitig und andererseits in engem Kontakt zur Infektionsstelle exprimiert werden.

Durch Expressionsstudien in *Northernblot* Analysen (vgl. Kap. 3.3) wurden Zeitpunkte für die *in situ* Hybridisierungen festgelegt. Es wurden frühe Zeitpunkte (12, 24, 36 und 48 hpt/hpi) gewählt, da es so möglich sein sollte gewebespezifische und zeitliche Unterschiede im ersten Auftreten von Transkripten festzustellen. Alle untersuchten Gene wurden, den *Northernblot* Analysen zufolge, in diesem Zeitraum nach den verschiedenen Behandlungen induziert.

Durch die *in situ* Hybridisierungen sollte unter anderem geklärt werden, ob unterschiedliche Applikationsarten von BTH (Bodenbehandlung, Sprühapplikation) einen Einfluß auf die Zeitpunkte der Genexpression haben und ob es bei unterschiedlichen Aufnahmewegen des Induktors zu gewebespezifischen Unterschieden im Expressionsprofil kommt.

Die meisten bis heute beschriebenen Anwendungen für *in situ* Hybridisierungen wurden in tierischen Systemen oder in Zellkulturen durchgeführt. Um eine geeignete Technik für *in situ* Hybridisierungen in pflanzlichen Geweben, insbesondere für Getreideblätter zu entwickeln und im Labor zu etablieren, wurden zwei verschiedene Methoden miteinander verglichen. Das Prinzip beider Methoden ist die Anlagerung und die anschließende Detektion markierter Nukleinsäuresonden an die komplementäre mRNA innerhalb von fixierten Gewebeschnitten auf Objektträgern. Die erste Methode basierte auf einer nicht radioaktiven DNA-RNA-Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden, welche über Antikörper und einen Proteinassay detektiert wurden. Bei der zweiten Methode wurden in einer RNA-RNA-Hybridisierung radioaktiv markierte Sonden eingesetzt, die durch Mikroautoradiographie mittels Röntgenfilmemulsion nachgewiesen werden konnten.

In den nicht radioaktiven *in situ* Hybridisierungen wurden zunächst nur Untersuchungen mit DIG- und Fluorescein-markierten Sonden von *PR-1* und *WCI-3* durchgeführt. Durch *in situ* Hybridisierungen mit radioaktiv-markierten Sonden wurden anschließend die zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster von *PR-1*, *WCI-1*, *WCI-3* und *LOX* nach unterschiedlichen Applikationsarten von BTH und Inokulation mit *Bgt* analysiert.

### 3.5.1 *In situ* DNA-RNA-Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

#### 3.5.1.1 Zelltypspezifischer Nachweis von *PR-1* in Weizenblättern

Die erste Methode, welche für den Nachweis von mRNA in Querschnitten von Weizenblättern verwendet wurde, wurde mit DIG-markierten DNA-Sonden durchgeführt. Der Nachweis der DNA-RNA Hybride erfolgte über Antikörper, welche gegen DIG gerichtet waren und mit einem Enzym konjugiert waren, welches eine Farbreaktion (NBT/BCIP zu Formazan) katalysierte (vgl. Kap. 2.8.6). Die ersten Blattgewebeschnitte BTH-behandelter (6 dpt) und teilweise inokulierter Pflanzen (6dpt/2dpi) wurden mit *HvPR-1b* Sonden hybridisiert. Es zeigte sich, daß nur in einzelnen Zellen der Epidermis mehltauinfizierter Pflanzen Formazan-Signale auftraten (s. Abb. 13A). Entgegen den Ergebnisse der *Northernblot* Analysen (vgl. Kap. 3.3.4) konnten in BTH-behandelten Pflanzen keine Transkripte detektiert werden (nicht gezeigt).

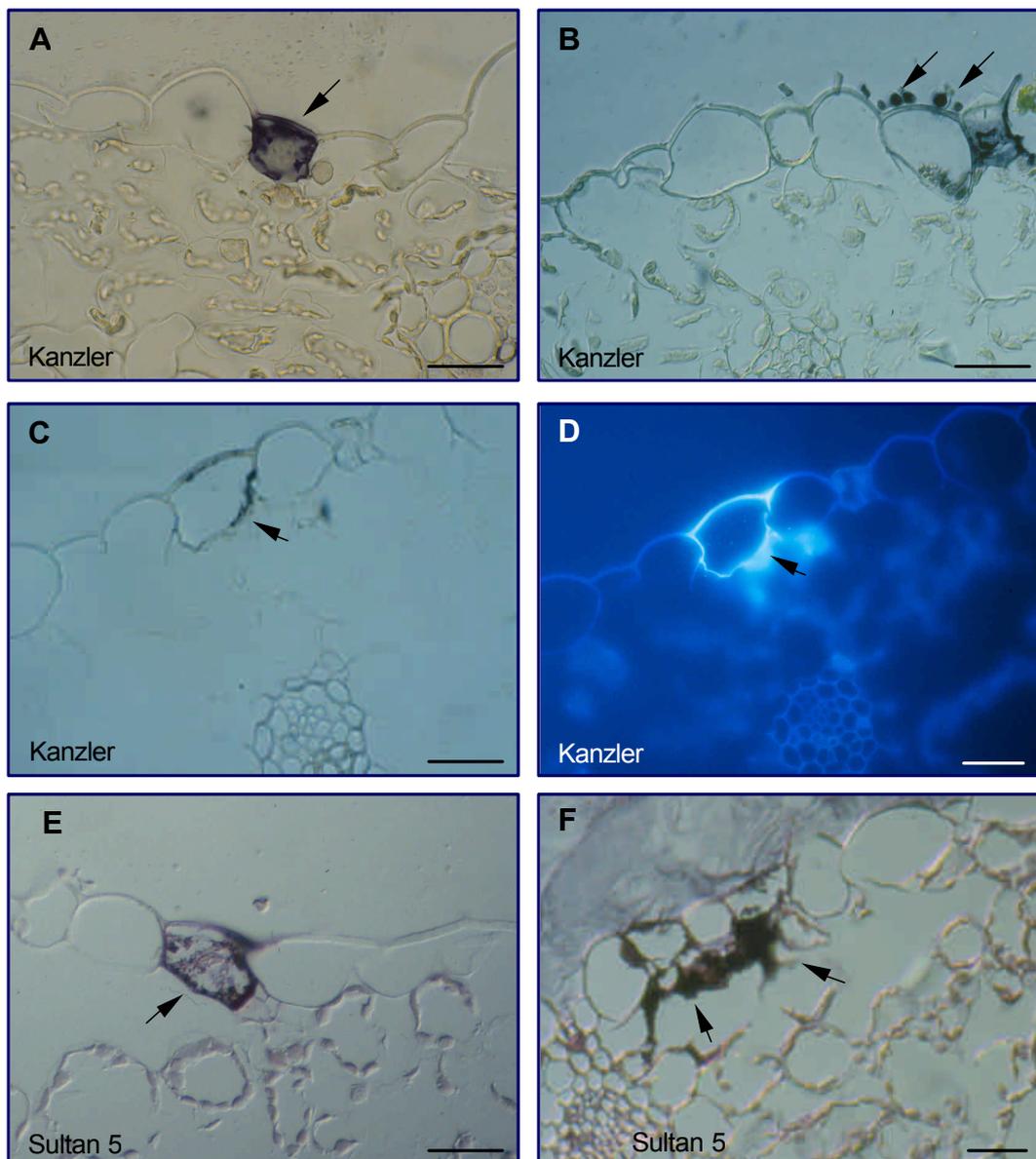
Für eine Verstärkung der Signale wurden weitere Versuche mit einem zweiten "Verstärker"-Antikörper durchgeführt (vgl. Kap. 2.8.6). Die Auswertung zeigte, daß auch hier nur in einzelnen Epidermiszellen inokulierter Blätter eine Formazanfärbung auftrat.

#### 3.5.1.2 Transkriptakkumulation in Epidermiszellen nach HR?

Die gefärbten Zellen fielen teilweise durch ihre ungewöhnliche Form auf. Sie waren oft abgeflacht und anscheinend ohne Turgor (s. Abb. 13C). Eine Betrachtung dieser Zellen unter UV Licht zeigte, daß alle eine Autofluoreszenz besaßen, wie sie für Hypersensitive Reaktionen typisch ist (s. Abb. 13D). Bei kurz entwickelten Schnitten und bei schwachen Signalen konnte die Fluoreszenz der Zellen dokumentiert werden, da ansonsten die Formazanfärbung die Autofluoreszenz der Zellen überlagerte. Oftmals wurden in direktem Kontakt zu Zellen mit Formazanfärbung Reste von Pilzhyphen gefunden (s. Abb. 13B).

#### 3.5.1.3 Herstellung kurzer Sonden für verbesserte Permeabilität in Gewebeschnitten

Um den Zugang der Sonden zu der komplementären mRNA während der Hybridisierung zu erleichtern und somit möglicherweise auch schwächere Akkumulationen von mRNA im Gewebe zu detektieren (mündliche Mitteilung, E. SCHMELZER, MPIZ, Köln), wurden kurze Sonden von *WCI-3* und *HvPR-1b* mit einer Länge von 120 - 180 bp hergestellt. Es zeigte sich jedoch, daß auch mit diesen Sonden nur Signale in kollabierten Epidermiszellen detektiert werden konnten (nicht gezeigt).



**Abb. 13: Nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierungen mit DIG-markierten *HvPR-1b*-DNA-Sonden in Blattquerschnitten von Weizen und Gerste 48 h nach Inokulation mit *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* bzw. *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*.** In A, B, C, D sind Querschnitte von *Bgt* inokulierten Blättern des Weizenkultivars Kanzler, in E und F welche des mit *Bgh* inokulierten Gerstenkultivars Sultan 5 dargestellt. Der gewebespezifische Nachweis erfolgte über anti-DIG-Antikörper, die mit einem Enzym gekoppelt waren, welche NBT/BCIP zu braun-violettem Formazan ( $\uparrow$ , A, B, C, E, F) umsetzen. **A:** Formazanfärbung in einer einzelnen Epidermiszelle. **B:** Hyphen von *Bgt* ( $\uparrow$ ) nahe bei einer Epidermiszelle mit Formazanfärbung. **C + D:** Die selbe Zelle im Durchlicht (C) und unter Fluoreszenzanregung (D) mikroskopiert. Bei schwachen Formazanfärbungen (C,  $\uparrow$ ) zeigte sich, daß die gefärbten Zellen eine HR ausgeprägt hatten, was an der Zellwandautofluoreszenz der toten Zellen erkennbar war. **E + F:** In Sultan 5 kam es nach Inokulation mit *Bgh* trotz der Gersten-spezifischen Sonde auch nur zu Signalen in Epidermis- (E) und Mesophyllzellen (F) mit HR. Es zeigte sich, daß alle Signale in HR-Zellen Artefakte waren. (Größenbalken = 50  $\mu$ m).

#### **3.5.1.4 Zeitpunkte vor dem Auftreten der HR**

Zellen, welche mit HR auf einen Pathogenbefall reagieren, können nur vor dem Eintreten des Zelltodes Transkripte bilden haben, die dann bei *in situ* Hybridisierungen nachgewiesen werden können. Um zu zeigen, daß *PR-1* Transkripte schon vor dem Eintreten der HR (beginnend ab ca. 20 hpi) vorhanden waren, wurden Proben 16, 18 und 20 hpi untersucht. In keiner der Gewebeschnitte konnten ein Formazan-Signal gefunden werden. Zellen mit HR wurden zu diesen Zeitpunkten nicht beobachtet.

#### **3.5.1.5 Kontrollen mit dem Gerstekultivar Sultan 5**

Sultan 5 ist ein Gerstenkultivar, welches das Resistenzgen *Mla-12* trägt und gegenüber der Mehltaurasse *Bgh A6* mit HR in Epidermis- und Mesophyllzellen reagiert. Da die *PR-1b* Sonde von Gerste abgeleitet war, sollte in Gerste einerseits die Spezifität der Sonde getestet werden und andererseits untersucht werden, ob *in situ* das gleiche Expressionsprofil wie in Weizen auftritt. Untersucht wurden inokulierte Pflanzen 2 dpi. Es zeigte sich, daß auch in Gerste nur in toten Zellen Signale auftraten. Dieses galt sowohl für Epidermiszellen (s. Abb. 13E), als auch für Mesophyllzellen (s. Abb. 13F).

#### **3.5.1.6 Nachweis unspezifischer Bindung von DNA-Sonden an HR-Zellen**

##### **3.5.1.6.1 Kontrollen mit *WCI-3* in Weizen und dem Gerstenkultivar Sultan 5**

*Northernblot* Analysen von RNA chemisch induzierter und inokulierter Pflanzen des Kultivars Sultan 5 zeigten, daß keine detektierbaren Homologe von *WCI-3* in Gerste vorkommen (nicht gezeigt). *WCI-3* Transkripte akkumulieren in Weizen nur nach chemischer Induktion, nicht aber nach Inokulation mit *Bgt* (vgl. Kap. 3.3.3). Die *in situ* Hybridisierungen mit kurzen sowie langen DIG-markierten Sonden von *WCI-3* in Gerste und Weizen ergaben, wie in den zuvor beschriebenen Versuchen, daß nur bei inokulierten Pflanzen in Zellen mit einer HR eine Formazanfärbung auftrat.

##### **3.5.1.6.2 Weitere Kontrollen**

Um auszuschließen, daß es sich bei den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierungen um methodische Fehler handelte, wurde eine Reihe von weiteren Kontrollexperimenten durchgeführt. Um möglicherweise schwächere Signale in anderen Geweben als toten Zellen zu erhalten, wurde die Entwicklungszeit der Farbreaktion bis zu 12 Tagen ausgedehnt und die Hybridisierungs- und Waschttemperaturen um 5°C herabgesetzt. Beides

hatte zur Folge, daß es auch in anderen Zellen zu einer Formazanfärbung kam, dieses jedoch gleichermaßen in inokulierten oder BTH-behandelten Blättern, wie auch in den nicht behandelten Kontrollen.

Für den Fall, daß einer der Antikörper unspezifisch an Strukturen in HR-Zellen bindet und dieses zu den falsch positiven Ergebnissen führte, oder eine andere Komponente der Hybridisierungsansätze einen negativen Einfluß ausübte, wurden weitere Kontrolllexperimente mit *PR-1*-Sonden an Sultan 5 und Kanzler durchgeführt, bei denen in verschiedenen Kombinationen einzelne Komponenten der Ansätze weggelassen wurden. Die Ergebnisse der einzelnen Kombinationen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Kontrolllexperimente der nicht radioaktiven *in situ* Hybridisierungen.**

Komponenten eines Hybridisierungsansatzes wurden einzeln oder in Kombination weggelassen (-). Erläuterungen: 1. AK: anti-DIG-FITC; 2. AK: anti-FITC-AP; 3. AK: anti-DIG-AP; Prähyb: Prähybridisierungslösung; GS5: Sultan 5 (Gerste); KA: Kanzler (Weizen); Signale: Formazanfärbung; Behandlungen wurden mit 100 ppm BTH (bezogen auf das Bodenvolumen) durchgeführt. Inokulationen wurden bei Weizen mit *Bgt* und bei Gerste mit *Bgh* durchgeführt.

Probe	Sonde	Prähyb.	1. AK	2. AK	3. AK	NBT/ BCIP	Signale in HR-Zellen
GS5 48 hpi	<i>HvPR-1b</i>	+	+	+	-	+	+
GS5 48 hpi	<i>HvPR-1b</i>	+	-	-	+	+	+
GS5 48 hpi	<i>HvPR-1b</i>	+	+	-	-	+	-
GS5 48 hpi	<i>HvPR-1b</i>	+	-	+	-	+	-
GS5 48 hpi	-	+	+	+	-	+	-
GS5 48 hpi	-	+	-	-	+	+	-
GS5 48 hpi	-	+	-	+	-	+	-
GS5 48 hpi	-	+	-	-	-	+	-
GS5 48 hpi	-	-	+	+	-	+	-
GS5 48 hpi	-	-	-	-	+	+	-
GS5 48 hpi	<i>HvPR-1b</i>	+	+	+	-	-	-
KA 5 dpt	<i>HvPR-1b</i>	+	+	+	-	+	-
KA 5 dpt	<i>HvPR-1b</i>	+	-	-	+	+	-
KA 6 dpt/2 dpi	<i>HvPR-1b</i>	+	+	+	-	+	+
KA 6 dpt/2 dpi	<i>HvPR-1b</i>	+	-	-	+	+	+
KA 5 dpt	-	+	+	+	-	+	-
KA 5 dpt	-	+	-	-	+	+	-
KA 6 dpt/2 dpi	-	+	+	+	-	+	-
KA 6 dpt/2 dpi	-	+	-	-	+	+	-

Die Ergebnisse der Kontrollexperimente zeigten, daß es nur bei einer vollständigen Zusammenstellung der einzelnen Komponenten zu Signalen in HR-Zellen inokulierter Pflanzen kam.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß bei *in situ* Hybridisierungen mit DIG-markierten Sonden vornehmlich Signale in totem Gewebe auftreten. Diese Methode wurde deshalb im Weiteren nicht angewendet. Statt dessen wurde mit radioaktiv markierten RNA-Sonden gearbeitet. Weitere Kontrollen, welche die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen mit DIG-markierten Sonden in Frage stellen, sind im folgenden Kapitel beschrieben.

### 3.5.2 Radioaktive *in situ* RNA-RNA-Hybridisierung

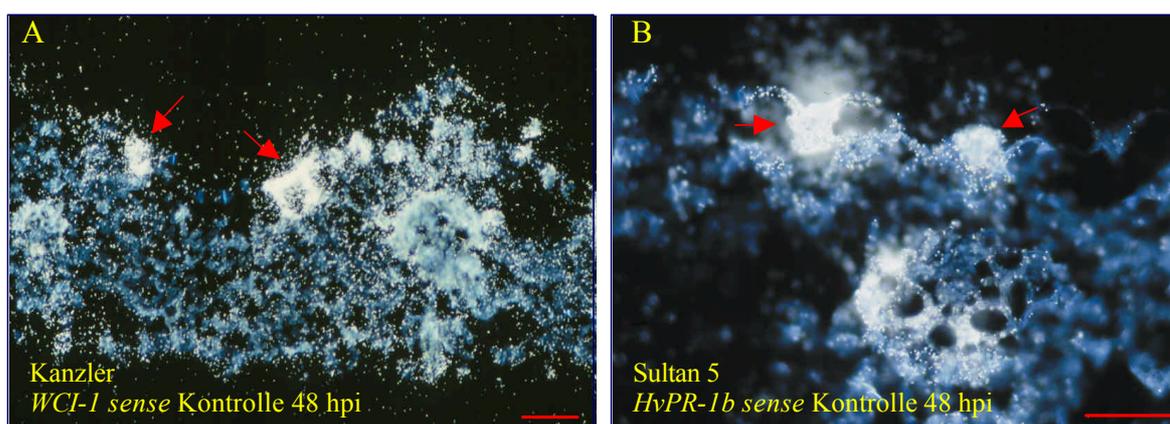
Aufgrund der unklaren Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen mit DIG-markierten Sonden wurden weitere Experimente mit radioaktiv markierten RNA-Sonden durchgeführt.

Die Zeitpunkte für die Probennahme wurden auf 12, 24, 36 und 48 h nach BTH-Behandlung bzw. Inokulation mit *Bgt* festgelegt. Innerhalb dieses Zeitraumes kam es, wie mit den *Northernblot* Analysen zuvor bestätigt (vgl. Kap. 3.3), bei allen vier untersuchten Genen in den unterschiedlichen Behandlungsvarianten zu einer Akkumulation der spezifischen mRNA. Die Zeitpunkte wurden relativ früh gewählt, um eventuelle Unterschiede in der Lokalisation der ersten Transkripte nach unterschiedlichen Applikationsarten des Induktors festzustellen. Für eine bessere Visualisierung der geschwärzten Silberkörner des Flüssigfilms auf den Dünnschnitten wurde eine Methode entwickelt, welche Auflichtfluoreszenz- mit Dunkelfeldmikroskopie kombiniert. Zellstrukturen waren so aufgrund ihrer Autofluoreszenz nach UV Anregung gut von den goldfarbenen Signalen der Silberkörner zu unterscheiden (s. Abb. 15 A-F). Abbildung 14 (A+B) dagegen zeigt Aufnahmen im Dunkelfeld ohne UV Anregung, bei denen sowohl die Signale als auch die pflanzlichen Strukturen weiß sind.

#### 3.5.2.1 Kontrollen mit *sense* Sonden

Da zur Herstellung der RNA-Sonden eine *in vitro* Transkription durchgeführt wurde, bot diese Methode die Möglichkeit, neben den zur mRNA komplementären Sonden auch *sense* Sonden in umgekehrter Orientierung herzustellen, welche als Negativkontrollen für unspezifische Hybridisierungen eingesetzt wurden.

Zur Überprüfung der Daten der nicht radioaktiven *in situ* Hybridisierungen wurden Dünnschnitte von inokulierten Weizen- sowie Gerstenblättern mit *sense* Sonden von *WCI-1* und *HvPR-1b* hybridisiert. Wie Abbildung 14 zeigt, kam es auch mit diesen Sonden zu Signalen in einzelnen HR-Zellen infizierter Pflanzen.



**Abb. 14:** Kontrolle experimente der *in situ* Hybridisierung mit radioaktiv markierten *sense* RNA-Sonden in Blattquerschnitten von Weizen (Kanzler; A) und Gerste (Sultan 5; B) 48 Stunden nach Inokulation mit *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* bzw. *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Für die Hybridisierung wurden [<sup>35</sup>S]-markierte *sense* RNA-Sonden als Kontrolle für unspezifische Bindungen der RNA an Gewebeschnitte eingesetzt. Der Nachweis erfolgte über Autoradiographie mittels einer Röntgenfilmemulsion. Die Lokalisation von gebundener RNA erfolgte über geschwärzte Silberkörner, welche bei der Dunkelfeldmikroskopie (ohne UV Anregung) als weiße Punkte dargestellt werden. **A:** Das Weizenkultivar Kanzler wurde mit einer *WCI-1 sense* RNA-Sonde hybridisiert. **B:** Das Gerstenkultivar Sultan 5 wurde mit einer *PR-1b sense* RNA-Sonde hybridisiert. In beiden Fällen (A+B) kommt es zu einer unspezifischen Anlagerung der *sense* Sonden an einzelne Epidermiszellen mit HR (↑). Durch diese Versuche konnte endgültig gezeigt werden, daß es sich bei den Ergebnissen der nicht radioaktiv durchgeführten *in situ* Hybridisierungen (vgl. Kap. 3.5.1) um Artefakte gehandelt hat. (Größenbalken = 50 µm).

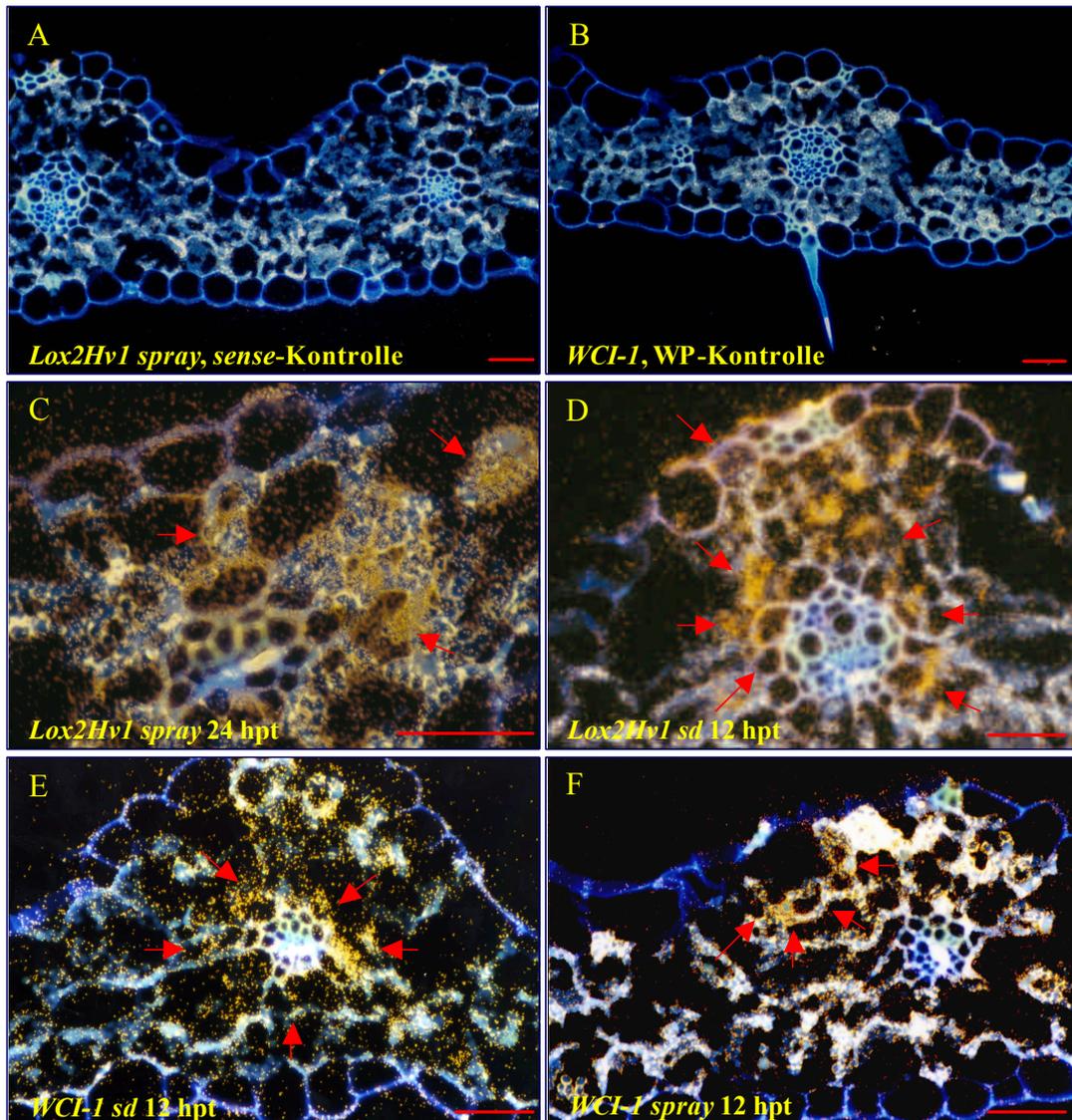
Mit den entsprechenden *antisense* Sonden wurden neben den Signalen in HR-Zellen auch in anderen Gewebeteilen differenzielle Transkriptakkumulationen nachgewiesen. Diese sind im Folgenden für jedes getestete Transkript getrennt beschrieben. Zu den untersuchten Genen wurden ebenfalls Kontrollen mit *sense* Sonden durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß es bei BTH-behandelten Pflanzen zu keinen weiteren unspezifischen Bindungen der RNA-Sonden kam (s. Abb. 15 A, als exemplarisches Beispiel).

### 3.5.2.2 Gewebespezifischer Nachweis der *LOX*

Bereits 12 Stunden nach einer Bodenbehandlung von Weizen mit BTH konnten erste Transkripte der Lipoxygenase in Dünnschnitten der Blätter nachgewiesen werden. Diese traten lokal begrenzt um alle Leitbündel, insbesondere in den parenchymatösen Leitbündelscheidenzellen sowie den umgebenen Mesophyllzellen auf. Die Mesophyllzellen auf der adaxialen Seite des Blattes zeigten meist eine stärkere Akkumulation von Transkripten als die der abaxialen Seite (s. Abb. 15D). Teilweise wurde in der Nähe starker Transkriptakkumulationen des Mesophylls auch in G-Zellen (vgl. Kap. 3.2) der Epidermis mRNA detektiert. Nach einer Sprühbehandlung konnten wie auch in den *Northernblot* Analysen erste Transkripte nach 24 h nachgewiesen werden. Diese befanden sich an den gleichen Stellen wie nach einer Bodenapplikation des Induktors, also ebenfalls in der Nähe der Leitbündel (s. Abb. 15C). Selbst nach 48 h war in beiden Behandlungsvarianten kein Unterschied in den Expressionsprofilen festzustellen. Die Transkription der Lipoxygenase blieb auf einen engen Raum um die Leitbündel herum beschränkt (s. Abb. 16B). In Gewebeschnitten von Pflanzen, welche mit *Bgt* inokuliert oder mit WP behandelt waren, konnten keine spezifischen Transkripte detektiert werden (nicht gezeigt).

### 3.5.2.3 Gewebespezifischer Nachweis von *WCI-1*

Für *WCI-1* konnten Unterschiede in der Lokalisation der Transkripte nach verschiedener Applikation des Induktors nachgewiesen werden. Nach einer Bodenbehandlung der Pflanzen kam es ab 12 hpt zu einer verstärkten Anreicherung der *WCI-1* mRNA in Mesophyllzellen um die Leitbündel herum. Hier zeigte vor allem der Bereich um die kleineren Leitbündel Signale (s. Abb. 15E). Nach einer Applikation des Induktors über die Blätter kam es zuerst in Mesophyllzellen, welche an die Atemhöhlen unterhalb der Stomata angrenzen, zu einer Transkriptakkumulation (s. Abb. 15F). Im weiteren Verlauf der Versuche bis 48 hpt konnten dann bei beiden Behandlungsarten im gesamten Mesophyll Transkripte nachgewiesen werden. Die Signale um die kleineren Leitbündel waren meist stärker als im restlichen Mesophyll (s. Abb. 16C). Nach Inokulation der Weizenblätter mit Mehltau (nicht gezeigt) oder nach WP-Behandlung (s. Abb. 15 B) konnten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Transkripte von *WCI-1* detektiert werden.



**Abb. 15: In situ Hybridisierungen mit radioaktiv markierten RNA-Sonden von *WCI-1* und *LOX* in Weizen 12 h bzw. 24 h nach Behandlung mit BTH.** Die Bilder A–F zeigen Blattquerschnitte des Kultivars Kanzler, die jeweils mit der im Bild links unten angegebenen Sonde hybridisiert worden waren. Der gewebespezifische Nachweis der Transkripte erfolgte nach der Hybridisierung mit [<sup>35</sup>S]-markierten RNA-Sonden über Autoradiografie mittels einer Röntgenfilmemulsion. Die Aufnahmen entstanden durch Kombination von Dunkelfeldmikroskopie mit zusätzlicher UV Anregung. Transkriptakkumulationen sind an den goldgelben Punkten zu erkennen. **A:** Exemplarisches Beispiel einer *sense* Kontrolle von BTH-behandelten Pflanzen. Zur Überprüfung von unspezifischen Bindungen der RNA-Sonden an die Gewebeschnitte wurden *sense* Transkripte (in diesem Beispiel von *LOX2Hv1*) für die Hybridisierung eingesetzt. Bei allen untersuchten Genen (*WCI-1*, *WCI-3*, *LOX*, *PR-1*) kam es in BTH-behandelten Proben zu keinen unspezifischen Anlagerungen der *sense* RNA-Sonden. **B:** Exemplarische Darstellung einer Kontrolle (48 hpt), welche mit der Leerformulierung (WP) von BTH behandelt worden war. Die Hybridisierung erfolgte mit der *antisense* Sonde von *WCI-1*. **C+D:** Nachweis spezifischer Transkripte von *LOX2Hv1* Homologen in parenchymatösen Leitbündelscheidezellen und dem umgebenden Mesophyll (↑) 12 h nach einer Bodenapplikation (*sd*, *soil drench*, D) bzw. 24 h nach einer Sprühbehandlung (*spray*) der Blätter (C) mit BTH. **E+F:** Nachweis spezifischer Transkripte von *WCI-1* 12 hpt. Die Bodenapplikation von BTH (*sd*) führte 12 hpt zu ersten Akkumulationen der Transkripte (↑) in Mesophyllzellen, welche an die Leitbündel angrenzen (E). Eine Sprühbehandlung der Blätter (*spray*) hingegen führte zu ersten Akkumulationen (↑) in Mesophyllzellen, welche die Atemhöhlen unterhalb der Stomata umgeben (F). (Größenbalken = 50 µm).

### 3.5.2.4 Gewebespezifischer Nachweis von *WCI-3*

Eine Behandlung des Weizen mit BTH führte ab 36 hpt zu einem sichtbaren Anstieg der Transkripte von *WCI-3* im gesamten Mesophyll. Zwischen den beiden Applikationsarten konnten keine Unterschiede in Zeitpunkt oder Ort der Transkriptakkumulation festgestellt werden. 48 hpt waren die Signale am stärksten und die Transkripte gleichmäßig über das Mesophyll verteilt (s. Abb. 16D). Epidermiszellen zeigten keine Akkumulation von *WCI-3* mRNA. In inokulierten oder WP-behandelten Pflanzen konnten keine Transkripte von *WCI-3* festgestellt werden (nicht gezeigt).

### 3.5.2.5 Gewebespezifischer Nachweis von *PR-1*

Eine Inokulation der Pflanzen mit *Bgt* führte ab 24 hpi zu einem Auftreten von *PR-1* Transkripten in Mesophyll-, parenchymatösen Leitbündelscheide- und Epidermiszellen. In den Epidermiszellen beschränkten sich die Signale meist auf einen schmalen Saum in direktem Kontakt zur Zellwand. Bis 48 hpi stieg die Menge an Transkripten in den genannten Zelltypen weiter an (s. Abb. 16E). Eine Behandlung des Weizens mit BTH führte nach beiden Behandlungsvariationen in den gleichen Zellen wie auch nach Inokulation zu einer Induktion von *PR-1* (nicht gezeigt). Nach Applikation des Induktors über den Boden konnten im Gegensatz zu den *Northernblot* Analysen 24 hpi erste Transkripte nachgewiesen werden. Die Blattapplikation bewirkte eine schwächere und spätere Expression von *PR-1*. Hier konnten erst 36 hpi deutliche Anreicherungen der mRNA detektiert werden. Unterschiede in der Lokalisation des ersten Auftretens der Transkripte konnten bei keiner der Behandlungsarten festgestellt werden. In WP- oder unbehandelten Kontrollpflanzen kam es in den gleichen Zelltypen vereinzelt zu einer schwachen Anreicherung von *PR-1* Transkripten (nicht gezeigt).

**Abb. 16: *In situ* Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden.** Die Bilder A – E zeigen Querschnitte von Weizenblättern des Kultivars Kanzler, welche mit der im Bild rechts unten angegebenen Sonde hybridisiert wurden. Der gewebespezifische Nachweis der Transkripte erfolgte nach der Hybridisierung mit [<sup>35</sup>S]-markierten RNA-Sonden über Autoradiografie mittels Röntgenfilmemulsion. Die goldgelben Punkte zeigen die Lokalisation der Transkripte an. 48 hpt gab es bei keinem der untersuchten Gene Unterschiede in der Lokalisation der Transkripte zwischen einer Bodenapplikation und einer Srühbehandlung mit BTH. **A:** WP-behandelte Kontrolle ohne Transkriptakkumulation. **B:** Nachweis der *LOX* Transkripte in Leitbündelscheidezellen und dem umgebenden Mesophyll. **C:** Nachweis von *WCI-1* Transkripten im gesamten Mesophyll. **D:** Nachweis von *WCI-3* Transkripten im gesamten Mesophyll. **E:** Nachweis von *PR-1* Transkripten im Mesophyll und der Epidermis nach Inokulation (48 hpi) mit *Bgt*. Eine BTH-Behandlung bewirkete *PR-1* Transkriptakkumulationen in den gleichen Zellen wie nach Inokulation (nicht gezeigt). (Größenbalken = 200 µm). siehe folgende Seite >

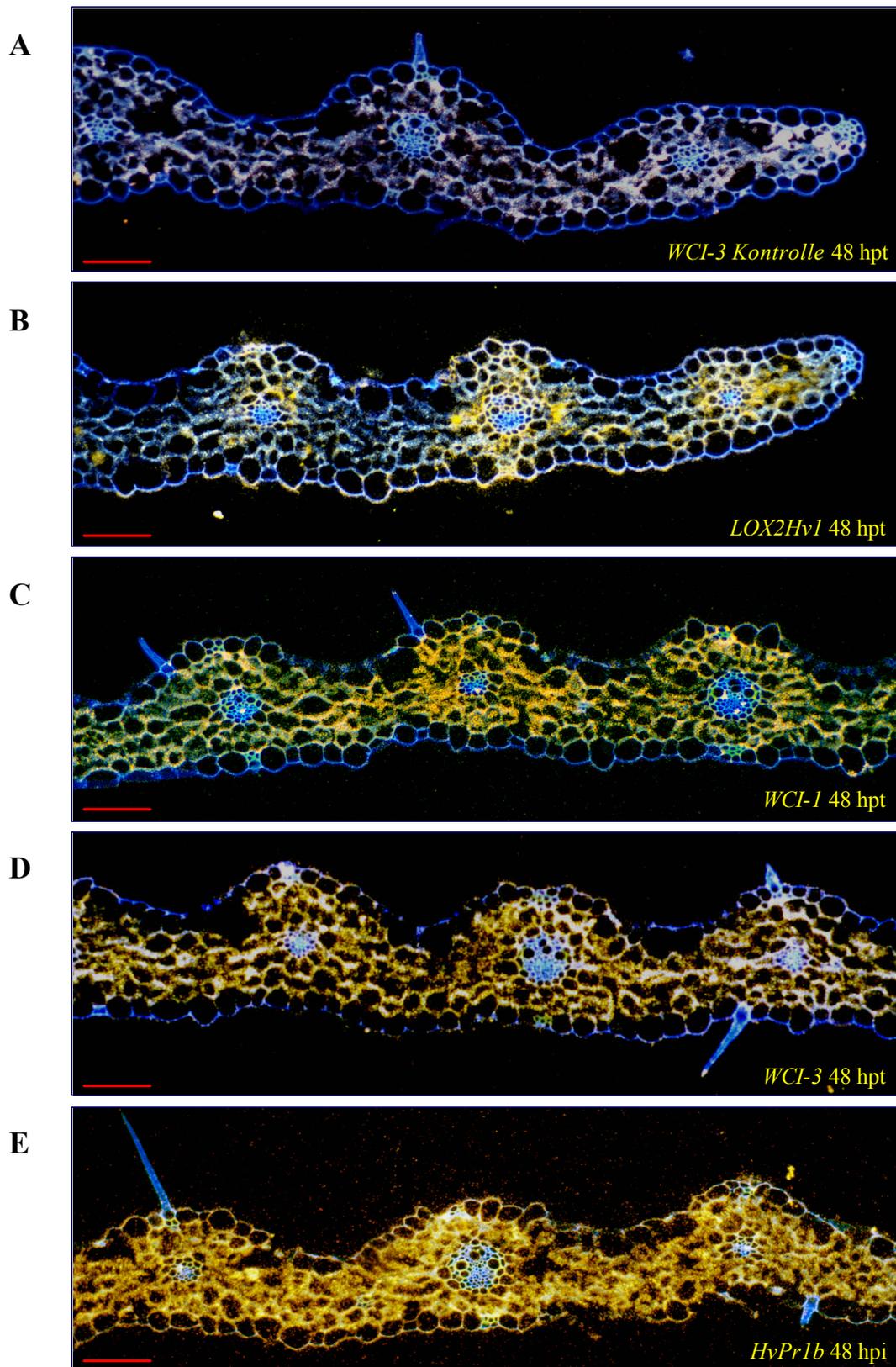


Abb. 15: *In situ* Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Induzierte Resistenz in Getreide

Im Gegensatz zu zahlreichen, gut dokumentierten Untersuchungen in dikotylen Pflanzen gibt es derzeit nur wenige Studien, die das Phänomen der IR in monokotylen Pflanzen beschreiben. Die vorliegende Arbeit trägt dazu bei, die Mechanismen, welche der IR in Getreide zugrunde liegen, besser zu verstehen.

In dikotylen Pflanzen bewirkt eine biologische wie auch chemische Induktion der Resistenz einen breiten Schutz gegen verschiedene Pathogene wie Viren, Bakterien und Pilze (VAN LOON 1999). Es zeigte sich, daß die Induktion der Resistenz durch Pathogene abhängig von der Akkumulation von SA ist, wobei jedoch ausgeschlossen werden konnte, daß sie auch das systemisch translozierte Signal ist. Eine chemische Induktion der Resistenz durch sogenannte Resistenzinduktoren führt in dikotylen Pflanzen zur Expression der gleichen Gene wie auch nach Inokulation mit Pathogenen (FRIEDRICH *et al.* 1996). Mit *NahG*-Pflanzen, welche nicht mehr in der Lage sind, SA zu akkumulieren und *nimI*-Mutanten (*non inducible immunity*), welche nicht mehr biologisch (SAR) oder chemisch (CIR) induzierbar sind, konnte gezeigt werden, daß Resistenzinduktoren als Funktionsanaloga der SA wirken und an der gleichen Stelle oder kurz hinter SA in den Signaltransduktionsweg der SAR eingreifen (LAWTON *et al.* 1996, KESSMANN *et al.* 1996, RYALS *et al.* 1996).

Die Ergebnisse, welche die Erforschung des SAR-Phänomens in dikotylen Pflanzen ergeben haben, sind jedoch nicht einfach auf Getreide zu übertragen. Durch Pathogene induzierte Resistenz konnte bei der Gerste (CHO und SMEDEGAARD-PETERSEN 1986, OUCHI *et al.* 1976, ROMMÉ 1997), beim Weizen (SCHWEIZER *et al.* 1989) und beim Reis (HORINO 1976, LANGCAKE und WICKENS 1975, WANTANABE *et al.* 1979) nachgewiesen werden. Der Schutz der Pflanze war hierbei jedoch nicht systemisch, sondern blieb lokal auf die behandelten Blätter beschränkt. Für die IR in Reis gegenüber *Pyricularia oryzae* (SMITH und MÉTRAUX 1991) und Gerste gegenüber *Blumeria graminis* (HWANG und HEITEFUSS 1982, NIEMANN 1993) liegen zwar Berichte über systemische Effekte vor, doch konnten diese Beobachtungen in anderen Laboratorien oftmals nicht bestätigt werden (DUDLER 1997). Weiterhin gibt es Untersuchungen, welche die lokal induzierte Resistenz

zwar bestätigen, aber keine Hinweise auf einen systemischen Schutz der Pflanze erkennen lassen (Beßer 2001). Teilweise kommt es sogar dazu, daß eine Erstinokulation mit einem virulenten Pathogen genau das Gegenteil bewirkt und zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber eigentlich apathogenen Organismen führt, was dann als induzierte Zugänglichkeit bezeichnet wird. So kann die Inokulation von Gerste oder Hafer mit einer virulenten Mehltaurasse die infizierten Blätter gegenüber einer späteren Inokulation mit einer ansonsten avirulenten Mehltaurasse anfällig machen (CARVER *et al.* 1999, KOMURA *et al.* 1990, OUCHI *et al.* 1974).

Ein weiterer Punkt, welcher deutlich auf die Unterschiede zwischen dikotylen und monokotylen Pflanzen in Bezug auf IR hinweist, spiegelt sich in der Rolle der SA nach einem Pathogenbefall wider. In Dikotylen kommt es nach einem Pathogenbefall häufig zu einer Akkumulation der SA, welche für die Expression von PR-Genen und die Ausprägung der pathogenabhängigen Form der SAR notwendig ist (RYALS 1996, STICHER *et al.* 1997). In Gerste hingegen kommt es nach einer Inokulation mit *Bgh* oder *Bgt* nicht zu einer Akkumulation von SA, was jedoch keinen Einfluß auf die Expression von PR-Genen hat (HÜCKELHOVEN *et al.* 1999, VALLÉLIAN-BINDSCHELDER *et al.* 1998).

Trotz dieser so unterschiedlichen Ergebnisse, welche die biologische Induktion der Resistenz betreffen, kann durch die gleichen Resistenzinduktoren (SA, DCSA, DCINA, BTH), die auch in Dikotylen wirksam sind, ein systemisch wirkender Schutz in Getreide erzielt werden. CIR konnte unter anderem in Gerste gegen *Bgh* (KOGEL *et al.* 1994, BECKHOVE 1995 unveröffentlicht), in Weizen gegen *Bgt*, *Puccinia recondita* und *Septoria nodorum* (GÖRLACH *et al.* 1996), in Reis gegen *Magnaporthe grisea* (SCHWEIZER *et al.* 1997) und in Mais gegen *Peronosclerospora sorghi* (MORRIS *et al.* 1998) nachgewiesen werden. Es ergab sich jedoch, daß neben einem Teil der klassischen PR-Proteine auch ein Satz an Genen exprimiert wird, welcher ganz spezifisch für die CIR in Getreide ist. In Weizen (GÖRLACH *et al.* 1996), wie auch Gerste (BEßER *et al.* 2000), konnten Gene (*WCI*-Gene, *wheat chemically induced*; *BCI*-Gene, *barley chemically induced*) identifiziert werden, die nur nach chemischer Induktion, nicht jedoch nach Pathogenbefall induziert werden. Umgekehrt wurden in Weizen *WIR*-Gene (*wheat induced resistance*) identifiziert, welche nach Inokulation mit dem HR-auslösenden und lokal Resistenz induzierenden Nich-Wirt-Pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* akkumulieren, nicht jedoch nach Behandlung mit Resistenzinduktoren (SCHWEIZER *et al.* 1989, SCHAFFRATH *et al.* 1997).

## 4.2 Wirkung des Resistenzinduktors BTH in Weizen gegen *Bgt*

Um die Wirkung von Resistenzinduktoren zeigen zu können, steht an erster Stelle die Überprüfung der Befallsreduktion nach einer Behandlung mit der Substanz im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. In der vorliegenden Arbeit wurde die resistenzinduzierende Wirkung von BTH anhand des Pathosystems Weizen-Echter Weizenmehltau untersucht. Bonituren des Mehлтаubefalls auf den unteren drei Blattetagen nach einer BTH-Behandlung ergaben eine Reduktion des Befalls von 30-70 %. Dies entspricht den in der Literatur genannten Zahlen, welche für BTH und auch für andere gut wirkende Resistenzinduktoren (DCSA, DCINA) in Getreide angegeben werden (KOGEL *et al.* 1994, BECKHOVE 1995 unveröffentlicht, GÖRLACH *et al.* 1996, SCHWEIZER *et al.* 1997, MORRIS *et al.* 1998). Ein Nachteil von vielen Resistenzinduktoren ist, daß die Spanne zwischen resistenzinduzierender Wirkung und phytotoxischen Effekten oftmals sehr gering ist. In den Versuchen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei der Anwendung von BTH an Weizen diese Spanne ziemlich breit ist. Selbst bei einer Bodenbehandlung, mit einer Aufwandmenge von 4000 ppm (bezogen auf das Bodenvolumen), zeigten sich keine toxischen Effekte an den Pflanzen. Für eine Induktion der Resistenz war eine Menge von 100 ppm jedoch völlig ausreichend. Die geringe Phytotoxizität von BTH war mit ein Grund, warum die Genehmigung für die Anwendung als Pflanzenstärkungsmittel im Anbau von Weizen, Reis, Bananen, Gemüse und Tabak erteilt wurde (ROBERTS und HUTSON 1999). Im Gegensatz zu Weizen scheint Gerste jedoch empfindlicher gegenüber BTH zu sein, da es hier nach einer Behandlung mit BTH häufiger zu Vergilbungen an den Blattspitzen kommt (persönliche Mitteilungen AG Kogel).

## 4.3 Cytologische Untersuchungen der chemisch induzierten Abwehrmechanismen von Weizen gegen *Bgt*

Im Gegensatz zu der gut charakterisierten Gerste gibt es derzeit wenige Untersuchungen, welche die Abwehrmechanismen des Weizen gegenüber dem Echten Weizenmehltau beschreiben. KOGEL *et al.* (1994) konnten zeigen, daß die CIR in Gerste eine Phänokopie der durch das Resistenzgen *Mlg*-vermittelten Abwehr darstellt. Die Abwehrmechanismen der Gerste, welche nach chemischer Resistenzinduktion mit DCINA den Pilz in seiner Entwicklung inhibieren, sind eine vermehrte Bildung effektiver Papillen sowie das

zusätzliche Auftreten einer HR. Das die HR bei der Resistenzgen-vermittelten Abwehr in Weizen von großer Bedeutung ist, schlossen schon HYDE und COLHOUN (1975) aus ihren eigenen und anderen Studien. Sie ordneten verschiedenen Resistenzgenen, bei Inokulation der Pflanzen mit den entsprechenden avirulenten Mehltaurassen, eine Reihe von Abwehrmechanismen zu. Das Hauptkriterium war hierbei das Auftreten von HR zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Interaktionen in Epidermis- und Mesophyllzellen. Weizenpflanzen mit dem Resistenzgen *Pm2* zeigen ähnlich wie *Mla<sub>12</sub>*-tragende Gerste (SCHIFFER 1998, HÜCKELHOVEN 1999) eine HR in penetrierten Epidermiszellen bzw. den Mesophyllzellen unterhalb einer befallenen Zelle, wobei hier der Pilz schon in der Lage war, deutliche sekundäre Hyphen (ESH) zu bilden. Das Resistenzgen *Pm4* bewirkt, ähnlich wie *Mlg* (und auch DCINA) in Gerste (KOGEL *et al.* 1995, GÖRG *et al.* 1993), ein frühes Abstoppen des Pilzes bevor es zur Bildung von ESH kommt. Ob die Mechanismen, welche der *Pm4*- und der *Mlg*-vermittelten Resistenz wirklich gleich sind, kann hier nicht abschließend beantwortet werden, da bei HYDE und COLHOUN (1975) nicht ersichtlich wird, ob die Zellen vor dem Eintreten der HR penetriert werden oder nicht. Da sie nie einen Ansatz von ESH oder Reste von Haustorien beobachten konnten, ist zu vermuten, daß, wie auch bei *Mlg* in Gerste, der Pilz zuvor durch eine effektive Papille gestoppt wurde. Die Autoren gehen jedoch davon aus, daß die Zellen penetriert wurden und die Haustorien verkümmert sind. Die Bildung von Papillen ist in Weizen zwar bekannt, wird von HYDE und COLHOUN (1975) jedoch als nicht-spezifischer Resistenzmechanismus eingestuft und nicht weiter verfolgt. Eine reine Penetrationsresistenz, wie in Gerste, die das rezessive Resistenzgen *mlo* (JØRGENSEN 1992, BÜSCHGES *et al.* 1997) trägt, welches einen Schutz gegen alle bisher bekannten Isolate des Echten Gerstenmehltaus (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) vermittelt, wurde in Weizen bisher nicht beschrieben. Möglicherweise liegt dies an der Hexaploidie des Weizens, die einen züchterischen Ansatz zur Entdeckung eines vergleichbaren, rezessiv wirkenden Gens deutlich erschwert.

Aufgrund der Untersuchungen, die über die CIR in Gerste durchgeführt wurden und den beschriebenen Resistenzgen-vermittelten Abwehrmechanismen des Weizens, wurden in den hier vorliegenden, cytologischen Untersuchungen zur Wirkungsweise von BTH in Weizen die Bildung effektiver Papillen und das Auftreten von HR mit oder ohne vorherige Penetration der Zellen als Hauptkriterien für eine erfolgreiche Abwehr des Pilzes herangezogen. Außerdem wurde bei der Auswertung eine Unterscheidung zwischen langen

und kurzen Zellen nach KOGA *et al.* (1990; s. Abb. 7) vorgenommen, da von Gerste bekannt ist, daß lange Epidermiszellen, welche über den Leitbündeln liegen, eine stark erhöhte Penetrationsresistenz zeigen und sehr selten mit HR reagieren. In den cytologischen Versuchen zur CIR (s. Abb. 7) zeigte sich, daß dies ebenfalls für Weizen zutrifft. In unbehandelten, anfälligen Kontrollpflanzen wurden in langen Zellen über 80 % der Pilze durch eine effektive Papille in ihrer Entwicklung gestoppt und lediglich 5 % der befallenen Zellen zeigten zusätzlich eine HR. Nach einer Behandlung der Pflanzen mit BTH wurden weitere 10 % der Pilze durch effektive Papillen an der Penetration der Zellen gehindert. Dabei blieb die Anzahl der Zellen mit HR sehr gering. Die eigentlichen Mechanismen, welche für die deutliche Reduktion des Mehлтаubefalls nach chemischer Resistenzinduktion führen, laufen jedoch auf den kurzen Epidermiszellen ab, da diese weitaus anfälliger sind als lange Zellen. In unbehandelten Pflanzen wurden auf kurzen Zellen zwar ebenfalls über 50 % der Pilze durch effektive Papillen und weitere 10 % mit zusätzlicher HR gestoppt, doch nach einer Behandlung mit dem Resistenzinduktor verringerte sich die Anzahl der Pilze, die erfolgreich penetrieren konnten, um bis zu 70 %. Dies lag einerseits in der Zunahme an effektiven Papillen, andererseits auch an einer vermehrten Anzahl an Zellen, die zusätzlich mit einer HR auf den Pathogenbefall reagiert haben. Die Zahl an Zellen, welche penetriert worden waren und anschließend mit einer HR auf den Pathogenbefall reagierten, spielte sowohl bei kurzen wie auch langen Zellen keine Rolle bei der Ausprägung der CIR, da ihr Anteil in behandelten wie auch unbehandelten Pflanzen bei 1 % lag. Es ist zu vermuten, daß die Bildung von Papillen der ausschlaggebende Mechanismus ist, welcher für die CIR charakteristisch ist, da es einerseits zu einer Steigerung der Anzahl effektiver Papillen kam und andererseits die Zellen, welche eine HR zeigten, vorher nicht penetriert worden waren.

Eigene Untersuchungen an Gerste (LANGEN, BECKHOVE, KOGEL in Vorbereitung), die eine Mutation in dem Gen *Ror1* (*required for mlo* *resistance*), welches in der *mlo*-vermittelten Resistenz eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung der Resistenzantwort hat (FREIALDENHOVEN 1996), zeigten, daß der HR bei der CIR trotzdem eine entscheidende Rolle in der Pathogenabwehr zukommt. Gerstenpflanzen (*Mlo ror1*), welche die dominante Form des rezessiv wirkenden Resistenzgens *mlo* tragen und eine Mutation in *Ror1* haben, zeigten eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Mehлтаubefall. Cytologische Analysen der Interaktionen zeigten, daß die Bildung von effektiven Papillen fast völlig unterdrückt

wurde. Selbst lange Zellen, welche normalerweise eine starke Penetrationsresistenz haben, hatten eine Anfälligkeit von über 90 %. Der Schluß hieraus ist, daß *Ror1* ein entscheidender Faktor der Papillenbildung ist. Trotz alledem kam es nach einer Behandlung der *Mlo/ror1* Pflanzen mit DCINA und BTH zu einer deutlichen Verringerung des Mehltaubefalls. In langen Zellen, welche in nur sehr geringen Maßen eine HR zeigten, kam es nicht zu einer relevanten Verringerung des Befalls. Kurze Zellen hingegen konnten das Ausbleiben der Bildung effektiver Papillen durch eine schnell einsetzende HR kompensieren. Dies zeigt, daß der Mechanismus, welcher der CIR zugrunde liegt, wenigstens zwei unabhängige Elemente beinhaltet. Das eine ist die Bildung effektiver Papillen, das andere das frühe Abstoppen des Pathogens durch eine HR. Da beide Resistenzantworten auch in suszeptiblen Interaktionen ausgeprägt werden, kann davon ausgegangen werden, daß die CIR eine Steigerung der natürlich vorhandenen, basalen Resistenz gegenüber dem Pathogen ist.

#### **4.4 Die Bedeutung verschiedener chemisch und/oder Pathogen induzierbarer Gene in Weizen**

Die Applikation von Resistenzinduktoren in Getreide führt neben der Transkriptakkumulation von bekannten PR-Proteinen auch zu einer Anreicherung von Transkripten, welche sehr spezifisch für die chemische Induktion der Resistenz sind. GÖRLACH *et al.* (1996) identifizierten in Weizen nach einer Behandlung mit BTH fünf *WCI*-Gene (*wheat chemically induced genes*). Deren Bedeutung für die CIR blieb jedoch ungeklärt. Anhand ausgewählter *WCI*-Gene, einer ebenfalls chemisch induzierten Lipoxygenase und einem chemisch- und Pathogen-induzierten PR-Protein der PR-1-Familie wurden hier in detaillierten biochemischen und molekularbiologischen Analysen Hinweise darüber gewonnen, die dazu beitragen, die Funktion dieser Gene bzw. Proteine bei der CIR aufzuklären. Mit *Northernblot* Analysen wurde in Zeitkinetiken die Akkumulation der Transkripte nach Induktorbehandlung mit unterschiedlichen Applikationsmethoden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollpflanzen und mit *Bgt* inokulierten Pflanzen dargestellt. Eine *Bgt*-Inokulation von BTH-behandelten und Kontrollpflanzen gab Aufschluß darüber, ob eine vorangegangene Induktion der Resistenz zu *enhancement*- oder *priming*-Effekten bezüglich der untersuchten Gene führt. Gleiches galt auch für die *Western* Analysen, bei denen allerdings nur für das PR-Protein ein entsprechender

Antikörper zur Verfügung stand. *In situ* Hybridisierungen zu frühen Zeitpunkten nach Induktorgabe gaben Aufschluß darüber, ob ein Genprodukt aufgrund der gewebespezifischen Lokalisation seiner Transkripte direkt an der Pathogenabwehr beteiligt sein kann oder möglicherweise Aufgaben in der Signaltransduktion erfüllt.

Für einen besseren Überblick über die im weiteren diskutierten Ergebnisse sind in Tabelle 2 die Zeitpunkte und die Lokalisation erster Transkriptakkumulationen bei *in situ* Hybridisierungen und *Northern* Analysen dargestellt.

**Tabelle 2: Zusammenfassung der Expressionsprofile nach den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierungen und den *Northern* Analysen.**

Gen	Ähnlichkeiten und mögliche Funktion	gewebespezifische Expression				Northern Analyse		Applikation von BTH
		Epidermis		Mesophyll		BTH hpt	Bgt hpi	
		BTH hpt	Bgt hpi	BTH hpt	Bgt hpi			
<b>LOX</b>	<i>LOX2Hv1</i>	- (12) <sup>a)</sup>	-	12 <sup>b)</sup>	-	12 <sup>b)</sup>	(24)	<i>sd</i>
	Lipoxidation Signalmoleküle	- (24) <sup>a)</sup>	-	24 <sup>b)</sup>	-	24 <sup>b)</sup>		<i>ls</i>
<b>PR-1</b>	<i>HvPR1b</i>	24	24	24	24	36	24	<i>sd</i>
	PR-Protein antifungal	36		36		36		<i>ls</i>
<b>WCI-1</b>	Reis-Stressgen Fkt. unbekannt	-	-	12 <sup>c)</sup>	-	24	-	<i>sd</i>
		-		12 <sup>d)</sup>		24		<i>ls</i>
<b>WCI-3</b>	Thionin-ähnliches Protein	-	-	36	-	(24) <sup>e)</sup>	-	<i>sd</i>
	Pathogenabwehr	-		36		(12) <sup>d)</sup>		<i>ls</i>

- a) in einigen C-Zellen der Epidermis bei starken Transkriptakkumulationen im Mesophyll  
b) nur in parenchymatösen Leitbündelscheidezellen und dem direkt angrenzenden Mesophyll  
c) in Mesophyllzellen, welche die Leitbündel umgeben  
d) in Mesophyllzellen, welche die Atemhöhlen umgeben  
e) 24 hpt wenig Transkripte, ab 3 dpt sehr starke Transkriptakkumulation  
f) 12 hpt wenig Transkripte, ab 2 dpt sehr starke Transkriptakkumulation  
(): sehr schwache Transkriptakkumulation  
- : keine Transkriptakkumulation  
sd: Applikation von BTH über den Boden (*soil drench*)  
ls: Applikation von BTH über die Blätter (*leaf spray*)

#### 4.4.1 *WCI-1*

Die Funktion von *WCI-1* ist bis heute ungeklärt. Sein Gen gehört zu der Gruppe von *WCI*-Genen (GÖRLACH *et al.* 1996), welche als Marker der CIR in Weizen betrachtet werden. Aufgrund des Fehlens eines Signalpeptids wird angenommen, daß es sich bei dem Genprodukt von *WCI-1* um ein lösliches, cytosolisches Protein handelt. GÖRLACH *et al.* (1996) fanden im C-Terminus des Proteins hohe Ähnlichkeiten zu zwei durch exogenen Streß induzierten Proteinen aus Reis, *salT* und *COS9*. Die Funktionen von beiden ist ebenfalls noch nicht bekannt. Das *salT*-Gen wird sowohl durch Salz- als auch Trockenstreß der Pflanzen induziert (CLAES *et al.* 1990), *COS9* wird in Wurzeln exprimiert (DE PATER und SCHILPEROORT 1992). Von LEE *et al.* (1996) konnten in Gerste mehrere Jasmonat-induzierbare Gene mit unbekannter Funktion identifiziert werden, welche mit etwa 55 % Ähnlichkeit auf Proteinebene eine ähnliche Funktion wie *WCI-1* haben könnten. Interessanterweise werden alle Gene, welche eine Ähnlichkeit zu *WCI-1* aufweisen durch unterschiedliche exogene Faktoren induziert und sind wahrscheinlich in Schutzmechanismen gegenüber schädlichen Einflüssen von außen involviert. Vielleicht gehören die zu *WCI-1* ähnlichen Gene zu einer Genfamilie, werden jedoch unterschiedlich reguliert.

Durch *Northern* Analysen konnte gezeigt werden, daß *WCI-1*-Transkripte schnell nach einer Behandlung mit BTH, nicht jedoch in Kontrollen oder in mit *Bgt* inokulierten Pflanzen, akkumulieren. Bereits 12 hpt konnten erste Transkripte detektiert werden. Die Transkriptmenge nahm in den folgenden Tagen stetig zu. Eine zusätzliche Inokulation chemisch induzierter Pflanzen bewirkte im Vergleich zu den nicht inokulierten Pflanzen eine vorübergehende Abnahme der Transkriptmengen bis 7 dpt (3 dpi). Dies weist auf eine mögliche Suppression der Genaktivität durch das Pathogen hin. Durch Suppression pflanzlicher Abwehrmechanismen versucht der Echte Getreidemehltau, sich einen Vorteil für eine erfolgreiche Infektion zu verschaffen (CARVER *et al.* 1999, WAESPI *et al.* 2001).

Die *in situ* Hybridisierungen von *WCI-1* 48 hpt zeigten, daß das Gen im gesamten Mesophyll der Blätter, nicht jedoch in der Epidermis exprimiert wurde (s. Abb. 16C). Untersuchungen zu früheren Zeitpunkten nach der Behandlung von Pflanzen mit BTH spiegeln deutlich die Aufnahmewege des Induktors bei unterschiedlichen Applikationsarten wider. Nach einer Sprühbehandlung der Blätter kam es 12 hpt zu ersten Transkriptakkumulationen von *WCI-1* in Mesophyllzellen, welche die Atemhöhlen

umgeben. Eine Applikation des Induktors über den Boden führte 12 hpt zu ersten Anreicherungen von Transkripten in den die Leitbündel umgebenden Mesophyllzellen. Der räumliche Zusammenhang zwischen Applikationsart und Genexpression deutet an, daß BTH oder ein früher Faktor in der Signalkette der CIR einen direkten Einfluß auf die Expression von *WCI-1* hat. Wenn sich der Resistenzinduktor im gesamten Blatt verteilt hat, wird *WCI-1* in allen Mesophyllzellen exprimiert.

#### 4.4.2 *WCI-3*

*WCI-3* gehört ebenfalls zu der Gruppe der *WCI*-Gene (GÖRLACH *et al.* 1996), und wird nach bisherigem Erkenntnisstand nur während der CIR exprimiert. GÖRLACH *et al.* (1996) klassifizierten das ca. 60 Aminosäuren umfassende Genprodukt von *WCI-3* als ein schwefelreiches Protein und vermuteten aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten mit einem Thionin-ähnlichen Protein aus *Petunia inflata* (KARUNANANDAA *et al.* 1994), durch konservierte Positionen mehrerer Cysteine, eine ähnliche Funktion. Das Vorläuferprotein von *WCI-3* hat ein Signalpeptid, welches beim Protein-*targeting* zu einem Transport ins Endoplasmatische Retikulum führt, hier jedoch nicht verbleibt und möglicherweise in den Apoplasten transloziert wird (GÖRLACH *et al.* 1996). Falls *WCI-3* tatsächlich zur Gruppe der Thionin-ähnlichen Proteine, welche im allgemeinen toxisch auf phytopathogene Bakterien und Pilze wirken (CARMONA *et al.* 1993, EPPLE *et al.* 1997, GAUSING 1987), gehören sollte, könnte es ebenfalls eine Bedeutung bei der Pathogenabwehr haben. In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl an neuen Genen entdeckt und vollständige Genome verschiedener Spezies sequenziert. Doch selbst intensive Datenbankvergleiche (NCBI Sequence Viewer, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, ALTSCHUL *et al.* 1997) auf Protein- wie auch Nukleotidebene konnten keine weiteren zu *WCI-3* homologe Gene bzw. Proteine, welche eine Zugehörigkeit zur Gruppe der Thionin-ähnlichen Proteine oder auch zu irgendwelchen anderen bekannten Genen bestätigen würden, gefunden werden. *WCI-3* scheint also ein chemisch induzierbares Gen zu sein, das nur in Weizen exprimiert wird. Interessanterweise konnte in einer EST (*expressed sequence tag*) –Datenbank eine fast identische cDNA (Acc. No.: BE 425516) ausgemacht werden, die aus nicht gestressten Weizenkeimlingen isoliert wurde (ANDERSON, nicht veröffentlicht). Falls sich die Expression von *WCI-3* in Keimlingen als zuverlässig herausstellen sollte, könnte dies bedeuten, daß *WCI-3*, ähnlich wie einige PR-Proteine (COLLINGE *et al.* 2001), schon zu

einem Schutz des jungen Keimlings beiträgt und später durch chemische Induktion wiederum einen Anteil an der Pathogenabwehr hat.

Die Expressionsanalysen von *WCI-3* (s. Abb. 10) zeigen ab 12 hpt bis 48 hpt eine stetig ansteigende und dann auf hohem Niveau anhaltende Akkumulation von *WCI-3*-Transkripten nach einer BTH-Behandlung der Pflanzen, nicht jedoch nach Inokulation mit *Bgt* oder in unbehandelten Kontrollen. *Priming*- oder *enhancement*-Effekte nach einer späteren Inokulation (4dpt) mit *Bgt* konnten nicht beobachtet werden. Dies liegt möglicherweise auch daran, daß *WCI-3* ein während der CIR sehr stark (ab 3dpt) exprimiertes Gen ist und geringe Unterschiede im Expressionsniveau bei hohen mRNA-Konzentrationen mit der Methode des *Northernblottings* nicht mehr detektiert werden konnten. Eine Erhöhung der Transkriptionsrate des Gens durch *Bgt* erscheint jedoch aufgrund der schon vor der Inokulation hohen Konzentration an mRNA eher unwahrscheinlich. Mit *in situ* Hybridisierungen konnte die Expression von *WCI-3* nach Induktorbehandlung gleichmäßig im gesamten Mesophyll verteilt, nicht jedoch in der Epidermis nachgewiesen werden. Eine direkte Beteiligung von *WCI-3* an der Abwehr des Echten Mehltaus ist daher, aufgrund der räumlichen Trennung, eher unwahrscheinlich. Die Lokalisation der Transkripte spräche hierbei eher für ein Wirkung gegen Endoparasiten, als gegen *Bgt*. Im Gegensatz zu *WCI-1* kommt es zwischen den verwendeten Applikationsarten von BTH nicht zu Unterschieden in der Lokalisation des ersten Auftretens von Transkripten. Dies läßt darauf schließen, daß BTH selbst, oder ein weit vorne in der Signalkette liegender Faktor, keinen ortsabhängigen Einfluß auf die Expression von *WCI-3* hat. Möglicherweise wurden jedoch Unterschiede zu frühen Zeitpunkten nach der Behandlung mit BTH nicht erkannt, da die Signalstärke bei den *in situ* Hybridisierungen bei weitem nicht dem aus den *Northern* Analysen Erwarteten entspricht und im Gegensatz zu diesen hier erst ab 36 hpt *WCI-3*-Transkripte detektiert wurden.

Das *WCI-3* bzw. Homologe bisher nur in Weizen gefunden wurden, es sehr spezifisch für den Status der CIR ist, also nicht von Pathogenen induziert wird und auch ähnlich wie einige PR-Proteine in Keimlingen aktiv ist, macht es besonders interessant für weitere Untersuchungen.

#### 4.4.3 Die PR-1-Familie

PR-1-Proteine (*pathogenesis related protein 1*) werden von einer Multigenfamilie codiert, deren genaue Funktion bis heute weitgehend ungeklärt ist. Die Gene werden durch verschiedene Pathogene, aber auch chemisch induziert und gelten vor allem in dikotylen Pflanzen als verlässlicher Marker für den Status induziert resistenter Pflanzen (BOWLING *et al.* 1994, WEYMANN *et al.* 1995, Ryals *et al.* 1996, STICHER *et al.* 1997, CAO *et al.* 1998). PR-1-Proteine haben meist eine Größe von 14-16 kD, können sauer, neutral oder basisch sein und besitzen eine sehr kompakte Struktur, welche ihre hohe Stabilität und Unempfindlichkeit gegenüber vielen Proteasen erklärt (VAN LOON und VAN STRIEN 1999, VAN LOON und GERRITSEN 1989). Weiterhin ist allen PR-1-Proteinen gemeinsam, daß ihre Vorläuferproteine ein Signalpeptid für eine Translozierung ins ER haben. Einige haben C-terminal weitere Erkennungssequenzen für den Transport in Organellen oder die Vakuole (BRYNGELSSON 1994, MOLINA *et al.* 1999). Die Nomenklatur der PR-1-Proteine orientiert sich an ihren isoelektrischen Punkten. Innerhalb einer Pflanzenspezies erhält das PR-1 mit dem niedrigsten isoelektrischen Punkt die Bezeichnung PR-1a das mit dem zweitniedrigsten PR-1b usw.. Schwierigkeiten gibt es hierbei nur, wenn zu einem späteren Zeitpunkt neue Isoformen entdeckt werden, deren isoelektrische Punkte zwischen den der bereits bekannten liegen, da es bisher nicht zu Umbenennungen gekommen ist. Die neuen Proteine bekommen dann den nächst freien Buchstaben zugeordnet. Die Bezeichnung sagt jedoch nichts darüber, ob ein PR-1 sauer oder basisch ist und gibt auch keine Auskunft über Homologien der PR-1-Proteine bei unterschiedlichen Pflanzenspezies. So sind z. B. PR-1a und PR-1b aus Gerste beide basische Proteine (BRYNGELSSON *et al.* 1994), PR-1a aus Tabak ein sehr saures und PR-1a aus Tomate wiederum ein basisches Protein (VAN LOON *et al.* 1994). Oftmals sind auch die Ähnlichkeiten zwischen basischen und sauren PR-1-Proteinen größer als zwischen Zweien mit gleichem isoelektrischen Punkt.

Für die Untersuchungen der Rolle von PR-1 in Weizen nach Pathogenbefall und bei CIR wurde einerseits eine Sonde verwendet, die von *HvPR-1b* aus Gerste abgeleitet ist, andererseits ein Antikörper, der gegen PR-1a aus Gerste gerichtet ist, aber gleichzeitig das zu 91 % identische PR-1b detektiert (BRYNGELSSON *et al.* 1994). Durch *Northern* Analysen von Weizen-RNA mit der vom Gersten-*PR-1b* abgeleiteten Sonde konnte das entsprechende homologe Weizentranskript sowohl nach Mehltaubefall als auch nach einer Behandlung der Pflanzen mit BTH nachgewiesen werden. Eine Infektion mit *Bgt* führte zu

einem biphasischen Verlauf der Akkumulation von *PR-1*-Transkripten, welche zunächst von 24 - 48 hpi und dann ab 7 dpi Maxima aufwies. Dies korreliert zeitlich mit den frühen Stadien der Mehltauentwicklung, in der sich entscheidet, ob die Infektion erfolgreich abläuft oder nicht. Die erste Transkriptakkumulation wäre demnach eine Antwort auf den primären Befall, die zweite wird durch sekundäre Infektionen hervorgerufen, die von Sporen verursacht wird, welche, nachdem der Pilz seinen vegetativen Entwicklungszyklus abgeschlossen hat, gebildet werden und erneut versuchen, die Pflanze zu besiedeln. MOLINA *et al.* (1999) zeigten für *PR1-1* aus Weizen eine ähnliche biphasische Akkumulation von Transkripten während der Pathogenese von *Bgt*. Obwohl *HvPR-1b* und *PR1-1* eine 96 %ige Sequenzidentität zeigen, was selbst unter stringenten Bedingungen für eine Hybridisierung ausreichen sollte, scheint es, daß die Gerstensonde nicht mit *PR1-1* Transkripten, sondern mit einer anderen *PR-1* mRNA hybridisiert hat. Es zeigte sich nämlich, daß das detektierte *PR-1b*-Homolog im Gegensatz zu den Ergebnissen für *PR1-1* von MOLINA *et al.* (1999) auch nach einer Behandlung mit BTH induziert wurde (ab 36 hpt). Eine zusätzliche Infektion von chemisch induzierten Pflanzen (4 dpt) mit *Bgt* führte einen Tag später zu einer nochmals verstärkten Akkumulation von *PR-1*-Transkripten, welche im Vergleich zu nicht behandelten Pflanzen länger anhielt. Ob es sich hierbei um additive oder *priming*-Effekte handelt konnte mit *Western* Analysen auf Proteinebene geklärt werden. Mit dem verwendeten Antikörper wurden zwei etwa gleich große PR-1-Proteine, vermutlich die homologen Formen der Gerstenproteine PR-1a (14,49 kD) und PR-1b (15,204 kD), in Weizen detektiert. Die Proteine waren einen Tag, nachdem es bei den verschiedenen Behandlungen zu einer Transkriptakkumulation kam, nachzuweisen. Entgegen den Ergebnissen der *Northern* Analysen kam es hierbei jedoch nicht zu einem biphasischen Verlauf während der Infektion, wahrscheinlich deshalb, da Proteine nicht so schnell wieder abgebaut wurden wie mRNA. Vergleicht man die Proteinmengen von chemisch induzierten Pflanzen, welche 4dpt mit *Bgt* inokuliert worden waren, mit denen von nur induzierten bzw. nur inokulierten Pflanzen (s. Abb. 12) einen Tag nach der Inokulation, so zeigt sich, daß in nicht induzierten, inokulierten Kontrollpflanzen noch kein PR-1, in nur chemisch induzierten (ab 4 dpt) wenig und in behandelten sowie inokulierten deutlich mehr PR-1 nachzuweisen war. Dies bedeutet, daß es sich hierbei nicht um additive Effekte der Induktion durch *Bgt* und BTH handelte, sondern, daß die chemisch induzierten Pflanzen schneller durch eine gesteigerte

Proteinbiosynthese auf einen Pathogenbefall reagieren konnten. Dieser Zustand wird heute als *priming* bezeichnet (CONRATH *et al.* 2001).

Die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen (vgl. Kap. 3.5.2.5) belegten, daß *PR-1b*-Homologe in Weizen nach Inokulation mit *Bgt* oder nach chemischer Induktion der Resistenz durch BTH, sowohl in der Epidermis als auch im gesamten Mesophyll exprimiert wurden. Dies korreliert mit den Ergebnissen von GREGERSEN *et al.* (1997), welche durch *Northern* Analysen von kompatiblen wie auch inkompatiblen Interaktionen mit *Bgh* die Expression von *PR-1b* in Epidermis und auch Mesophyll nachwiesen, wobei jedoch die Stärke der Expression nicht unbedingt mit Resistenz einherging. Die hier dargestellte gewebespezifische Lokalisation zeigte jedoch deutlich, daß dieses PR-1, wenn auch nicht alleine, einen direkten Einfluß auf die Entwicklung des Mehлтаupilzes sowie endoparasitische Pathogene haben kann.

Obwohl die biochemische Funktion von PR-1-Proteinen bisher unbekannt ist, konnte für einen Teil eine mehr oder weniger starke antifungale Wirkung festgestellt werden (ALEXANDER *et al.* 1993, NIDERMAN *et al.* 1995, RAUSCHER *et al.* 1999), was wiederum auf eine direkte Beteiligung an der Pathogenabwehr hindeutet. BRYNGELSSON *et al.* (1994) zeigten, daß PR-1a und PR-1b aus Gerste keine C-terminalen Leitsequenzen für Organellen besitzen und in den Apoplasten verbracht werden, was die Hypothese einer direkten Beteiligung an der Pathogenabwehr nochmals stärkt. Weiter konnte gezeigt werden, daß die Repression der *PR-1b*-Expression in Gerste durch *gene silencing* mittels RNA *interference* zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *Bgh* führt. Die Überexpression von *PR-1b* bewirkt jedoch keine erhöhte Resistenz gegenüber dem Pathogen (SCHULTHEIS, HÜCKELHOVEN, KOGEL, unveröffentlicht).

Abschließend muß jedoch festgehalten werden, daß trotz der dargestellten Ergebnisse *PR-1b* bzw. das Homolog in Weizen kein guter Marker für den Zustand der IR in monokotylen Pflanzen ist. Einerseits kam es während der Versuche oftmals ohne ersichtlichen Grund in unbehandelten Kontrollpflanzen zu einer Akkumulation von *PR-1(b)*-Transkripten (s. Abb. 11), was auch von weiteren Arbeitsgruppen und für andere Systeme bestätigt wird (AG LANGEN und HÜCKELHOVEN, persönliche Mitteilung) und andererseits auch, da an Gerste gezeigt wurde, daß *PR-1b* durch eine Vielzahl biotischer und abiotischer Stresssituationen sowie durch Ethylen oder Jasmonat induziert wird (BEBER 2001).

#### 4.4.4 Lipoxygenase

Die Multigenfamilie der Lipoxygenasen (LOX, *linoleat oxygen oxidoreductase*) kodiert für Proteine, welche die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren. In höheren Pflanzen sind dies meist Linolensäure und Linolsäure. Lipoxygenasen sind Schlüsselenzyme verschiedener Signalwege, da sie die Ausgangsprodukte für viele Stoffe liefern, die bei Wundreaktionen, Insektenresistenz, in Wirt-Pathogen-Interaktionen sowie als Wachstumsregulatoren von Bedeutung sind (HILDEBRAND 1989, ROSAHL 1996, WEICHERT 1999). Endprodukte, der durch Lipoxygenasen eingeleiteten Biosynthesewege, sind neben Alkoholen, Ketolen und flüchtigen Aldehyden auch Phytohormone wie Traumatin- und Jasmonsäure. Letztere haben eine große Bedeutung als Signalkomponenten bei mechanischen Verletzungen und Insektenfraß, da sie unter anderem den Wundverschluß (ENGLISH 1939), die Synthese von Proteinaseinhibitoren (FARMER und RYAN 1992, CORDERO *et al.* 1994) und die Synthese von RIPs (ribosomeninaktivierende Proteine, CHAUDHRY *et al.* 1994, SONG *et al.* 2000) induzieren. Weiterhin hat Jasmonat im Zusammenspiel mit Ethylen eine zentrale Rolle im SA-unabhängigen Signaltransduktionsweg der ISR, welcher unter anderem durch manche Pathogene und Rhizobakterien hervorgerufen wird (PIETERSE *et al.* 1998). RANCE *et al.* (1998) konnten zeigen, daß das Ausschalten der Translation von Lipoxygenasen durch transgene Expression von antisense RNA zu Kompatibilität gegenüber ansonsten avirulenten Pathogenen führt.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen dieser Arbeit wurde eine Sonde verwendet, die von einem chemisch induzierten *LOX*-Gen aus Gerste (*LOX2Hv1*) abgeleitet ist. Zunächst hatte sich zwar eine von GÖRLACH *et al.* (1996) beschriebene, chemisch induzierte LOX (WCI-2) für die Untersuchungen angeboten, doch stellte sich in nachfolgenden Untersuchungen heraus, daß WCI-2 nicht nur nach chemischer Induktion, sondern ebenfalls nach mechanischer Beanspruchung, wie Wind oder Verletzung induziert wurde (MAUCH *et al.* 1997). Deshalb wurde in Weizen nach einer LOX gesucht, welche wie auch in Gerste, als ein Marker der CIR angesehen werden kann. Durch *Northernblot* Analysen und *in situ* Hybridisierungen konnte die entsprechende homologe Form der *LOX2Hv1* in Weizen nach einer BTH-Behandlung als differentiell exprimiert nachgewiesen werden. Ursprünglich wurde die *LOX2Hv1* als methyljasmonatinduziertes Protein in Gerste identifiziert und als Linoleat 13-LOX und Arachidonat 15-LOX beschrieben (FEUSSNER *et al.* 1995, VÖRÖS *et al.* 1998).

HAUSE *et al.* (1999) zeigten, daß die *LOX2Hv1* durch Resistenzinduktoren, nicht jedoch durch Pathogene, induziert werden kann. SCHAFFRATH *et al.* (2000) fanden in Reis eine Lipoxygenase (*RCI-1*), welche ebenfalls durch alle bekannten Resistenzinduktoren sowie exogen appliziertes Jasmonat, jedoch nicht durch Pathogene, Nicht-Wirt-Pathogene oder Verwundung, induziert wird. Sequenzvergleiche auf Transkript- und Proteinebene zeigten, daß *RCI-1* und *LOX2Hv1* untereinander eine sehr hohe Ähnlichkeit im Vergleich zu anderen Lipoxygenasen aufweisen. BEBER *et al.* (2000) identifizierten neun weitere Gene in Gerste, deren Transkripte spezifisch während der CIR akkumulieren. Das als *BCI-1* bezeichnete Gen konnte als *LOX2Hv1* identifiziert werden. In ausführlichen Studien (BEBER 2001) wurden die Expressionsmuster dieser Gene nach Behandlung mit verschiedenen Resistenzinduktoren, Pathogenen, Nicht-Wirt-Pathogenen, Insekten, Pflanzenhormonen und Stressen analysiert. Für *BCI-1* (*LOX2Hv1*) ergab sich neben einer schnellen Transkriptakkumulation nach Behandlung mit den verschiedenen Resistenzinduktoren (SA, DCINA, DCSA, BTH) und Methyljasmonat sowie Ethylen nur noch eine Induktion durch Infiltration mit dem Nicht-Wirt-Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000). Eine lokale Infiltration mit DC3000 führte besonders oberhalb des infiltrierten Blattbereichs zu einer Akkumulation der Transkripte. BEBER schloß daraus auf eine mögliche Bedeutung in der Signaltransduktion oder der Bereitstellung von Abwehrstoffen. Es konnte gezeigt werden, daß *LOX2Hv1* nicht an der Biosynthese von Jasmonat und somit nicht an der Induktion eines Jasmonat-abhängigen Signalweges beteiligt ist (KOGEL *et al.* 1995, VÖRÖS *et al.* 1998).

In den vorliegenden Untersuchungen konnte durch *Northern* Analysen von BTH-behandeltem Weizen ebenfalls eine schnelle Transkriptakkumulation des *LOX2Hv1* Homologs nachgewiesen werden. Eine Applikation des Induktors über den Boden führte bereits 12 hpt zu einem deutlichen Anstieg der Transkripte, eine Sprühbehandlung der Blätter hingegen erst 24 hpt. Eine Inokulation des Weizens mit *Bgt* bewirkte nur eine sehr schwache Expression des *LOX2Hv1*-Homologs, welche in den *in situ* Hybridisierungen jedoch nicht bestätigt werden konnte. Eine Inokulation 4 dpt hatte keinen weiteren Einfluß auf das Expressionsprofil der LOX.

Sowohl für *LOX2Hv1* in Gerste als auch *RCI-1* in Reis wurde eine putative Signalsequenz für Chloroplasten gefunden. Die Lokalisation der Proteine in Chloroplasten gelang in

Gerste über Immunofluoreszenzfärbung (FEUSSNER *et al.* 1995) und in Reis über ein RCI-1::GFP-Fusionsprotein (SCHAFFRATH *et al.* 2000).

Mit *in situ* Hybridisierungen (vgl. Kap. 3.5.2.2) wurden erstmalig Transkripte des *LOX2Hv1*-Homologs in Weizen nachgewiesen. Die Expression der LOX nach chemischer Induktion blieb hierbei auf einen eng begrenzten Bereich um die Leitbündel herum, insbesondere den parenchymatösen Leitbündelscheidezellen und den umgebenden Mesophyllzellen, beschränkt. In seltenen Fällen wurden in der Nähe starker Akkumulationen im Mesophyll auch Transkripte in langen Epidermiszellen (C-Zellen) der adaxialen Blattseite detektiert. Mikroskopische Detailaufnahmen der *in situ* Hybridisierungen (s. Abb. 15C) zeigen, daß sich in Mesophyll- und Leitbündelscheidezellen Transkripte hauptsächlich in einem schmalen Saum um die Chloroplasten herum befanden. Da die Transkripte nicht in den Chloroplasten selbst zu finden waren, sondern im umgebenen Cytoplasma, kann eine plastidäre Codierung der LOX ausgeschlossen werden. Aufgrund der Spezifität der Sonde und vergleichbarer Expressionsprofile, wie sie von SCHAFFRATH *et al.* (2000) und FEUSSNER *et al.* (1995) für *RCI-1* bzw. *LOX2Hv1* nach unterschiedlichen Behandlungen beschrieben wurden, ist es anzunehmen, daß das *LOX2Hv1*-Homolog in Weizen ebenfalls in die Chloroplasten transloziert wird. Das Interessante an der gewebespezifischen Lokalisation der *LOX2Hv1*-homologen Transkripte in Weizen war neben der lokal begrenzten, zelltypspezifischen Lokalisation der mRNA um die Leitbündel herum, auch die Tatsache, daß es unabhängig von der Behandlungsart mit BTH, über den Boden oder als Sprühapplikation, in den selben Zellen zu einer Akkumulation der Transkripte kam. Es zeigte sich sogar, daß eine Bodenbehandlung, bei der der Wirkstoff über die Wurzeln aufgenommen und über das Xylem transportiert wird (persönliche Mitteilung KESSMANN), schneller (12 hpt) zu einer Akkumulation der Transkripte führte als nach einer direkten Behandlung der Blätter. Dies deutet darauf hin, daß durch den Xylemtransport von BTH in den an die Leitbündel angrenzenden parenchymatösen Zellen über die Aktivierung der LOX eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst wird, die im Weiteren eine Resistenzantwort der Pflanze bewirkt. Andererseits muß davon ausgegangen werden, daß nach einer Blattapplikation des Resistenzinduktors entweder die Diffusion von BTH im Blattgewebe zu langsam abläuft, um in den beschriebenen Zellen eine Expression der LOX zu bewirken oder zuerst Mechanismen aktiviert werden, welche die Transkription der LOX über

Signalmoleküle in den betreffenden Zellen aktivieren. Die Ergebnisse von BEBER (2001), welche die Induktion von *BCI-1 (LOX2Hv1)* nach Injektion mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *PstDC3000*, in apikalen Bereichen des infizierten Blattes nachwies, zeigen neben den hier dargestellten Untersuchungen, daß diese LOX eine Rolle zwischen den Transportbahnen und den assimilativen Geweben des Blattes innehaben könnte.

Für verschiedene Lipoxygenasen wurde eine Reihe von Funktionen postuliert, wovon die meisten jedoch, aufgrund des örtlichen Expressionsprofils der beschriebenen LOX, ausgeschlossen werden können. Für einige Lipoxygenasen wird eine Beteiligung an der Entstehung von Membranschäden und dem *oxidative burst* während bzw. vor der HR nach Pathogenbefall diskutiert. Die Peroxidation von Membranlipiden führt zu Veränderungen der Membran, wobei zusätzlich ROIs gebildet werden können (ROSAHL 1996). Für einige Intermediate der Oxylipinsignalwege, wie Hydroperoxyfettsäuren, flüchtigem Hexanal und Hexenol, konnte eine direkte antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden (ROSAHL 1996). Für die chemisch induzierte LOX in Weizen kommt aufgrund der sehr eingegrenzten gewebespezifischen Lokalisation eine direkte Beteiligung an der Pathogenabwehr über HR oder der Bereitstellung von fungitoxischen Substanzen kaum in Frage. Lediglich für die wenigen langen Epidermiszellen (C-Zellen), in denen es zur Expression einer LOX während der CIR kam, könnte eine direkte Beteiligung des Proteins an der Pathogenabwehr des Mehltaus angenommen werden. Da G-Zellen jedoch fast nie hypersensitiv reagieren und eine sehr hohe basale Penetrationsresistenz aufweisen, bleibt auch für diese Zellen die Rolle der LOX ungeklärt. Das Fehlen von Chloroplasten in Epidermiszellen ist ein weiterer Grund, der es in diesem Zelltyp schwierig macht, eine Aussage über die Funktion der LOX zu machen. Die zentrale Rolle, welche den Leitbündelscheidzellen und dem umgebenden Mesophyll zugesprochen werden kann, liegt auf der Hand. Sie stellen über Xylem und Phloem den direkten Kontakt eines einzelnen Blattes mit dem Rest der Pflanze dar. Verschiedenen andere Studien zeigen die Bedeutung dieser Zellen sowohl bei der Ausprägung der SAR sowie verschiedenen Stressen. ALVAREZ *et al.* (1998) zeigten, daß eine Inokulation von *Arabidopsis thaliana* mit dem avirulenten Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato (PstDC3000)* neben den primären, lokalen Nekrosen zu Mikroläsionen und einer Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einigen weiter entfernten Zellen (*mikrooxidative bursts*) um die Leitbündel herum auftraten. Dies gilt für das befallene Blatt genauso wie für systemische gelegene Blätter.

Durch Inokulation mit DC3000 kommt es in *A. thaliana* zu einer Ausprägung der SAR auf höher gelegenen Blättern. Wird die Bildung von Mikroläsionen bzw. die Entstehung von *mikrooxidative bursts* durch Katalase oder DPI (*diphenyleneiodonium chloride*), welches eine neutrophile plasmamembrangebundene NADPH-Oxidase inhibiert, verhindert, kommt es nicht mehr zu einer Ausprägung der SAR. Des Weiteren konnte von SCHRAUDNER *et al.* (1998) gezeigt werden, daß eine Ozonbehandlung von Tabak zu einer lokalen Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und einer Aktivierung eines *oxidative burst* um die Leitbündel herum führt. Später konnte gezeigt werden, daß diese lokal begrenzten Ereignisse mit der Transkription einer *LOX* einhergehen (SCHRAUDNER, persönliche Mitteilung). FEUSSNER *et al.* (1995) konnten über Immunoassays zeigen, daß es nach exogener Applikation von Methyljasmonat zu einer Akkumulation von Lipoxygenasen in den Leitbündelscheidezellen sowie den umgebenden Mesophyllzellen kommt. Leider konnten sie aufgrund der geringen Spezifität ihres Antikörpers, welcher gegen Lipoxygenasen aus Gurke generiert wurde, keine detaillierten Aussagen über die Funktion in Getreide treffen, da hier in sämtlichen Chloroplasten aller Mesophyllzellen Lipoxygenasen detektiert wurden. Eine Beteiligung der untersuchten LOX an diesen Prozessen kann aufgrund der bereits beschriebenen Vielfältigkeit dieser Multigenfamilie nicht ausgeschlossen werden. Es wird auch diskutiert, daß verschiedene Isoformen bestimmter Lipoxygenasen bei gleicher biochemischer Funktion unterschiedlich lokalisiert und über verschiedene Signaltransduktionswege reguliert werden (ROSAHL 1996, SCHAFFRATH *et al.* 2000). Es sollten auf jeden Fall weitere Untersuchungen zur Rolle der beschriebenen LOX folgen, da aufgrund ihres zeitlichen und örtlichen Expressionsprofils wahrscheinlich ist, daß sie eine zentrale Rolle bei der CIR einnimmt.

#### **4.5 Das Problem der Bindung von Nukleinsäuren an Zellen mit HR bei *in situ* Hybridisierungen**

Die Technik der *in situ* Hybridisierung stellt einen eleganten Weg dar, um zeitliche und räumliche Expressionsmuster bestimmter Gene zu dokumentieren. Das Prinzip dieser Methode ist die Anlagerung und die anschließende Detektion markierter Nukleinsäuresonden an die komplementäre mRNA innerhalb von fixierten Gewebeschnitten. Bei der Suche nach einem geeigneten Protokoll für *in situ* Hybridisierungen in Weizenblättern wurden verschiedene Methoden miteinander

verglichen. Die eine ist eine nicht-radioaktive Methode, welche über DIG-markierte DNA-Sonden und einem anschließenden Immunoassay spezifische Transkripte anzeigen soll, die andere erfolgt über eine Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNA-Sonden, welche über Autoradiographie die Akkumulation der mRNA detektiert. Bei Untersuchungen mit DIG-markierten *HvPR-1*-Sonden wurden immer Signale in Zellen festgestellt, welche mit einer HR auf den Pathogenbefall reagiert hatten (s. Abb. 13D).

Auf den ersten Blick ergibt dies ein schlüssiges Bild, da *PR-1* ein pathogeninduziertes Gen ist und nur in befallenen Zellen auftritt, wo es einen direkten Beitrag zur Pathogenabwehr leisten kann. In Kontrollen mit nicht-inokulierten Blättern kommt es dementsprechend auch nicht zu einer Transkriptakkumulation. Entgegen den *Northern* Analysen konnten jedoch in chemisch induzierten Blättern keine Transkripte detektiert werden. In Zellen, welche hypersensitiv auf einen Pathogenbefall reagieren, kommt es zu einem *oxidative burst*, einer Defragmentierung der Zellkompartimente unter Freisetzung von proteolytischen Enzymen und RNasen aus der Vakuole sowie zu radikalischen Vernetzungen von phenolischen Substanzen und anderen Zellbestandteilen. Da dies keine günstigen Bedingungen für die Stabilität von mRNA sind und in toten Zellen keine Transkription mehr stattfindet, muß davon ausgegangen werden, daß die Signale von mRNA stammt, welche vor der HR gebildet wurde. Kurz vor dem Auftreten der HR (s. Kap. 3.5.1.4) konnten jedoch keine Transkripte detektiert werden. Anschließend wurden weitere Kontrollen mit Blattquerschnitten des Gerstenkultivars Sultan 5, welche mit *HvPR-1b* bzw. *WCI-3* Sonden hybridisiert wurden, durchgeführt. *WCI-3* ist spezifisch für die CIR in Weizen, wird nicht durch Pathogen induziert und sollte deshalb nicht in Gerste detektiert werden. Die *HvPR-1b* Sonde wurde von dem Pathogen-induzierten Gen aus Gerste abgeleitet und sollte neben Signalen in HR-Zellen weitere spezifische Transkripte detektieren. Auch in diesen Kontrollen wurden, sowohl mit *HvPR-1b*- als auch *WCI-3*-Sonden, nur Signale in HR-Zellen der Epidermis und des Mesophylls detektiert. Nachdem methodische Fehler (vgl. Kap 3.5.1.6.2) ausgeschlossen werden konnten, wurde die Methode verworfen und *in situ* Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNA-Sonden durchgeführt. Die Verwendung von RNA-Sonden, welche über *in vitro* Transkription hergestellt werden, bietet die Möglichkeit *sense* Sonden als Negativkontrollen einzusetzen, da diese die gleiche Orientierung wie die mRNA haben und so nicht mit dieser hybridisieren können. Es zeigte sich, daß neben anderen spezifischen Signalen mit

*antisense* Sonden, ebenfalls eine starke Bindung der RNA-Sonden an Zellen mit HR stattfand und dies sowohl mit *antisense* als auch *sense* Sonden.

Hiermit konnte abschließend gezeigt werden, daß die in HR-Zellen detektierten Signale Artefakte sind und es in Zellen welche hypersensitiv auf einen Pathogenbefall reagiert haben, Strukturen gibt, welche Nukleinsäuren (RNA und DNA) sehr stark binden. Da dieses Phänomen bisher nicht in der Literatur beschrieben ist und es keine Hinweise auf die Faktoren gibt, welche für die starke Bindung der Nukleinsäuren verantwortlich sind, ist es wichtig, dieses weiter zu verfolgen um Fehlinterpretationen, vor allem beim Arbeiten mit pathogeninduzierten Genen, zu vermeiden.

Auf Nachfrage konnten ähnliche Probleme mit HR-Zellen in Getreide, welche zunächst auch zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führten, von drei weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden (HAUSE persönliche Mitteilung, BOERMANS persönliche Mitteilung, SCHMELZER persönliche Mitteilung).

#### **4.6 Abschließende Betrachtungen der *in situ* Hybridisierungen**

Trotz der Schwierigkeiten, die bei *in situ* Hybridisierungen zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen können, war es mit radioaktiv markierten RNA-Sonden möglich, neue Erkenntnisse über die Funktion der untersuchten Gene bei der CIR zu gewinnen. Mit geeigneten Kontrollen (*sense* Sonden) konnte gezeigt werden, daß es außer in HR-Zellen zu keinen weiteren unspezifischen Bindungen der Sonden kam, so daß die zeitlichen und räumlichen Expressionsprofile von vier Genen nach chemischer Resistenzinduktion und Inokulation mit *Bgt* aufgeklärt werden konnten.

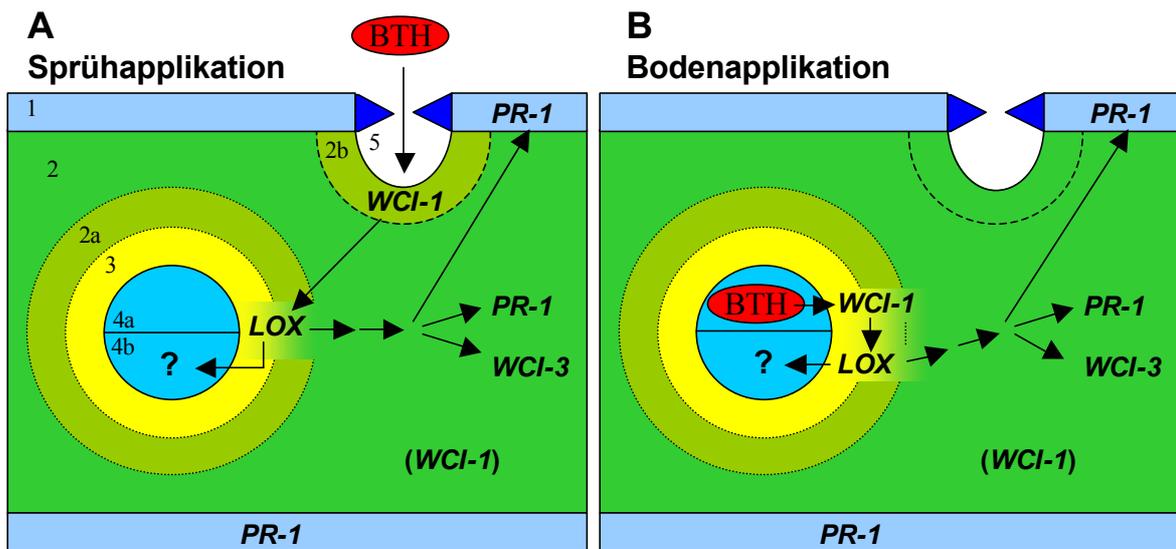
Anders als bei *Northern* Analysen wird bei *in situ* Hybridisierungen aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes oftmals nur ein einziger, meist später Zeitpunkt der Genexpression für eine gewebespezifische Analyse herangezogen. Es zeigte sich, daß hierdurch oft wichtige Informationen über die mögliche Funktion eines Genes verloren gehen. In der vorliegenden Arbeit wurden bei den *in situ* Hybridisierungen detaillierte Zeitkinetiken zu frühen Zeitpunkten der Genexpression durchgeführt, um das erste Auftreten von Transkripten und eine mögliche Ausbreitung von Signalen im Gewebe zeitlich und räumlich darzustellen.

Für *WCI-1* konnte z.B. gezeigt werden, daß, entgegen den Ergebnisse der *Northern* Analysen, Transkripte bereits 12 hpt in lokal begrenzten Bereichen des Blattes

akkumulierten. Nach einer Bodenbehandlung mit BTH kam es im Mesophyll um die Leitbündel herum zu ersten Transkriptakkumulationen, nach einer Blattapplikation im Bereich der Atemhöhlen. Aufgrund der geringen Menge von spezifischer mRNA, in den wenigen induzierten Zellen im Vergleich zur Gesamt-RNA im restlichen Blatt, kann es sein, daß durch einen Verdünnungseffekt solche Phänomene in *Northern* Analysen nicht nachgewiesen werden konnten. Somit gehen wichtige Informationen verloren, wenn man die örtlichen Expressionsprofile außer Acht läßt.

Dies zeigt deutlich, daß *in situ* Hybridisierungen auch Hinweise auf mögliche Kausalzusammenhänge sukzessiver Genexpressionsereignisse geben. So zeigte sich, daß die Expression der Lipoxygenase bzw. eines ihrer Produkte nicht für die Expression von *WCI-1* von Bedeutung sein kann, da ihre Transkripte nach einer Blattapplikation des Induktors erst 24 hpt um die Leitbündel herum detektiert werden konnten, *WCI-1*-Transkripte aber bereits 12 hpt gefunden wurden. Bei alleiniger Betrachtung der Ereignisse nach einer Bodenapplikation des Induktors wäre dieser Zusammenhang nicht aufgefallen, da hier 12 hpt die Transkripte von beiden Genen am selben Ort um die Leitbündel herum zu finden waren. Falls also eine Abhängigkeit der Genexpressionsereignisse untereinander besteht, würde dies bedeuten, daß *WCI-1* vor der LOX in einer Signalkette stehen muß. Die LOX nimmt wahrscheinlich aufgrund ihrer äußerst gewebespezifischen Expression in den parenchymatösen Leitbündelscheidezellen und dem angrenzenden Mesophyll, welche als Kommunikationsschnittstelle zwischen dem Blatt und dem Rest der Pflanze angesehen werden können, eine zentrale Rolle bei der CIR ein. Die Biosyntheseprodukte der LOX könnten sowohl an der Signaltransduktion im Blatt, als auch an der Bereitstellung von systemischen Signalen beteiligt sein.

PR-1 und *WCI-3* spielen wegen ihres zeitlichen und räumlichen Expressionsprofils und ihren Ähnlichkeiten zu bekannten Abwehr-Genen wahrscheinlich eine Rolle bei der Pathogenabwehr. Sie sollten demnach hinter *WCI-1* und der LOX in einer Signalkette stehen. Zum besseren Verständnis der möglichen Verknüpfungen der einzelnen Gene während der CIR ist in Abb. 17 ein hypothetisches Schema für die zeitlichen und räumlichen Abhängigkeiten der untersuchten Gene nach unterschiedlichen Applikationsarten von BTH dargestellt.



**Abb. 17:** Hypothetisches Schema für die zeitlichen und räumlichen Abhängigkeiten der untersuchten Gene bei der CIR in Weizen bei unterschiedlicher Applikation von BTH.

**A:** Nach einer Sprühapplikation von BTH wurde 12 hpt zuerst *WCI-1* in Mesophyllzellen um die Atemhöhlen exprimiert, dann die *LOX* 24 hpt um die Leitbündel herum, anschließend *WCI-3* im gesamten Mesophyll und das *HvPR-1b*-Homologe (*PR-1*) im Mesophyll und der Epidermis. **B:** Nach einer Bodenapplikation von BTH wurden 12 hpt zuerst *WCI-1* und die *LOX* um die Leitbündel herum und danach *WCI-3* und das *HvPR-1b*-Homologe (*PR-1*) wie nach Sprühapplikation. Die Expression von *WCI-1* breitet sich ab 12 hpt bei beiden Applikationsarten über das gesamte Mesophyll aus [(*WCI-1*)]. Möglicherweise kann die *LOX* an der Bereitstellung potentieller systemischer Signale in die Leitbündel beteiligt sein (?).

Die Pfeile (→) zeigen ausgehend von BTH die möglichen Verknüpfungen, die sich aufgrund der Expressionsprofile der Gene ergeben haben. 1: Epidermis, 2: Mesophyll, 2a: an Leitbündel angrenzendes Mesophyll, 2b: an Atemhöhlen angrenzendes Mesophyll, 3: parenchymatöse Leitbündelscheide, 4: Leitbündel mit a: Xylem und b: Phloem, 5: Atemhöhle unterhalb der Stomata.

Die dargestellten Abhängigkeiten und die Reihenfolgen in einer Signalkette sollen als Arbeitshypothese für weitere Untersuchungen zur Funktion der untersuchten Gene dienen.

## 5 Zusammenfassung

Durch synthetische Resistenzinduktoren wie BTH (Benzo[1,2,3]thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester) und anderen Funktionsanaloga der Salizylsäure ist man heute in der Lage, das Phänomen der systemisch Induzierten Resistenz (SIR) in Pflanzen zu kopieren und ihnen so einen lang anhaltenden Schutz gegenüber einem breiten Spektrum an Pathogenen zu verleihen. Die Mechanismen, welche der chemisch Induzierten Resistenz (CIR) in Getreide zugrunde liegen, sind bis heute weitgehend ungeklärt und wurden in der vorliegenden Arbeit anhand des Pathosystems Weizen-Echter Weizenmehltau cytologisch, biochemisch und molekularbiologisch analysiert.

Dazu wurden zunächst die cytologischen Abwehrmechanismen, welche der CIR zugrunde liegen, aufgeklärt. Es zeigte sich, daß die CIR mit einer Steigerung der basalen Resistenz der Pflanzen durch Bildung effektiver Penetrationsbarrieren (Papillen) und hypersensitiven Zelltod (HR) nach einer Pathogenattacke einhergeht.

Die Behandlung von Weizen mit BTH führt zur Expression verschiedener Gene mit teilweise unbekannter Funktion. Einige von ihnen sind spezifisch in der CIR exprimiert und werden deshalb als Markergene angesehen. Die zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster von vier Genen konnten in *Northern* Analysen und *in situ* Hybridisierungen aufgeklärt werden. Durch den Vergleich verschiedener Applikationsmethoden von BTH in Kombination mit Infektion durch *Bgt* konnten Hinweise auf die Bedeutung dieser Gene für die CIR gewonnen werden.

Für *WCI-3* und *PR-1* konnte aufgrund der Expressionsprofile und ihrer Ähnlichkeiten zu anderen bekannten Genen gezeigt werden, daß sie wahrscheinlich eine Aufgabe bei der unmittelbaren Pathogenabwehr haben. In *Western* Analysen konnte für *PR-1* ein *priming*-Effekt nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß der Weizen nach einer Behandlung mit BTH, früher und stärker PR-1 akkumuliert und so effektiver auf den Pathogenbefall reagieren kann. *WCI-1* und *LOX* sind Gene, welche wahrscheinlich eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen. Eine Funktion von *WCI-1* in der Signaltransduktionskette nach BTH-Applikation liegt nahe, da *WCI-1* früh und in räumlicher Assoziation zum Applikationsort des Induktors exprimiert wurde. Für die *LOX* konnte gezeigt werden, daß sie ein Schlüsselement der CIR sein kann, da sie unabhängig von der Applikationsart des Induktors zelltypspezifisch in Leitbündelscheidezellen und direkt angrenzenden Mesophyllzellen exprimiert wurde.

## 6 Summary

The natural phenomenon of systemic induced resistance (SIR) is mimicked by application of the chemical BTH (benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester, acibenzolar-S-methyl) or other functional analogues of salicylic acid. Chemically Induced Resistance (CIR) in plants leads to a long lasting protection against a broad range of phytopathogens. How chemically induced plants respond to pathogens is not well understood. Here, defence mechanisms were analysed on the cytological, biochemical and molecular level in the pathosystem wheat - wheat powdery mildew fungus.

As a result of CIR the basal resistance is increased. Wheat plants treated with BTH showed a more frequent formation of effective penetration barriers (papillae) and a hypersensitive reaction upon pathogen attack.

BTH treatment leads to expression of a set of genes partly with unknown function. Some of these genes are used as marker genes for CIR, since they are expressed specifically after application of chemical resistance inductors. Temporal and spatial expression patterns of four chemically induced genes were studied. Comparing different types of chemical application in combination with inoculation of *Bgt*, conclusions regarding the importance of these genes in defence or signal transduction could be drawn.

*WCI-3* and *PR1* appeared to be involved directly in pathogen defence because they show similarities to antifungal proteins and are expressed in cells at the frontline between plant and fungus. In western analyses, a priming effect for *PR1* was demonstrated. This implies, that *PR1* was expressed in chemically induced plants that were challenged by *Bgt*-inoculation stronger and earlier than in control plants which may contribute to effectiveness of defence. *WCI-1* and *LOX* are genes that might be involved in signal transduction after BTH application. This is likely for *WCI-1*, because it was expressed rapidly and directly at the site of inductor application. Interestingly, *LOX* was expressed independent of the type of application, in cells of the vascular bundle sheath and the adjacent mesophyll. Therefore, the lipoxygenase might be a key enzyme engaged in local or systemic signal processing.

## 7 Literaturverzeichnis

- Agrios, G.N. (1997): Plant Pathology. 4th edition, Academic Press, San Diego, USA.
- Aist, J.R., Israel, H.W. (1986): Autofluorescent and ultraviolet-absorbing components in cell walls and papillae of barley coleoptiles and their relationship to disease resistance. *Can. J. Bot.* 64, 266-272.
- Alexander, D., Goodman, R.M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Ward, E., Ryals, J. (1991): Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7327-7331.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998): Reactive oxygen intermediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773-784.
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. (1999): Short Protocols in Molecular Biology, fourth Edition, ISBN 0-471-32938-X
- Beckhove, U. (1995): Cytologische und molekulare Untersuchungen zur erworbenen Resistenz im System Gerste/Gerstenmehltau (*Hordeum vulgare* L./*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). Diplomarbeit RWTH Aachen.
- Beckhove U., Kogel K.-H., Schmelzer E. (1996): Acquired resistance in barley: Early accumulation of the potentiometric dye DIOC6 in cytoplasmic aggregations beneath the primary germ tube of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in barley coleoptiles induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds. 11th International Symposium. Ed Lyr H, Intercept Andover, pp 475-491.
- Beßer, K., Jarosch, B., Langen, G., Kogel, K.-H. (2000): Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Molecular Plant Pathology* 1, 277-286.
- Beßer, K. (2001): Chemisch Induzierte Resistenz im Pathosystem Gerste-Echter Gerstenmehltau: Identifizierung differenziell exprimierter Gene der Gerste. Dissertation JLU Gießen.
- Bestwick, C.S., Bennett, M.H., Mansfield, J.W., (1995): *Hrp* mutant of *Pseudomonas syringae* pv *phaeseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* 108, 503-516.

- Bourke, Austin (1993): The visitation of god. The potato and the great Irish famine. The Lilliput Press Ltd., Dublin, Ireland, ISBN: 0 946640 93 9.
- Bowles, D.J. (1990): Defence-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 873-907.
- Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A.S., Klessig, D.F., Dong, X. (1994): A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1845-1857.
- Boyd, L.A., Smith, P.H., Green, R.M., Brown, J.K.M. (1994): The relationship between the expression of defense-related genes and mildew development in barley. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7 (3), 401-410.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BRAUN, U. (1995): The powdery mildews (*Erysiphales*) of Europe. Gustav Fischer Verlag, New York.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R., Lamb, C. (1994): Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6, 1703-1712.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A., Osborn, R.W. (1995): Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108, 1353-1358.
- Brunner, F., Stinzi, A., Fritig, B., Legrand, M. (1998): Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant J.* 14, 225-234.
- Bryngelsson, T., Green, B. (1989): Characterisation of a pathogenesis-related, thaumatin-like protein isolated from barley challenged with an incompatible race of mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35, 45-52.
- Bryngelsson, T., Sommer-Knudsen, J., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Ek, B., Thordal-Christensen, H. (1994): Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis-related proteins from barley. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 267-275.
- Büsches, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F., Schulze-Lefert, P. (1997): The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88, 695-705.
- Cao, H., Li, X., Dong, X. (1998): Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6531-6536.

- Carbone, D., Arnaudi, C., (1930): L'immunità nelle piante. Monographie dell'Istituto Sieroterapico Milanese, Mailand.
- Carmona, M.J., Molina, A., Fernández, J.A., López-Fando, J.J., García-Olmedo, F. (1993): Expression of the  $\gamma$ -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J.* 3, 457-462.
- Carver, T.L.W., Lyngkjær, M.F., Neyron, L., Strudwicke, C.C. (1999): Induction of cellular accessibility and inaccessibility and suppression and potentiation of cell death in oat attacked by *Blumeria graminis* f. sp. *avenae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 183-196.
- Chaudhry, B., Muller-Uri, F., Cameron-Mills, V., Gough, S., Simpson, D., Skriver, K., Mundy, J. (1994): The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant J.* 6, 815-824.
- Chester, K. S. (1933): The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quart. Rev. Biol.* 8, 275-324.
- Cho, B.H., Smedegård-Petersen, V. (1986): Induction of resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in near-isogenic barley lines. *Phytopathol.* 76, 301-305.
- Claes, B., Dekeyser, R., Villarroel, R., van den Bulcke, R., Bauw, G., van Montagu, M., Caplan, A. 1990: Characterisation of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. *Plant Cell* 2, 19-27.
- Cohen, Y., Gisi, U., Moesinger, E. (1991): Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38, 255-263.
- Cohen, Y., Niderman, T., Moesinger, E., Fluhr, R. (1994): Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 104, 59-66.
- Cohen, Y. (1995): Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: Lyr, H., Russell, P.E., Sisler, H.D. (eds.), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, Intercept, Andover, UK, pp 461-466.
- Collinge, D.B., Gregerson, P.L., Thordahl-Christensen, H. (2001): The nature and role of defence response genes in cereals. in: Belanger, R.R., Bushnell, W.R. (eds.), *The powdery mildew: A comprehensive treatise*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S., Kohler, A. (2001): Priming as a mechanism in induced systemic resistance in plants. *Europ. J. Plant Pathol.* 107, 113-119.
- Cordero, M.J., Raventós, D., San Segundo, B. (1994): Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *Plant J.* 6, 141-150.

- de Pater, B.S., Schilperoort, R.A. (1992): Structure and expression of a root specific rice gene. *Plant. Mol. Biol.* 18, 161-164.
- de Wit, P.J.G.M. (1997): Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Science* 2, 452-458.
- Dudler, R. (1997): Krankheitsresistenz bei Pflanzen. *Botanica Helvetica* 107, 151-170.
- Ellingboe, A.H. (1972): Genetics and physiology of primary infection by *Erysiphe graminis*. *Phytopathol.* 62, 401-406.
- English, J., Bonner, J., Haagen-Smit, A.J. (1939): Structure and synthesis of a plant wound hormone. *Science* 90, 329.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P., Raskin, I. (1992): Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction in tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2480-2484.
- Enyedi, A.J., Raskin, I. (1993): Induction of UDP-glucose: salicylic acid glucosyl-transferase activity in tobacco mosaic virus-inoculated tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. *Plant Physiol.* 101, 1375-1380.
- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H. (1997): Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9, 509-520.
- Farmer, E.E., Ryan, C.A. (1992): Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4, 129-134.
- Felsenstein, F.G. (1991): Virulenz und Fungizidsensivität des Weizenmehltaus *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Marchal, in Europa. Dissertation an der TU München.
- Feussner, I., Hause, B., Vörös, K., Parthier, B., Wasternack, C. (1995): Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *Plant J.* 7, 949-957.
- Flor, H.H. (1946): Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. *J. Agricult. Res.* 73, 335-357.
- Flor, H.H. (1955): Host-parasit interactions in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathol.* 45, 680-685.
- Flor, H.H. (1956): The complementary genetic system in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8, 29-54.
- Flor, H.H. (1971): Current status of the gene for gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296.
- Franke, G. (1998): Früchte der Erde. Verlag Henry Deutsch.

- Freialdenhoven, A., Peterhänsel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F., Schulze-Lefert, P. (1996): Identification of genes required for the function of non-race-specific mlo resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* 8, 5-14.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Gut-Rella, M., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Ukness, S., Métraux, J.-P., Kessmann, H., Ryals, J. (1996): A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10, 61-70.
- Gäumann E. (1946): *Pflanzliche Infektionslehre*. Basel, Birkhäuser.
- Gausing, K. (1987): Thionin genes specifically expressed in barley leaves. *Planta* 171, 241-246.
- Görg, R., Hollricher, K., Schulze-Lefert, P. (1993): Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the *Mlg* resistance locus in barley. *Plant J.* 3, 857-866.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.-H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1996): Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629-643.
- Gregersen, P.L., Thordal-Christensen, H., Förster, H., Collinge, D.B. (1997): Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (syn. *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51, 85-97.
- Hammerschmidt, R. (1993): The nature and generation of systemic signals induced by pathogens, arthropod herbivores, and wounds. *Advances in Plant Pathol.* 10, 307-337.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1996): Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Hause, B.; Vörös, K.; Kogel, K.-H.; Beßer, K.; Wasternack, C. (1999): A jasmonate-responsive lipoxygenase of barley leaves is induced by plant activators but not by pathogens. *J. Plant Physiol.* 154, 459-462.
- Heath, M.C. (1974): Light and electron microscopic studies of the interaction of host and nonhost plants with cowpea rust – *Uromyces phaseoli* var. *vignae*. *Physiol. Plant Pathol.* 4, 403-414.
- Heath, M.C. (1981): A generalised concept of host-parasite specificity. *Phytopathol.* 71, 1121-1123.
- Heath, M.C. (1987): Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal invaders. *Can. J. Plant Pathol.* 9, 389-397.
- Heath, M.C. (1991): The role of gene-for-gene interactions in the determination of host species specificity. *Phytopathol.* 81, 127-130.

- Heath, M.C. (2000): Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin Plant Biol.* 3, 315-319.
- Heitefuss, R. (2001): Defence reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. *Naturwissenschaften* 88, 273–283
- Hermansen, J.E., Torp, U., Prahm, L.P. (1978): Studies of transport of live spores and of cereal mildew and rust fungi across the North Sea. *Grana* 17, 41-46.
- Hildebrand, D.F. (1989): Lipoxygenases. *Physiol. Plantarum* 76, 249-253.
- Hoffmann, G.M., Schmutterer, H. (1983): Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Hoffmann, G.M., Schmutterer, H. (1999): Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. 2. ed., Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Horino, O. (1976): Induction of bacterial leaf blight resistance by incompatible strains of *Xanthomonas oryzae* in rice. in: *Biochemistry and Cytology of Plant Parasite Interactions.*, Tomiyama, K., Daly, J., Uritani, I., Ohu, H., Ouchi, S. (eds.), Tokyo, Kondansha Ltd, pp 43-55.
- Hückelhoven, R. (1999): Untersuchungen zur Rolle reaktiver Sauerstoffintermediate in der Resistenz der Gerste gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz. Dissertation JLU Gießen.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C., Kogel, K.-H. (1999): Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* 119, 1251-1260.
- Hwang, B.K., Heitefuss, R. (1982): Induced resistance of spring barley to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Phytopathol. Z.* 103, 41-47.
- Hwang, B.K., Sunwoo, J.Y., Kim, Y.J., Kim, B.S. (1997): Accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- $\beta$ -amino-butyrac acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51, 305-322.
- Hyde, P.M., Colhoun, J. (1975): Mechanisms of resistance of wheat to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopath. Z.* 82, 185-206.
- Jach, G., Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, L., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., Maas, C. (1995): Enhanced quantitative resistance against fungal diseases by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 97-109.

- Jarosch, B., Beckhove, U., Schiffer, R., Heise, S., Kreuzaler, F., Kogel, K.-H. (1997): A common basis of genetically based and induced resistance in cereals: New approaches for the assesment of reliable assay for chemical inducers. In: *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens*, (eds.), Dehne *et al.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 229-235.
- Jørgensen, J.H. (1988): *Erysiphe graminis*, powdery mildew of cereals and grasses. *Adv. in Plant Pathol.* 6, 137-157.
- Jørgensen, J.H. (1992): Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63, 141-152.
- Karunanandaa, B., Singh, A., Kao, t. (1994): Characterisation of a predominantly pisti-expressed gene encoding a  $\gamma$ -thionin-like protein of *Petunia inflata*. *Plant. Mol. Biol.* 26, 459-464.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Martzke, T., Herzog, J., Ward, E.R., Uknes, S.J., Ryals, J.A. (1994): Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 439-459.
- Kessmann, H., Staub, T., Oostendorp, M., Ryals, J.A. (1994): Activation of systemic acquired resistance in plants. *Europ. J. Plant Pathol.* 100, 359-369.
- Kessmann, H., Oostendorp M., Staub, T., Görlach, J., Friedrich, L., Lawton, K., Ryals, J.A. (1996): CGA 245704, mode of action of a new plant activator. in: Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, British Crop Protection Council, Farnham, UK, pp 961-966.
- Koga, H., Bushnell, W.R., Zeyen, R.J. (1990): Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Can. J. Bot.* 68, 2344-2352.
- Kogel, K.-H., Beckhove, U., Drescher, J., Münch, S., Rommé, Y. (1994): Acquired resistance in barley: The resistance mechanism induced by 2,6-DCINA is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiol.* 106, 1269-1277.
- Kogel, K.H., Ortel, B., Jarosch, B., Atzorn, R., Schiffer, R., Wasternack, C. (1995): Resistance in barley against powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) is not associated with enhanced levels of endogenous jasmonates. *Eur. J. Plant Pathology* 101, 319-332.
- Kolbe, W., Bussmann, R., Winter, F. (1984): *Landbau und Ernährung*. Rhein. Landw. Verlag, Bonn.
- Komura, T., Kobayashi, I., Yamaoka, N., Kunoh, H. (1990): Induced accessibility and enhanced inaccessibility at the cellular level in barley coleoptiles. VIII. Cytological evidence for suppressor(s) of host inaccessibility from *Erysiphe graminis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37, 409-416.

- Kuč, J. (1995): Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 275-297.
- Langcake, P., Wickens, S.G.A. (1975): Studies on the action of dichlorocyclopropanes on the host-parasite relationship in rice blast disease. *Physiol. Plant Pathol.* 7, 113-126.
- Langen, G., Beckhove, U., Stein, E., Pons-Kühnemann, J., Kogel, K.-H. (2001): Induced resistance in barley to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* is under independent control by a papilla and a cell death mechanism. in Vorbereitung.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T and Ryals, J. (1996): Bezothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* 10, 71-82.
- Lawton, K.A., Potter, S.L., Uknes, S., Ryals, J. (1994): Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* 6, 581-588.
- Lee, J., Parthier, B., Löbner, M. (1996): Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: Identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta* 199, 625-632.
- Limpert, E. (1987): Frequencies of virulence and fungicide resistance in European barley mildew population in 1985. *J. Phytopath.* 119, 298-311.
- Madamanchi, N.R. and Kuč, J. (1991): Induced systemic resistance in plants. in: Cole, G.T., and Hoch, H.C. (eds.), *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Press, New York, pp 347-362.
- Mauch, F., Kmecl, A., Schaffrath, U., Volrath, S., Görlach, J., Ward, E., Ryals, J., Dudler, R. (1997): Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat. *Plant Physiol.* 114, 1561-1566.
- Mauch-Mani, B. (1999): *Arabidopsis*-pathogen interaction: a model system for the analysis of acquired resistance. *Proceedings 14th Int. Plant Protection Congress, Jerusalem*, p 131.
- Métraux, J.-P., Ahl-Goy, P., Staub, T., Speich, J., Steinemann, A., Ryals, J., Ward, E. (1991): Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Vol. 1*. Hennecke, H. and Verma, D.P.S. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, pp 432-439.
- Moerschbacher, B.M., Noll, U., Gorrichon, L., Reisener, H.J. (1990): Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to steam rust. *Plant Physiol.* 93, 465-470.
- Molina, A., Görlach, J., Volrath, S., Ryals, J. (1999): Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but do not respond to activators of systemic acquired resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 53-58.

- Morris, S.W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C.C., Frederiksen, R.A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S., Uknes, S. (1998): Induced resistance response in maize. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 643-658.
- Mucharromah, E., Kuć, J. (1991): Oxalate and phosphates induce systemic resistance against diseases caused by fungi, bacteria and viruses in cucumber. *Crop Protection* 10, 265-270.
- Muradov, A., Petrasovits, L., Davidson, A., Scott, K.J. (1993): A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley. *Plant Mol. Biol.* 23, 439-442.
- Muthukrishnan, S., Liang, G.H., Trick, H.N., Gill, B.S. (2001): Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64, 93-114.
- Niemann, M. (1993): Systemisch Induzierte Resistenz im Wirt-Parasit-System Gerste-Echter Mehltau (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*): Einflussfaktoren und physiologische Veränderungen. Dissertation, Uni Göttingen.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stinzi, A., Legrand, M., Fritig, B., Möisinger, E. (1995): Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal; isolation and characterisation of three 14-kilodalton proteins of tomato and a basic PR-1 protein of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora investans*. *Plant Physiol.* 108, 17-27.
- Oerke, E.-C., Weber, A., Dehne, H.-W., Schönbeck, F. (1994): Trends and changes in crop production and losses since 1965. In: *Crop production and crop protection*. Oerke, Dehne, Schönbeck and Weber (eds.), Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande, p 743.
- Oostendorp, M., Kessmann, H., Friedrich, I., Geissmann, a., Görlach, J., Hengy, G., Nordmeyer, D., Reist, R., Ruess, W., Staub, T. (1996): Influence of plant activator BION<sup>®</sup> and of triazole-fungicides on plant defence mechanisms. *Gesunde Pflanze* 7, 260-264.
- Ouchi, S., Oku, H., Hibino, C. (1976): Localization of induced resistance and susceptibility in barley leaves inoculated with the powdery mildew fungus. *Phytopathol.* 66, 901-905.
- Ouchi, S., Oku, H., Hibino, C., Akiyama, I. (1974): Induction of accessibility and resistance in leaves f barley by some races of *Erysiphe graminis*. *Phytopathol. Z.* 79, 24-34.
- Oswald, E., Elstner, E. F. (1984): Bakterien und Pilze als Parasiten. in: Hock, B., Elstner, E. F. (eds.), *Pflanzentoxikologie – Der Einfluß von Schadstoffen und Schadwirkungen auf Pflanzen*. Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich, pp 241-282.
- Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C. (1999): Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Science* 4, 52-58.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, N., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C. (1998): A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1571-1580.

- Powers, H.R., Sando, W.J. (1957): Genetics of host-parasit relationships in powdery mildew of wheat. *Phytopathol.* 47, 453-461.
- Rancé, I., Fournier, J., Esquerré-Tugayé, M.-T. (1998): The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6554-6559.
- Rauscher, M., Adam A.L., Wirtz, S., Guggenheim, R., Mendgen, K., Deising, H.B. (1999): PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant J.* 19, 625-633.
- Reisener, H. J., Scheinpflug, H. (1993): Warum phytopathologische Forschung an der RWTH? - Situation der Nahrungsmittelproduktion und die Bedeutung der Pflanzenkrankheiten. *RWTH Themen* 2, 6-7.
- Roberts, T.R., Hutson, D.H. (1999): Metabolic pathways of agrochemicals. Part 2: Insecticides and Fungicides. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Rommé, Y. (1997): Molekulare Untersuchungen zur Interaktion von Gerste und Gerstenmehltau *Hordeum vulgare* L./*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Dissertation, RWTH Aachen.
- Rosahl, S. (1996): Lipoxygenases in plants - their role in development and stress response. *Z. Naturforsch. Sect. C: J. Biosci.* 51, 123-138.
- Ross, A.F. (1961): Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology* 14, 340-358.
- Ryals, J., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M.D. (1996): Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Salaman, R., Redcliffe N. (1985): The history and social influence of the potato. Cambridge University Press, Cambridge- New York - Port Chester - Melbourne - Sydney, ISBN: 0 521 31623 5.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Schaffrath, U., Freydl, E., Dudler, R. (1997): Evidence for different signaling pathways activated by inducers of acquired resistance in wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 779-783.
- Schaffrath, U., Zabbai, F., Dudler, R. (2000): Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. *Eur. J. Biochem.* 267, 5935-5942.
- Scheel, D. (1998): Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 305-310.

- Schiffer, R. (1998): Cytologische, molekulare und biochemische Analyse der Funktion des *Mla-12* Locus der Gerste. Dissertation RWTH Aachen.
- Schlösser, E. (1983): Allgemeine Phytopathologie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Schlösser, E. (1997): Allgemeine Phytopathologie. 2nd edition, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schneider, M., Schweizer, P., Meuwly, P., Métraux, J.-P. (1996): Systemic acquired resistance in plants. Intern. Review Cytology 168, 303-340.
- Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., Van Camp, W., Inze, D., Langebartels, C., Sandermann, H. (1998): Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco BelW3. Plant J. 16, 235-245.
- Schuchert, W., Meyer, C. (1992): Pflanzenproduktion und Biotechnologie. MPIZ, Köln.
- Schweizer, P., Hunziker, W., Mössinger, E. (1989): Complementary DNA cloning, *in vitro* transcription and partial sequence analysis of messenger RNA from winter wheat *Triticum aestivum* L. with induced resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. Plant. Mol. Biol. 12, 643-654.
- Schweizer, P., Buchala, A., Métraux, J.P. (1997): Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichlorisonicotinic acid. Plant Physiol. 115, 61-70.
- Scopes, RK (1988): Protein Purification: Principles and Practice. Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, London, Paris, Tokyo, p 306.
- Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A., García-Olmedo, F. (1999): Snakin-1, a peptide from potato that is active against pathogens. Mol. Plant Microbe Interact. 12, 16-23.
- Siegrist, J., Orober, M., Buchenauer, H. (2000):  $\beta$ -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation on salicylic acid. Physiol. Mol. Plant Pathol. 56, 95-106.
- Smith, J.A., Métraux, J.-P. (1991): *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* induces resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. Physiol. Mol. Plant Pathol. 39, 451-461.
- Song, S.K., Choi, Y., Moon, Y.H., Kim, S.G., Choi, Y.D., Lee, J.S. (2000): Systemic induction of a *Phytolacca insularis* antiviral protein gene by mechanical wounding, jasmonic acid and abscisic acid. Plant Mol. Biol. 43, 439-450.
- Steiner, U., Oerke, E.C., Schönbeck, F. (1988): Zur Wirksamkeit der induzierten Resistenz unter praktischen Anbaubedingungen. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 95, 506-517.
- Steiner, U., Schönbeck, F. (1997): Induced resistance. in: Hartleb, H., Heitefuss, R., Hoppe, H.H. (eds.), Resistance of crop plants against fungi. Fischer, Jena, pp 272-297.

- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J.-P. (1997): Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 235-270.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M., Lappi, D.A. (1992): Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10, 405-12.
- Tosi, L., Luigetti, R., Zizzerini, A. (1998): Induced resistance against *Plasmopara heliathi* in sunflower plants by DL-beta-amino-n-butyric-acid. *J. Phytopathol.* 146, 295-299.
- Uknes, S.J., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., Ryals, J. (1992): Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4, 645-656.
- Vallélian-Bindschedler, L., Métraux, J.-P., Schweizer, P. (1998): Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense-gene activation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 702-705.
- van Loon, L.C., Gerritsen Y.A.M. (1989): Protease activity and pathogenesis-related proteins in virus infected Samsun NN tobacco leaves. *Plant Sci.* 63, 141-150.
- van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V. (1994): Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant. Mol. Biol.* 12, 245-264.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. (1998): Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453-483.
- van Loon, L.C. (1999): Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. in: Datta, S.K., Muthukrishnan. S. (eds.), *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1-19.
- van Loon, L.C., van Strien, E.A. (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85-97.
- van der Plank, J.E. (1984): *Disease resistance in plants*. 2nd edition, Academic Press, Orlando, USA.
- van Wees, S.C., de Swart, E.A., van Pelt, J.A., van Loon, L.C., Pieterse, C.M. (2000): Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8711-8716.
- Verberne, M.C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Mercado-Blanco, J., Lindthorst, H.J. (2000): Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotechnol.* 18, 779-783.

- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J. (1994): Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6, 959-965.
- Vörös, K., Feussner, I., Kuhn, H., Lee, J., Graner, A., Lobler, M., Parthier, B., Wasternack, C. (1998): Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. *Eur. J. Biochem.* 251, 36-44.
- Wäspi, U., Schweizer, P., Dudler, R. (2001): Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew. *Plant Cell* 13, 153-161.
- Wantanabe, T., Sekizawa, Y., Shimura, M., Suzuki, Y., Matsumoto, K., Iwata, M., Mase, S. (1979): Effects of probenazol (Orycemate) on rice plants with references to controlling rice blast. *J. Pesticide Sci.* 4, 53-59.
- Ward, E.R., Ukness, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Al-Goy, P., Métraux, J.-P., Ryals, J. (1991): Coordinate Gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- Weichert, H., Stenzel, I., Berndt, E., Wasternack, C., Feussner, I. (1999): Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves - preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS letters* 464, 133-137.
- Weymann, K., Hunt, M., Uknes, S., Neuenschwander, U., Lawton, K., Steiner, H.-Y., Ryals, J. (1995): Suppression and restoration of lesion formation in *Arabidopsis lsd* mutants. *Plant Cell* 7, 2013-2022.
- White, R.F. (1979): Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco. *Virology* 99, 410-412.
- Wiese, M.V. (1977): Compendium of wheat diseases. Am. Phytopath. Soc., St. Paul, Minnesota.
- Yalpani, N., Shulaev, V., Raskin, I. (1993): Endogenous salicylic acid levels correlate with the accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathol.* 83, 702-708.
- Zimmerli, L., Jakob, G., Métraux, J.-P., Mauch-Mani, B. (2000): Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by  $\beta$ -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12920-12925.

## Publikationen

- Kogel K.-H., Beckhove U., Dreschers J., Münch S., Rommé Y. (1994): Acquired resistance in barley: Analysis of the interaction with powdery mildew reveals the mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid as a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific resistance. *Plant Physiol.* 106, 1269-1277.
- Beckhove U., Kogel K.-H., Schmelzer E. (1996): Acquired resistance in barley: Early accumulation of the potentiometric dye DIOC6 in cytoplasmic aggregations beneath the primary germ tube of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* in barley coleoptiles induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds. 11th International Symposium.* Ed Lyr H, Intercept Andover, pp 475-481.
- Görlach J., Volrath S., Oostendorp M., Kogel K.-H., Beckhove U., Staub T., Ward E., Kessmann H., Ryals J. (1996): Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates induced systemic resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629-643.
- Beckhove U., Kogel K.-H. (1996): Chemisch Induzierte Resistenz in Weizen: Eine cytologische Bewertung der Wirkungsweise eines Benzothiadiazols im Weizen-Weizenmehltau-System. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst.* 321, p 265.
- Jarosch B., Beckhove U., Schiffer R., Heise S., Kreuzaler F., Kogel K.-H. (1997): A common basis of genetically based and induced resistance in cereals: New approaches for the assessment of reliable assay for chemical inducers. *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens*, (eds.) Dehne et al., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 229-235.
- Schiffer R., Görg R., Jarosch B., Beckhove U., Bahrenberg G., Kogel K.-H., Schulze-Lefert P. (1997): Tissue dependence and differential cordycepin sensitivity of race-specific resistance responses in the barley-powdery mildew interaction. *Mol. Plant Microb. Interact.* 10, 830-839.
- Kogel K.-H., Beckhove U., Jarosch B., Hückelhoven R., Schiffer R., Beßer K., Langen G., Korell M. (1998): Die Pflanze wehrt sich selbst. Resistenzaktivierung von Kulturpflanzen. *Spiegel der Forschung, JLU Gießen*, 15. Jahrgang, Nr. 2, 54-61.
- Beckhove U., Scheer C., Korell M. (2000): Die Wirkung verschiedener Fungizide auf Getreide-Mehltau. *Novartis Agroreport Getreide* 3/2000, 40-42.
- Kumar J., Hückelhoven R., Beckhove U., Nagarajan S., Kogel K.-H. (2001): A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxin. *Phytopathol.* 91, 127-133.
- Beckhove U., Langen G., Stein E., Pons-Kühnemann J., Kogel K.-H. (2001): Induced resistance in barley to *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* is under independent control by a papilla and a cell death mechanism. in Vorbereitung.

## Danksagung

Herrn Professor Karl-Heinz Kogel danke ich für die Überlassung des Themas, seine hervorragende Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft und vor allem für das Vertrauen, welches er in den vielen Jahren unserer Zusammenarbeit in Aachen und Gießen, in meine Person gesteckt hat.

Bei Herrn Professor J. E. Aart van Bel bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Referates und die konstruktive Kritik, die viel zum Verständnis dieser Arbeit beigetragen hat.

Bettina Hause und Elmon Schmelzer danke ich für ihre Hilfe und ihr Bemühen mich in die Geheimnisse der *in situ* Hybridisierungen einzuweihen. Ohne ihre Mithilfe wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ruth Schiffer, Birgit Jarosch und Ralph Hückelhoven danke ich für ihre Freundschaft und dafür, daß sie mich auf dem anfangs beschwerlichen Gang "in die Fremde" begleitet haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Phytopathologie und Angewandte Zoologie für die stete Hilfsbereitschaft und eine hervorragende Arbeitsatmosphäre, die viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ralph Hückelhoven und Kathrin Michel danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinen Freunden, die nie ihre Zuversicht auf ein erfolgreiches Gelingen dieser Arbeit verloren haben, mich stets unterstützten und es geschafft haben, mich immer wieder zu motivieren.

Der größte Dank gebührt jedoch meiner lieben Freundin Catrin, die auf so manchen Urlaub verzichten mußte und in all den Jahren immer versucht hat auch einen Vorteil in einer doppelten Haushaltsführung zu sehen.