

Untersuchungen zur
induzierten Resistenz
an *Vitis spec.*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde der Biologischen
Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

vorgelegt von
Tobias Seibicke

April 2002

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Wirt-Pathogen-Interaktionen	1
1.2	Präformierte Abwehrmechanismen	3
1.3	Induzierbare Abwehrmechanismen	4
1.3.1	Resistenzinduktoren	5
1.3.2	<i>PR</i> -Proteine („ <i>pathogenesis-related proteins</i> “).....	8
1.4	Allgemeiner Überblick über die Signaltransduktion der pflanzlichen Pathogenantwort	10
1.4.1	Salicylsäure (SA) als zentrales Molekül der induzierten Resistenz	12
1.5	DER WIRT - Die Weinrebe <i>Vitis vinifera L.</i>	13
1.6	DAS PATHOGEN - <i>Plasmopara viticola</i>	15
1.7	Zellsuspensionskulturen von <i>Vitis spec.</i> als Modellsystem pflanzlicher Abwehrmechanismen	17
1.8	Ziele der Arbeit	18
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Anlegen, Anzucht und Induktion von <i>Vitis</i> -Zellkulturen	20
2.1.1	Anlegen der Kalluskulturen von <i>Vitis spec.</i>	20
2.1.2	Anzucht und Ernte der Zellsuspensionkulturen	20
2.1.3	Bestimmung des Zellfrischgewichtes.....	20
2.1.4	Induktion der Zellsuspensionskulturen durch Elicitoren.....	20
2.1.5	Die Protoplastierung von Zellen der Petersilie-Zellkultur	21
2.1.6	Die Protoplastierung von Zellen der <i>Vitis</i> -Zellkultur	22
2.1.7	Die Bestimmung der Zellzahl und Aliquotierung	22
2.1.8	Ernte von <i>Vitis</i> Protoplasten und Zellen.....	22
2.2	Transiente Transformation von <i>Vitis</i>-Protoplasten durch Elektroporation	22
2.2.1	Bestimmung der Transformationseffizienz durch <i>in situ</i> β -Glucuronidase-Nachweis	22
2.2.2	<i>In vitro</i> β -Glucuronidase-Assay (GUS-Assay).....	23
2.2.3	Mikroskopie und Dokumentation von GFP-Fusionsproteinen	23
2.3	Stabile Transformation von Zellkulturen der Weinrebe mit der <i>Particle Inflow Gun</i> (PIG)	23
2.3.1	Stabile Transformation und Selektion von <i>VrGL/LUC</i> Linien	25
2.4	Bestimmung der Luziferaseaktivität in Protoplasten und Zellen	25
2.4.1	<i>In vitro</i> Luziferase Nachweis.....	25
2.4.2	<i>In vivo</i> Luziferase Nachweis.....	26
2.5	Anzucht und Infektionen der Weinrebe	26
2.6	Nachzucht des Pathogens <i>Plasmopara viticola</i>	26
2.6.1	Infektionen von <i>Vitis</i> Pflanzen	26
2.6.2	Infektionen von Blattscheiben.....	27
2.7	DNA Isolation aus der Weinrebe	27
2.8	Isolierung von Gesamt-RNA aus der Weinrebe und deren Zellsuspensionskulturen	27
2.8.1	Elektrophoretische RNA-Auftrennung und Kapillarblot (<i>Northern Blot</i>)	28
2.8.2	Markierung genspezifischer DNA Sonden und DNA/RNA Hybridisierung	29
2.9	Techniken zur Manipulation von DNA Sequenzen	30
2.9.1	Restriktionsverdau von DNA (Vektoren und PCR-Produkte)	30
2.9.2	Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden.....	30
2.9.3	Reinigung von DNA.....	30
2.9.4	DNA-Fällung mit Ethanol	31

2.9.5	Ligation von Vektor und DNA-Fragment	31
2.9.6	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	31
2.9.7	Elution von DNA aus Agarose Gelen:	31
2.9.8	PCR von Plasmiden/DNA Fragmenten und von genomischer DNA	32
2.9.9	Sequenzierung	33
2.9.10	Isolierung genomischer DNA Sequenzen – <i>Genome Walking</i>	33
2.10	Transformation von Bakterien	33
2.10.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (XL-1 blue).....	33
2.10.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (BL 21)	33
2.10.3	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	34
2.10.4	Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Präp).....	34
2.10.5	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Megapräp).....	34
2.11	Expression von Fusionsproteinen	35
2.11.1	Überexpression und Aufarbeitung von His6- Fusionsprotein	35
2.11.2	Die Bestimmung des Proteingehalts mit Amidoschwarz	35
2.11.3	Gelsysteme zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen	36
2.11.4	Coomassie-Brillant-Blue Färbung.....	36
2.12	Extraktion von Salicylsäure (SA)	36
2.13	Untersuchungen zum Protoneninflux in Zellsuspensionskulturen	37
2.14	Mikroskopische Analysen	37
2.14.1	Entfärbung von Blattscheiben	37
2.14.2	Färbungen von <i>Plasmopara viticola</i>	38
2.14.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	38
2.14.4	Elektronenmikroskopie	38
2.15	Anhang zum Methodenteil:	38
2.15.1	Häufig verwendete Lösungen und Puffer:.....	38
2.15.2	Verwendete Plasmid-Vektoren.....	40
2.15.3	Verwendete E.coli-Stämme	40
2.16	Oligosequenzen:	40
2.16.1	Klonierungen und Primersequenzen:	40
2.16.2	Primer zur Amplifikation der Glukanase (<i>VGL</i>)	40
2.16.3	Primer zur Amplifikation der Chitinase III (<i>VCH</i>).....	40
2.16.4	Primer zur Amplifikation für ein Fragment der Kallosesynthase.....	41
2.16.5	Primer für die Klonierung der <i>VGL</i> Promotoren in den pLUC-Vektor	41
2.16.6	Primer für die Überprüfung der Integration des <i>VGL</i> Promotors in transgenen Zellkulturen	41
2.16.7	Primer für die Klonierung genomischer 5' Sequenzabschnitte	41
2.16.8	Primer für <i>GFP</i> -Konstrukte.....	42
2.16.9	Primer für pET 24 - Konstrukte	42
2.16.10	Primer für die Amplifizierung der 35S-Kan (npt II) Kassette	42
2.16.11	Primer für die <i>VGL</i> Promotordeletionskonstrukte.....	42
2.17	Protein- und DNA Größenmarker	42
2.18	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	43
3	ERGEBNISSE	44
3.1	Infektionen von <i>Plasmopara viticola</i> an <i>Vitis vinifera</i> und <i>Vitis rupestris</i>	44
3.2	Zellkulturen von <i>Vitis spec.</i>	45
3.2.1	Kallus-Kulturen	46
3.2.2	Zellsuspensionskulturen	46
3.2.3	Wachstum.....	47
3.3	Charakterisierung einer Glukanase (<i>VGL</i>) aus <i>Vitis vinifera</i>	47

3.3.1	Isolierung einer extrazellulären Glukanase (<i>VGL</i>)	47
3.3.2	Subzelluläre Lokalisation der <i>VGL</i>	49
3.3.3	Regulation der <i>VGL</i> -mRNA Akkumulation nach Infektionen durch <i>Plasmopara viticola</i>	49
3.3.4	Regulation der <i>VGL</i> -mRNA Akkumulation nach Infektionen durch <i>Uncinula necator</i>	55
3.3.5	Isolierung genomischer Sequenzen	55
3.4	Transiente und stabile Transformation von <i>Vitis rupestris</i> Zellkultur mit <i>VrGL/LUC</i>.....	60
3.4.1	Transiente Expression eines <i>VrGL/LUC</i> Reporterkonstrukts in Petersilie Protoplasten mittels Elektroporation	61
3.4.2	Transiente Expression eines <i>VrGL/LUC</i> Reporterkonstrukts in <i>Vitis</i> - Protoplasten.....	63
3.4.3	Ansätze zur stabilen Transformation von <i>Vitis rupestris</i> Zellsuspensionskulturen	65
3.4.4	Stabile Transformation von <i>Vitis rupestris</i> Zellen mit der <i>Particle Inflow Gun</i> (PIG).....	66
3.5	Charakterisierung der <i>VrGL/LUC</i> Expression ausgewählter Linien	70
3.5.1	Vergleich zwischen endogen regulierter <i>VGL</i> - und neu integriertem Luziferase Transkript	71
3.5.2	<i>In vivo</i> Analyse der Luziferaseexpression nach Stimulation der <i>VrGL/LUC</i> - Linie.....	72
3.5.3	Analyse des <i>VrGL</i> Promotors.....	80
3.5.4	Regeneration von transgenen Zellkulturen.....	82
3.6	Analysen zur Chitinase III.....	83
3.6.1	Regulation der <i>VCH</i> mRNA Akkumulation nach Infektionen durch <i>Plasmopara viticola</i>	84
3.6.2	Isolierung genomischer Sequenzen	87
3.7	Untersuchungen zu elicitorvermittelten Protonenflüsse in <i>Vitis</i>-Zellkulturen.....	88
3.7.1	pH-Wert Bestimmung in der <i>Vitis rupestris</i> Zellkultur nach Gabe von pep 13 und <i>HrpZ</i>	89
3.8	Untersuchungen von Resistenzinduktoren an Blattscheiben von <i>Vitis vinifera</i> gegen <i>Plasmopara viticola</i>.....	90
3.8.1	Resistenzinduktion durch β -Aminobuttersäure (BABA) an Gewächshauspflanzen von <i>Vitis vinifera</i>	92
3.8.2	Resistenzinduktion durch β -Aminobuttersäure (BABA) an <i>Vitis vinifera</i> Freilandpflanzen	93
3.8.3	Einfluss von BABA auf das interzelluläre Wachstum von <i>Plasmopara viticola</i> und Zellwandveränderungen von <i>Vitis vinifera</i>	95
3.8.4	Identifizierung eines Kallosesynthase- cDNA-Fragmentes aus <i>Vitis vinifera</i>	101
4	DISKUSSION.....	105
4.1	Etablierung von <i>Vitis</i> Zellkulturen	106
4.2	<i>PR</i>-Gene in <i>Vitis spec.</i>	106
4.3	Vergleich der <i>PR</i>-Gen Aktivierung unterschiedlich resistenter <i>Vitis</i>-Arten	107
4.3.1	Die Regulation der Glukanase (<i>VGL</i>) nach Pathogenbefall in <i>Vitis spec.</i>	107
4.3.2	Die Regulation der basischen Chitinase III (<i>VCH</i>) nach Pathogenbefall in <i>Vitis spec.</i>	109
4.4	Die Etablierung eines <i>in vivo VrGL/LUC</i> Reportersystems in <i>Vitis rupestris</i> Zellsuspensionskulturen.....	111
4.4.1	Transiente Transformation des <i>VrGL/LUC</i> -Plasmids in Protoplasten	111

4.4.2	Stabile Transformation der <i>Vitis rupestris</i> Zellsuspensionskultur	112
4.5	Charakterisierung der VrGL/LUC Expression der transgenen Linen.....	112
4.6	Promotoranalysen.....	114
4.6.1	Die VGL-Promotoren	114
4.6.2	Die VCH-Promotoren	117
4.7	Regeneration von transgener Weinrebe	117
4.8	Untersuchungen zu elicitorvermittelten Protonenflüssen der Zellsuspensionskultur.....	118
4.9	Resistenzbildung der Weinrebe gegenüber <i>Plasmopara viticola</i> nach Applikation verschiedener Resistenzinduktoren.....	118
4.9.1	Die Resistenzinduktion durch β -Aminobuttersäure (BABA)	119
5	ZUSAMMENFASSUNG	122
6	ANHANG	123
6.1	Klonierung und Expression eines Harpins (<i>HrpZ</i>) aus <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>.....	123
6.2	Untersuchungen zum Infektionsvorgang von <i>Plasmopara viticola</i>	123
6.3	Tabellenverzeichnis	126
6.4	Abbildungsverzeichnis	126
7	LITERATUR	133

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ABA	Abcisinsäure
BABA	beta-Aminobuttersäure
bp	Basenpaare
bZIP	basische Domäne/Leuzinzipper-Protein
BTH	Benzodiathiazol
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	komplementäre DNA
CPRF	<i>Common plant regulatory factor</i>
d	Tag
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
dpi	<i>day(s) post infection</i>
Etbr	Ethidiumbromid
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GUS	beta-Glucuronidase
h	Stunde
HIS	Histidin
hpi	hour(s) post infection
HR	Hypersensitive Reaktion
Hrp	Harpin (<i>hypersensitive response and pathogenicity</i>)
IAA	Indol-3-Essigsäure
INA	Dichlorisonikotinsäure
IPTG	Isopropyl-beta-thiogalactopyranosid
kDA	kilo Dalton
kb	kilo Basenpaare
LUC	Luziferase
min	Minute
NaSA	Natriumsalicylat
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
PIG	<i>Particle Inflow Gun</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde

SA	Salicylsäure
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
Tab.	Tabelle
VCH	<i>Vitis vinifera</i> Chitinase Klasse III
VGL	<i>Vitis vinifera</i> β -1,3 Glukanase
VrGL	<i>Vitis rupestris</i> Glukanase Promotor
VvGL	<i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau Glukanase Promotor
VvKS	<i>Vitis vinifera</i> Kallosesynthase
w/v	Gewicht pro Volumen

1 EINLEITUNG

Pflanzen müssen wie alle Lebensformen auf ihre Umweltbedingungen reagieren können. Zu diesen Reaktionen gehört auch die Abwehr von angreifenden Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen, Oomyceten und Tieren. Darum verfügen sie neben mechanischen, präformierten Barrieren über ein aktivierbares Potential von Abwehrmechanismen.

Wird die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gezielt durch äußere Faktoren verursacht, spricht man von induzierter Resistenz (SCHÖNBECK *et al.*, 1993). Als Induktoren dieser Resistenzen sind sowohl biotische Agenzien wie z. B. Pathogene, als auch physikalische und chemische Auslöser beschrieben (SCHÖNBECK *et al.*, 1993, KESSMANN *et al.*, 1994). Diese Resistenzinduktoren haben keine direkte biozide Wirkung auf die Krankheitserreger. Induzierte Resistenz als Pflanzenschutzprinzip stellt ein biologisches Verfahren dar und wird bereits im Weizenanbau eingesetzt (OOSTENDORP *et al.*, 2001).

Die Weinrebe *Vitis vinifera* L. ist seit Jahrtausenden eine wichtige Kulturpflanze im eurasischen Kulturraum. In der heutigen Zeit ist der Weinanbau auch in der neuen Welt und in Südafrika zu einer wichtigen Einnahmequelle geworden. Besonders die Rebenperonospora, verursacht von dem Pilz *Plasmopara viticola*, ist eine der häufigsten Krankheiten der Weinrebe in unseren Breitengraden. Obwohl die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln in vielen Fällen zu einer Entspannung der Lage geführt hat, ist dennoch die pflanzeneigene Abwehr und ihre gezielte Förderung aufgrund molekularbiologischer Erkenntnisse die zukunftsweisende Maßnahme.

1.1 Wirt-Pathogen-Interaktionen

Gelingt es Pathogenen eine Pflanze zu besiedeln und sich zu vermehren, so wird diese Wirtspflanze als anfällig (suszeptibel) bezeichnet. Pathogenität ist dabei die Fähigkeit eines Schaderregers, sich in seinem Wirt zu etablieren und sich von ihm zu ernähren - der Wirt stirbt letztlich ab. In diesem Fall wird auch von einer kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktion gesprochen (ELSTNER *et al.*, 1996). Die erfolgreiche Entwicklung einer Pflanzenkrankheit wird im wesentlichen darauf zurückgeführt, dass die Wirtspflanze das Pathogen entweder gar nicht oder nicht rechtzeitig erkennt, die präformierten Abwehrmechanismen unzureichend sind oder die Abwehrreaktionen zu spät bzw. gar nicht aktiviert werden (HAMMOND-KOSACK und JONES, 1996; DONG, 1998). Dabei kann die Fähigkeit eines Pathogens, die aktivierten Abwehrmechanismen der Pflanzen zu tolerieren, zu unterdrücken oder die Pflanze mit Hilfe von Toxinen oder Enzymen anzugreifen, erheblich zur erfolgreichen Besiedlung des Wirts beitragen (HAMMOND-KOSACK und JONES, 1996).

Erfüllt eine Wirtspflanze nicht die Nischenbedingungen für ein potentiell Pathogen oder kann sie die Angriffe erfolgreich abwehren, so ist die Pflanze resistent. In der Regel kommt

es dann nur zu sehr geringen Schädigungen, das Pathogen wird im Wachstum gehemmt und stirbt ab. Damit verfügt die Wirtspflanze über eine natürliche Resistenz gegenüber dem Schaderreger, die Wirt-Pathogen-Interaktion wird als inkompatibel bezeichnet. Eine inkompatible Interaktion wird häufig von einer hypersensitiven Reaktion (HR) begleitet, bei der die befallenen Zellen und eventuell Zellen in deren Nachbarschaft schnell absterben und Nekrosen makroskopisch sichtbar werden. Sichtbare Nekrosenbildung allein ist jedoch kein Indiz einer HR, da zum Teil auch nur eine einzelne befallene Zelle absterben kann und sich so der Wahrnehmung des Betrachters entzieht (CONRATH *et al.*, 2002; JOE KUC, persönliche Mitteilung). Noch vor wenigen Jahren wurde die HR als eine der möglichen Mechanismen von Resistenz diskutiert (HEATH *et al.*, 1980). Heute weiß man, dass die Erkennung eines Pathogens, über ein Resistenzgen (*R-Gen*) und die damit verbundene hypersensitive Reaktion eine Grundvoraussetzung einer Resistenzausbildung darstellt (DANDL *et al.*, 1996). Wird eine HR ausgebildet, so kommt es, neben dem programmierten Zelltod der betroffenen Zellen, zusätzlich zu einer schnellen Aktivierung von weiteren Resistenzfaktoren, wie die Induktion von *PR*-Proteinen (*pathogenesis related proteins*), z. B. Glukanasen und Chitinasen (HAMMOND-KOSACK und JONES, 1996; ELSTNER *et al.*, 1996). Ein wesentlicher Unterschied zwischen anfälligen und resistenten Pflanzen ist die zeitliche Wahrnehmung des eindringenden Pathogens und die schnelle und effektive Aktivierung von Abwehrmechanismen (YANG *et al.*, 1997).

Pflanzen, die natürlicherweise nicht von angreifenden Pathogenen kolonisiert werden, sind resistent. Hierbei spricht man von einer „Nicht-Wirts-Resistenz“ (*non-host-resistance*). Dieser Typ der Resistenz beruht in der Regel auf Resistenzfaktoren, die von den Pathogenen nicht einfach überwunden werden können (horizontale Resistenz). Grundlagen für die genetische Beschreibung dieser rassenspezifischen Resistenzen wurden in den 50er Jahren von FLOR gelegt (FLOR, 1946, 1956, 1971). FLOR verwendete physiologische Rassen des Rostpilzes *Melampsora lini* und isogene Linien von Flachs (*Linum usitatissimum*). Damit konnte er zeigen, dass nur dann eine inkompatible Interaktion auftritt, wenn ein Flachskultivar mit dominantem Resistenzgen (*R-Gen*) mit einem *M. lini*-Pathovar mit dominantem Avirulenzgen (*Avr-Gen*) interagiert (Gen-für-Gen-Hypothese). Dieser Resistenzmechanismus wurde zwischenzeitlich für eine Vielzahl von Wirt-Parasit Beziehungen gezeigt (STICHER *et al.*, 1997; ZIMMERLI *et al.*, 2000). Für eine spezifische Resistenz wird im einfachsten Fall angenommen, dass AvR-Genprodukte Signale darstellen, die durch spezifische Rezeptorstrukturen (*R-Gene*) von der Wirtspflanze erkannt werden und so eine Signalkaskade auslösen (Abb. 3). Als Folge kommt es zu Ionenflüssen über die Plasmamembran, zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und dem programmierten Tod befallener Zellen (HR). Zu den am besten untersuchten Avr-Proteinen gehören ein Protein (*pmg*) aus *Phytophthora megasperma* pv. *glycinea* und die bakteriellen Harpinproteine (*Hrp*) aus *Erwinia* und *Pseudomonas*. Untersuchungen an dem *pmg* Elicitor ergaben,

dass letztlich ein Peptid von 13 Aminosäuren (pep 13) für die Aktivierung des entsprechenden Rezeptors ausreichen.

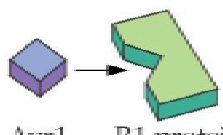
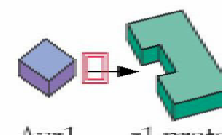
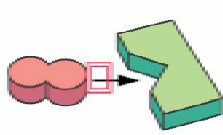
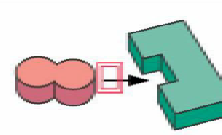
Pathogen Genotyp	Wirt - Pflanze Genotyp	
	R1	r1
<i>Avr1</i>	 <p>Avr1 R1 protein</p> <p>Keine Krankheit</p> <p>Pflanze und Pathogen sind inkompatibel</p>	 <p>Avr1 r1 protein</p> <p>Krankheit</p> <p>Pflanze und Pathogen sind kompatibel</p>
<i>avr1</i>	 <p>avr1 R1 protein</p> <p>Krankheit</p> <p>Pflanze und Pathogen sind kompatibel</p>	 <p>avr1 r1 protein</p> <p>Krankheit</p> <p>Pflanze und Pathogen sind kompatibel</p>

Abb. 1: Flor's Gen für Gen Modell. Für eine Ausbildung der Resistenz (Inkompatibilität) müssen komplementäre Paare dominanter Gene, eines beim Wirt und eines beim Pathogen zusammenkommen. Eine Veränderung, ein Fehlen eines Resistenzgens der Pflanze (R wird zu r) oder eines Avr Genes des Pathogens (Avr wird zu *avr*) führt zu Krankheit (kompatibel). (Nach BUCHANAN *et al.*, 2001, verändert)

Zwischen den zwei Typen der kompatiblen und inkompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktion gibt es verschiedene Zwischenstufen. Der Unterschied zwischen Suszeptibilität und Resistenz einer Pflanze gegenüber einem Pathogen besteht dabei nicht aus einem völligem Fehlen von Abwehrmechanismen, sondern liegt auch an der Geschwindigkeit bzw. Intensität der Abwehrreaktionen (ELSTNER *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 1997). Die Wechselbeziehungen zwischen Pflanze und Pathogen werden zusätzlich dadurch kompliziert, dass der Grad der Resistenz von weiteren Faktoren wie dem Alter und der Art des Gewebes (SCHLÖSSER, 1983), dem Ernährungszustand oder dem Hormonstatus der Pflanze abhängen kann (STICHER *et al.*, 1997; DOLORES *et al.*, 2001).

1.2 Präformierte Abwehrmechanismen

Phytopathogene Pilze können mechanisch die Oberflächenstrukturen von Pflanzen durchbrechen, wobei häufig Enzyme beim Penetrationsvorgang beteiligt sind (MENDGEN und DEISING, 1993; MENDGEN und DEISING, 1996). Dabei muss der Pilz präformierte strukturelle Barrieren wie die lipophile Wachsschicht der Epidermis (Kutikula) und die Zellwand überwinden. Die Kutikula als äußerste physikalische Barriere besteht aus Hydroxyfettsäuren, die mit Phenolen (Kutin) oder primären Alkoholen (Wachse) verestert sind.

Einige Pathogene nutzen natürliche Öffnungen (z. B. Spaltöffnungen), um in einen Wirt einzudringen. Diese Art des Penetrationvorganges nutzt auch *Plasmopara viticola* (s. Abb.

4). Dadurch werden erste strukturelle Barrieren umgangen. Jedoch müssen auch diese Pathogene mechanisch Strukturen überwinden, um eine Pflanze erfolgreich zu besiedeln. Als wichtige Barriere gilt die Zellwand, die äußerst komplex zusammengesetzt ist. Sie besteht aus Polysacchariden (Pektinen, Zellulose, Hemizellulose), Aminosäuren (hydroxyprolinreiche Glycoproteine) und Phenolen (Lignin, phenolische Ester). Manche Pathogene verfügen über lytische Enzyme (Zellulasen, Pektinasen), die Teile der Zellwand aufzulösen vermögen. Allerdings scheinen Zellulasen und Pektinasen keinen wesentlichen Beitrag zur Pathogenität eines Schaderregers beizutragen (WALTON, 1994). Vielmehr werden durch einen enzymatischen Verdau insbesondere der Pektinfraktion der Zellwand Oligogalakturonide freigesetzt, die als endogene Signale (Elicitoren) Abwehrreaktionen der Pflanze induzieren (EBEL and SCHEEL, 1992).

Präformierte Schutzmechanismen können neben mechanischen auch chemischen Ursprungs sein. Dazu gehören vor allem antibiotisch wirkende Produkte des Sekundärstoffwechsels, die in den Vakuolen gespeichert und in Zellwände eingelagert werden (MANSFIELD, 1983; MAHER *et al.*, 1994; OSBOURN, 1996). Auch niedermolekulare Substanzen wie cyanogene Glykoside, Terpene und Phenole, die nach Befall freigesetzt werden können, spielen eine Rolle (SCHLÖSSER, 1983; ELSTNER *et al.*, 1996). So scheint bei unreifen Weinbeeren der Gehalt an Proanthocyanidinen in der Beerenhaut ein begrenzender Faktor für den Befall durch *Botrytis cinerea* zu sein (STEIN 1984; STEIN und BLAICH, 1985).

1.3 Induzierbare Abwehrmechanismen

Gelangen dennoch Mikroorganismen in die Pflanze, so werden sie in der Regel von der Pflanze erkannt, und die Auslösung einer zeitlich und räumlich genau definierten pflanzlichen Abwehrantwort verhindert ihr Wachstum und ihre Vermehrung (SCHEEL, 1992; HAMMOND-KOSACK und JONES, 1996; SOMSSICH and HAHLBROCK, 1998). Dieses induzierte Abwehrprogramm setzt sich aus einer Vielzahl von Einzelreaktionen zusammen und wird über ein bisher nur unvollständig verstandenes Signalsystem ausgelöst (Abb. 3). Begrenzt auf die Infektionsstelle ist die hypersensitive Reaktion (HR). Dieses zentrale Element in der Abwehrreaktion vieler Pflanzen bewirkt das Absterben von Zellen in einem begrenzten Bereich rund um die Infektionsstelle und entzieht so dem Pathogen die Nahrungs- und Existenzgrundlage (GREENBERG, 1997). Im Gegensatz zu Nekrosen, die bei erfolgreicher Kolonisation einer Pflanze durch ein Pathogen beobachtet werden und ein Krankheitssymptom darstellen, ist der mit der HR assoziierte Zelltod ein aktiver Prozess der Pflanzenzelle und wird daher als programmierten Zelltod bezeichnet (DANGL *et al.*, 1996; GREENBERG, 1997; HEATH, 1998). Lokal auf die Infektionsstelle begrenzt kann man bei manchen pilzlichen Schaderregern auch eine Verstärkung der pflanzlichen Zellwände durch Auflagerung von Kallose beobachten. Die Bildung dieser zusätzlichen physikalischen Barriere geht auf eine Aktivierung einer β -(1,3)-Glukansynthase (Kallosesynthase)

zurück (KAUSS *et al.*, 1989). Da eine Pflanzenart auf den Befall verschiedener Pathogene oftmals mit den gleichen Abwehrantworten reagiert, ist in den meisten Fällen unbekannt, welche Abwehrreaktionen in einer bestimmten Wirt-Pathogen-Interaktion für die Resistenz notwendig sind und wo Redundanz besteht. Die einzelnen Komponenten der komplexen pflanzlichen Antwort sind jedoch bei verschiedenen Pathogenen unterschiedlich wirksam und für die Bekämpfung eines bestimmten Mikroorganismus wäre in den meisten Fällen nicht das gesamte Spektrum der induzierbaren Abwehrantwort notwendig (GLAZEBROOK und AUSUBEL, 1994; THOMMA *et al.*, 1998; KAMOUN *et al.*, 1999; MALECK und DIETRICH, 1999).

1.3.1 Resistenzinduktoren

Substanzen, wie Harpin-Proteine oder Salicylsäure (SA), die eine Resistenz in Pflanzen gegenüber Pathogenen erzeugen können, werden allgemein als Resistenzinduktoren bezeichnet. Die Einteilung dieser Substanzen in verschiedene Klassen ist nicht eindeutig definiert.

1.3.1.1 Elicitoren

In den 40er Jahren beschrieben Müller und Börger als auffälligsten Faktor der induzierten Abwehr nach einem Pilzbefall die Produktion von Phytoalexinen (MÜLLER und BÖRGER, 1940). Später wurde festgestellt, dass bereits Pilzbestandteile wie Zellwandfragmente ausreichen, um eine Abwehrantwort auszulösen (AYERS *et al.*, 1976; CRUICKSHANK und PERRIN, 1968). Für diese Substanzen wurde der Begriff des Elicitors eingeführt. Dabei wurden zunächst nur Substanzen, welche die Akkumulation von Phytoalexinen hervorrufen, als Elicitor bezeichnet. Heutzutage wird der Begriff des Elicitors allgemeiner gefasst und für biotische sowie abiotische Substanzen verwendet, die auch andere Abwehrreaktionen wie die Bildung von hydrolytischen Enzymen oder auch Zellwandverstärkungen induzieren können (EBEL und SCHEEL, 1992; SMITH, 1996).

Dieses Elicitor induzierte Abwehrprogramm wird erst ausgelöst, wenn die Pflanze ein eindringendes Pathogen wahrgenommen hat. Die Pathogenerkennung ist in der Regel receptorvermittelt und erfolgt über Bestandteile des Pathogens oder den befallenen Zellen selbst (EBEL und COSIO, 1994; HAHN, 1996; BOLLER, 1995; EBEL und SCHEEL, 1997; EBEL und MITHÖFER, 1998). Als aktive Komponenten wurden in der Vergangenheit Polysaccharid-, Polypeptid-, Glycoprotein- und Lipidelicitoren charakterisiert (BOSTOCK *et al.*, 1981; SHARP *et al.*, 1984; RICCI *et al.*, 1989; PARKER *et al.*, 1991). In der Plasmamembran einzelner Pflanzen konnten durch Bindungsstudien hochaffine Bindungsstellen für einige dieser Elicitoren nachgewiesen werden (COSIO *et al.*, 1990; NÜRNBERGER *et al.*, 1994; WENDEHENNE *et al.*, 1995; SHIBUYA *et al.*, 1996; HANANIA und AVNI, 1997). Leider ergaben bisher Untersuchungen solcher Elicitorrezeptoren keinen Aufschluss darüber, wie

durch sie das Signal zur Aktivierung der Pathogenabwehr ausgelöst wird. Es gibt Hinweise, dass es sich bei ihnen nicht um klassische Rezeptortypen wie Rezeptortyrosinkinasen oder Sieben-Helix-Rezeptoren handelt.

Ein sehr gut untersuchter Elicitor ist das *pmg* aus Zellwandfragmenten von *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*. Zunächst wurde aus dem Kulturfiltrat von *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* ein 42-kDa großes Glykoprotein aufgereinigt, welches Abwehrreaktionen in Petersiliezellen auslöste (DARVILL und ALBERSHEIM, 1984; SHARP *et al.*, 1984). Innerhalb dieses Glykoproteins konnte eine 13 Aminosäuren lange Peptidsequenz (pep 13) identifiziert werden, die notwendig und hinreichend für die Elicitoraktivität des Proteins ist (Nürnberg *et al.*, 1994). Pep 13 oder Proteine, die diese Motiv enthalten, lösen in Petersiliesuspensionskulturen die gleichen Abwehrantworten aus, wie das *Phytophthora* Kulturfiltrat oder das 42-kDa-Glykoprotein (NÜRNBERGER *et al.*, 1994).

Seit den frühen 80er Jahren wurden Gene isoliert, welche die Pathogenität von Bakterien gegenüber Pflanzen und Tieren beeinflussen (BARNY *et al.*, 1990; BEER *et al.*, 1991; LINDGREN *et al.*, 1988; BOUCHER *et al.*, 1986). Aus phytopathogenen Bakterien wie *Pseudomonas*, *Xanthomonas* und *Erwinia* wurde eine ganze Reihe verschiedener Elicitoren isoliert, die als Harpins (*Hrp-Hypersensitive response and pathogenicity*) bezeichnet wurden (HE *et al.*, 1993; ARLAT *et al.*, 1994; BAUER *et al.*, 1995; PRESTON *et al.*, 1995; CUI *et al.*, 1996; CHARKOWSKI *et al.*, 1998; KIM und BEER, 1998). Die Harpin-Genfamilie umfasst eine Vielzahl von bakteriellen Genen, die über einen Typ-III Sekretionsapparat aus der Zelle transportiert werden. In *Arabidopsis thaliana* induziert HrpN aus *Erwinia amylovora* eine Resistenz gegenüber den Pathogenen *Peronospora parasitica* und *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Gleichzeitig werden die *PR-Gene* *PR-1* und *PR-2* hochreguliert (DONG *et al.*, 1999). Harpin-Proteine können generell bei einer Vielzahl von Pflanzen Resistenzen gegen ein breites Spektrum von Pathogenen induzieren (WEI und BEER, 1996; QUI *et al.*, 1997). Werden HrpZ- oder HrpN-Proteine zu Tabak-Zellsuspensionskulturen gegeben, kann man eine Vielzahl von Reaktionen beobachten. Diese beinhalten Ionenströme über die Plasmamembran, Alkalisierung des Mediums, Depolarisation der Membran und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (BAKER *et al.*, 1993; HE *et al.*, 1994; POPHAM *et al.*, 1995; WEI *et al.*, 1993). In *Arabidopsis* Zellsuspensionskulturen führt die Behandlung mit HrpZ zum programmierten Zelltod (DESIKAN *et al.*, 1998). Diese Daten führen zu der Annahme, dass Harpins Signalkaskaden auslösen (s. Abb. 3) und dies zu einer Abwehrantwort führt (BOLLER und FELIX, 1996).

1.3.1.2 Pflanzenaktivatoren

In jüngster Zeit wurde über die resistenzinduzierende Wirkung der nicht-proteinogenen Aminosäure β -Aminobuttersäure (BABA) in verschiedenen Pflanzen berichtet, darunter auch eine Resistenzinduktion der Weinrebe gegen Infektionen von *Plasmopara viticola*

(OKA *et al.*, 1999; SIEGRIST *et al.*, 2000; ZIMMERLI *et al.*, 2000; JAKAB *et al.*, 2001). Das Spektrum an Pathogenen, gegen die Resistenzen nach Applikation von BABA ausgebildet werden ist überaus vielfältig und umfasst Oomyceten, Bakterien, Viren und Nematoden (COHEN, 2001; JAKAB *et al.*, 2001).

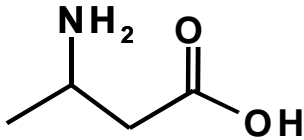


Abb. 2: Strukturformel von β -Aminobuttersäure (BABA)

BABA ist ein racemisches Gemisch aus dem R- bzw. S-Enantiomer, wobei nur die R-Form eine Resistenz induziert (COHEN, 1994; COHEN *et al.*, 1994). Dies deutet auf eine stereo-spezifische Affinität eines Rezeptors hin. Alle Versuche einen solchen Rezeptor zu isolieren sind bisher fehlgeschlagen. In Petersilie Zellkulturen können jedoch beide Enantiomere die Zellen sensibilisieren (JÜRGEN

SIEGRIST, persönliche Mitteilung). Dies könnte mit einer stereospezifischen Aufnahme von BABA in die Pflanzen zusammenhängen, die in Suspensionskulturen keine Rolle spielt. Diese Substanz kann innerhalb der Pflanzen basipetal, als auch acropetal transportiert werden (COHEN und GISI, 1994).

Der Wirkmechanismus von BABA scheint äußerst komplex. Eine Resistenz wird, gleich ob man die Pflanzen besprüht oder gießt, induziert (COHEN, 2001). Zudem schützt eine BABA Applikation Tomatenpflanzen noch 24 Stunden nach einer Infektion durch *Phytophthora infestans* (COHEN, 2001). In Tabak führt ein Besprühen der Blätter mit der Wirkstofflösung zur Induktion von *PR*-Proteinen, während diese Proteine nicht akkumulieren, wenn die Pflanzen mit der Lösung gegossen werden. In beiden Fällen sind die Pflanzen jedoch voll resistent gegen das gleiche Pathogenspektrum (COHEN, 1994). In Tomate führt sowohl das Besprühen, als auch das Gießen, zur Induktion von *PR*-Proteinen (COHEN *et al.*, 1994). *Arabidopsis* Pflanzen reagieren nicht mit einer Induktion von *PR*-Proteinen nach einer BABA Applikation, sind aber resistent gegen *Peronospora parasitica*. Auch *NahG*-Pflanzen, die eine bakterielle Salicylsäurehydroxylase exprimieren und somit nicht mehr in der Lage sind SA zu akkumulieren, sind resistent. In diesen Pflanzen wird die Bildung von Papillen beobachtet, die eine Penetration der Haustorien in die Zellen verhindern (ZIMMERLI *et al.*, 2000). Andererseits findet bei *Arabidopsis NahG*-Pflanzen keine Resistenzinduktion nach BABA Applikation gegenüber einer Infektion durch *Pseudomonas syringaea* statt, während Wildtyp Pflanzen resistent werden. Werden Petersiliezellkulturen mit BABA behandelt, so wird die wirksame Menge eines Elicitors, der eine Phytoalexinbiosynthese hervorruft, deutlich reduziert (SIEGRIST *et al.*, 1998). Man spricht von einer Sensibilisierung oder Potenzierung des Systems. Schließlich führt eine Infiltration von abgetöteten *Pseudomonas syringaea* Zellen an BABA behandelten Tomatenpflanzen zur Auslösung einer HR, was in unbehandelten Tomatenpflanzen nicht beobachtet werden kann (COHEN, 2001). Über die Resistenzausbildung der Weinrebe gegenüber *Plasmopara viticola* ist nur wenig bekannt. Die Bildung einer HR und eine mögliche Lignifizierung

werden in diesem Zusammenhang diskutiert (COHEN *et al.*, 1999; REUVENI *et al.*, 2001). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BABA Resistenzen gegen eine Vielzahl von Pathogenen induziert, wobei unterschiedliche Mechanismen der Pathogenabwehr in Abhängigkeit des Wirt-Pathogen-Systems, aktiviert werden (SILUE *et al.*, 2002).

1.3.2 *PR*-Proteine („*pathogenesis-related proteins*“)

Werden Pflanzen von Pathogenen befallen oder mit Elicitoren behandelt, so reagieren sie in der Regel mit der Akkumulation spezifischer Proteine. Die im Zusammenhang mit der Pathogeninteraktion induzierten Proteine werden als *PR*-Proteine (*pathogenesis related*) zusammengefasst. Die Zusammensetzung der einzelnen *PR*-Proteine, die nach Pathogenbefall induziert werden, können von Pflanze zu Pflanze variieren. Einige dieser Proteine sind Glukanasen und Chitinasen, Enzyme, die Polysaccharide der Zellwände von Pathogenen abbauen können und so das Wachstum hemmen. Die Enzyme akkumulieren in den pflanzlichen Vakuolen und im Apoplasten (KOMBRINK und SOMSSICH, 1997). Während Chitinasen im Zusammenhang des Abbaus pilzlicher Zellwände diskutiert werden, sind Glukanasen gegen Polyglukane gerichtet, die unter anderem in den Zellwänden von Oomyceten eingelagert sind (LEGRAND *et al.*, 1987; KAUFMANN *et al.*, 1987; KOMBRINK *et al.*, 1988). Der Vergleich der Sequenzen führte zu einer Einteilung der verschiedenen *PR*-Protein in Klassen (LINTHORST 1991; CUTT und KLESSIG, 1992). Die Gliederung in Familien und Klassen, sowie die Bezeichnung erfolgten nicht einheitlich und werden nicht selten durch Charakterisierung eines neuen *PR*-Proteins ergänzt, das keiner bisher bekannten Familie zugeordnet werden kann (Tab. 1). Salicylsäure reguliert die transkriptionelle Aktivierung vieler *PR*-Gene. Diese Induktion kann kooperativ durch Ethylen gesteigert werden (RUSHTON und SOMSSICH, 1998).

Neben diesen lokalen Reaktionen wird in vielen Pflanzen eine systemische Resistenz („systemic acquired resistance“ SAR bzw. „induced systemic resistance“ ISR) induziert, die gegen nachfolgende Infektionen mit verschiedenen Pathogenen immunisiert (RYALS *et al.*, 1996; VAN LOON, 1997; DONG, 1998).

Die Rolle bzw. Funktion vieler *PR*-Proteine ist bis heute nicht geklärt. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass *PR*-1 (SANDOZ, 1992), Chitinasen (SCHLUMBAUM *et al.*, 1986), β -1,3 Glukanasen, *PR*-4 (PONSTEIN *et al.*, 1994) oder *PR*-5 (WOLOSHUK *et al.*, 1991) *in vitro* fungistatisch auf das Wachstum von Pathogenen wirken. Die fungistatischen Eigenschaften von Glukanasen können durch Chitinasen synergistisch gesteigert werden und inhibieren das Wachstum vieler Schädlinge in physiologischen Konzentrationen (SCHLUMBAUM *et al.*, 1986; MAUCH *et al.*, 1989; SELA-BUURLAGE *et al.*, 1993; NIDERMAN *et al.*, 1995). Dieser synergistische Effekt konnte auch in transgenen Pflanzen, die *PR*-Gene überexprimieren, bestätigt werden (ZHU *et al.*, 1994).

Tab. 1: PR-Proteine

Familie	Typ	Funktion
<i>PR-1</i>	Tabak <i>PR-1a</i>	antifungal, antioomycetisch
<i>PR-2</i>	Tabak <i>PR-2</i>	β -1,3 Glukanase
<i>PR-3</i>	Tabak <i>PR-P; Q</i>	Chitinase
<i>PR-4</i>	Tabak <i>PR-R</i>	antifungal
<i>PR-5</i>	Tabak <i>PR-S</i>	antifungal, antioomycetisch
<i>PR-6</i>	Tomate Inhibitor 1	Proteinase Inhibitor
<i>PR-7</i>	Tomate <i>PR-P69</i>	Endoproteinase
<i>PR-8</i>	Gurken-Chitinase	Chitinase
<i>PR-9</i>	Tabak „ligninbildende Peroxidase“	Peroxidase
<i>PR-10</i>	Petersilie <i>PR-1</i>	Ribonuklease ähnlich
<i>PR-11</i>	Tabak Klasse V Chitinase	Chitinase
<i>PR-12</i>	Defensin	antifungal
<i>PR-13</i>	Thionin	antifungal
<i>PR-14</i>	„Lipid-Transfer“-Protein	antifungal

Die Regulation der Biosynthese von *PR*-Genen erfolgt auf der Ebene der Transkription (OSHIMA *et al.*, 1990; WARD *et al.*, 1991a; VAN DE RHEE *et al.*, 1990, 1993; HENNIG *et al.*, 1993). Untersuchungen an Promotoren von *PR*-Genen führten zur Identifizierung regulatorischer Einheiten, sogenannter *cis-acting elements* (SHAH und KLESSIG 1996; LEBEL *et al.*, 1998; MENKE *et al.*, 1999). Diese Elemente sind notwendig und hinreichend für die Steuerung der Genexpression.

1.3.2.1 β -1,3 Glukanasen

Als Substrat von Glukanasen dienen β -1,3 verknüpfte Polyglukane, die den Hauptbestandteil der Zellwände von Oomyceten, zu der *Plasmopara viticola* zählt, bilden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auf diese Klasse der *PR*-Gene der verschiedenen *Vitis* Arten besonderes Augenmerk gelegt.

β -1,3 Glukanasen werden in 2 Klassen eingeteilt, wobei die Einteilung nach der subzellulären Lokalisation erfolgt. Die für die Pathogenabwehr gegen Oomyceten wichtigen Glukanasen werden in den Apoplasten segregiert (NEUHAUS *et al.*, 1992). Weitere Glukanasen werden in die Vakuole eingelagert, ihnen wird nur eine untergeordnete Rolle in der Pathogenabwehr zugesprochen. Ein weiteres Mitglied der Glukanasenfamilie sind β -1,4 Glukanasen, die vermutlich die Zellform während der pflanzlichen Entwicklung beeinflussen und zur Pathogenabwehr keinen Beitrag leisten (NICOL *et al.*, 1998; WU *et al.*, 1996). Allen Glukanasen ist das typische Sequenzmotiv „L Q V V I S E S G W P S A G“ der Glykosylhydroxylasen gemeinsam. Dabei ist weniger die Enzymaktivität von Bedeutung, als die Geschwindigkeit und Stärke, mit der diese Gene reguliert werden (DONG, 1998). Glukanasen haben ein Molekulargewicht zwischen 35- und 40 kDa, weisen C- bzw. N-terminal eine sogenannte „Leader-Sequenz“ auf, die für die spätere Lokalisation verantwortlich ist.

Überexpression einer β -1,3 Glukanase aus Soja in Tabak erhöht die Resistenz gegenüber *Phytophthora megasperma* und *Alternaria alternata* (YOSHIKAWA *et al.*, 1993). Ebenso erhöhte die Überexpression einer β -1,3 Glukanase aus Hafer in Tabak die Resistenz gegenüber *R. solani* und eine Coexpression der Glukanase und einer Chitinase verstärkten diesen Effekt zusätzlich im Vergleich zu der Überexpression nur eines Enzyms (JACH *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu hat die Verringerung einer vakuolären Form der β -1,3 Glukanase Transkripte in „*antisense*“-Pflanzen keinen Einfluss auf die Pathogenabwehr (NEUHAUS *et al.*, 1992).

Verschiedene Klassen von Glukanasen wurden in vielen dikotylen und monokotylen Pflanzen isoliert (STICHER *et al.*, 1997). Die Genexpression der Glukanasen wird gewebespezifisch während der Entwicklung von Pflanzen und durch exogene Faktoren, wie z. B. Pathogenbefall aktiviert (LINTHORST, 1991). Glukanasen sind damit ein Teil der induzierten Resistenz von Pflanzen.

1.4 Allgemeiner Überblick über die Signaltransduktion der pflanzlichen Pathogenantwort

Die Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr wurde in der Vergangenheit vor allem genetisch in *Arabidopsis thaliana*, Gerste und Tomate und biochemisch in Petersiliezellensuspensionskulturen untersucht (EBEL und SCHEEL, 1992; GLAZEBROOK *et al.*, 1996; EBEL und SCHEEL, 1997; GLAZEBROOK *et al.*, 1997a; EBEL und MITHÖFER, 1998; INNES, 1998; SCHEEL, 1998;). Die Ergebnisse von *Mutantenscreens* in *Arabidopsis*, bei denen auf Ausfall einzelner Aspekte in der Resistenzantwort selektiert wurde, deuten darauf hin, dass bereits sehr früh nach Pathogenerkennung eine Verzweigung der Signalwege erfolgt (INNES, 1998; VAN DER BIEZEN und JONES, 1998). Nur sehr wenige Mutanten zeigen einen vollständigen Verlust der Resistenz; in den meisten Fällen wird ein intermediärer Resistenzphänotyp beobachtet (GLAZEBROOK *et al.*, 1996; ROGERS und ASUBEL, 1997; GLAZEBROOK *et al.*, 1997b). Dabei sind alle bisher beschriebenen Signalmutationen Supressoren mehrerer, aber nicht aller *R*-Gene. Diese Daten zeigen, dass verschiedene *R*-Gene unterschiedliche Signalwege benutzen. Inwiefern sich die dadurch ausgelösten Abwehrmechanismen unterscheiden und ob die verschiedenen Signalwege an bestimmten Stellen konvergieren, ist nicht bekannt.

Eine Ausnahmestellung unter den bisher klonierten Resistenzgenen nimmt *Pto* aus Tomate ein. Dieses Gen kodiert für eine cytoplasmatische Serin/Threonin-Proteinkinase (S/T-Proteinkinase) und vermittelt Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* Stämmen, die das Avirulenzgen *avrPto* besitzen (MARTIN *et al.*, 1993; LOH und MARTIN, 1996). Im Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte die direkte Interaktion zwischen *avrPto* und *Pto* nachgewiesen werden.

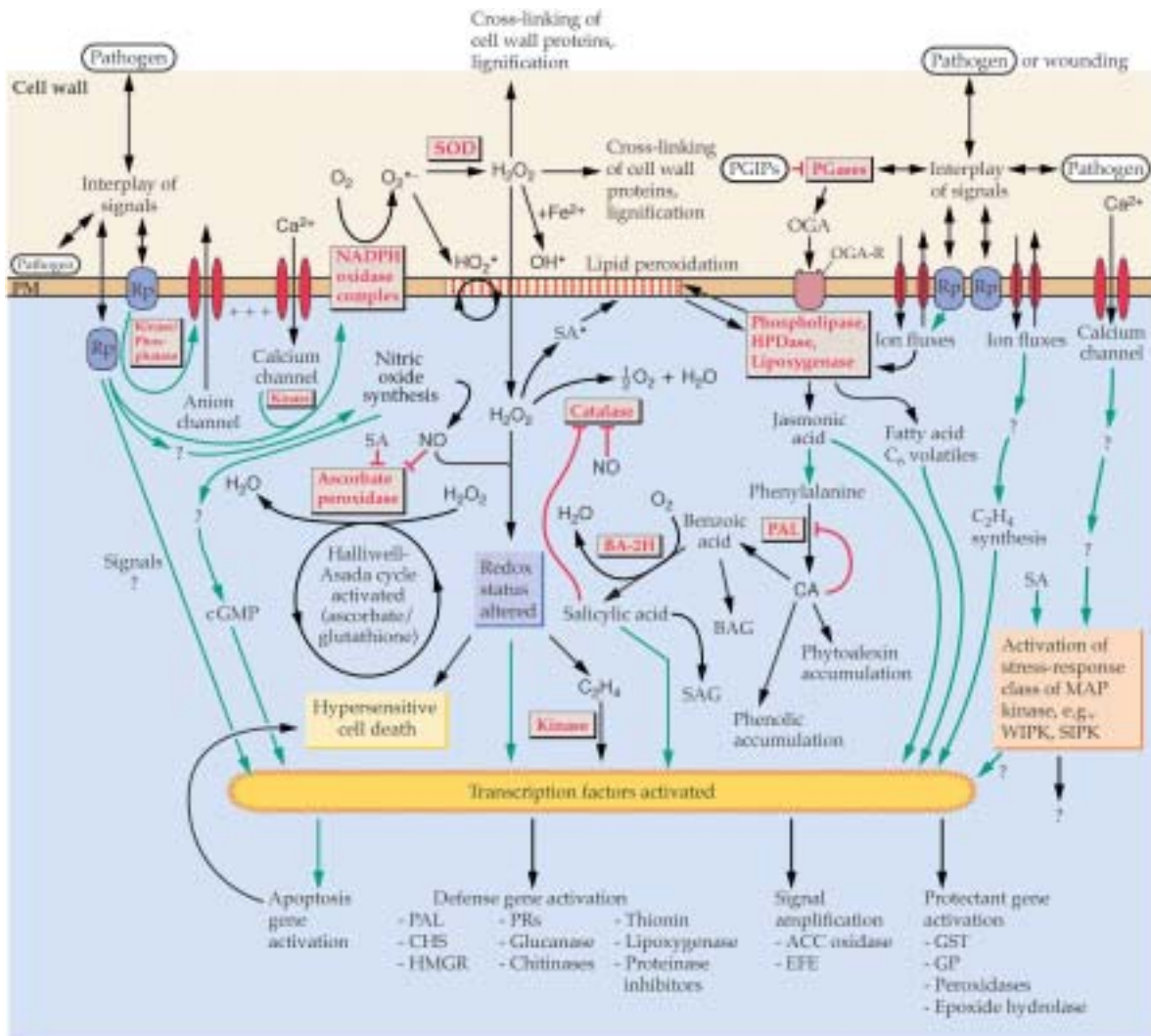


Abb. 3: Übersicht der Signaltransduktionkaskaden, die die Abwehrantwort von Pflanzen gegenüber Pathogenen aktivieren und koordinieren. Pflanzenrezeptoren (Rp) werden nach Pathogenbefall durch *Avr* Gene, physikalischen Kontakt oder generellen Komponenten der beteiligten Organismen, wie Chitin, Enzymen oder Zellwandfragmenten der Pflanze, aktiviert. Die genauen Komponenten der Signaltransduktion sind nicht bekannt, aber es sind Kinasen, Phosphatasen, G-Proteine und Ionenflüsse beteiligt. Reaktionen wie der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxyd (NO), sowie die Induktion von Abwehrgenen oder möglichen Genen, die an der Apoptosis beteiligt sind. Eine Verstärkung der initialen Antwort erfolgt über Signalmoleküle wie Lipidperoxide, Benzoesäure (BA), Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen (C₂H₄). Diese induzieren wiederum andere „defense related genes“ und modifizieren Abwehrproteine und Enzyme. Begleitende Veränderungen des zellulären Redoxstatus oder Zellverwundungen aktivieren präformierte Mechanismen zum Zellschutz (z. B. der Halliwell-Asada Zyklus, plastidäre Superoxid-dismutase [SOD] und Katalasen). Ebenso koordiniert ein sogenannter „cross-talk“ zwischen den einzelnen aktivierten Signalkaskaden die Abwehrantwort. Ein grüner Pfeil deutet eine positive-, einer roter Block eine negative Interaktion an. ACC, Aminocyclopropan-1-carboxysäure; BAG, Benzoesäure; BA-2H, Benzoesäure-2-hydroxylase; CA, Zimtsäure; cGMP, zyklisches Guanosin-5'-monophosphat; CHS, Chalkonsynthase; EFE, Ethylen bildendes Enzym; GP, Glutathionperoxidase; GST, Glutathion-S-transferase; HMGR, 3'-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktase; HO₂[•], Hydroperoxy Radikal; HPDase, Hydroxyperoxiddehydrase; MAP, mitogen-aktivierendes Protein, NO, Stickstoffmonoxid; OH[•], Hydroxylradikal; OGA und OGA-R, Oligogalakturonid-Fragmente und Rezeptor; PAL, Phenylalaninammoniumlyase; PGases, Polygalakturonidase; PM, Plasmamembran; SA[•], Salicylsäureradikal; SAG Salicylsäureglukoside; SIPK, Salicylsäure induzierte Proteinkinase; WIPK, Verwundung induzierte Proteinkinase. (Nach BUCHANAN *et al.*, 2001, verändert)

Untersuchungen in Suspensionszellkulturen zeigten als schnellste Reaktion nach Elicitorbehandlung einen Efflux von Cl^- - und K^+ -Ionen einen Influx von Protonen und Ca^{2+} -Ionen und einen Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration (FELIX *et al.*, 1993; NÜRNBERGER *et al.*, 1994; TAVERNIER *et al.*, 1995, CHANDRA und LOW, 1997). Verschiedene Inhibitor- und Effektorstudien deuten darauf hin, dass an der Auslösung der Ionenflüsse G-Proteine und Proteinkinasen beteiligt sind (LEGENDRE *et al.*, 1992; FELIX *et al.*, 1994; MATHIEU *et al.*, 1996; GELLI *et al.*, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Ionenflüsse in den untersuchten Systemen notwendig und hinreichend für die Auslösung der nachfolgenden Abwehrantworten sind (JABS *et al.*, 1997; PUGIN *et al.*, 1997).

Die während des „oxidative burst“ entstehenden ROS können neben ihrer direkten Abwehrwirkung auch eine wichtige Signalfunktion (LAMB und DIXON, 1997) haben. Die Inhibierung des „oxidative burst“ blockiert in zahlreichen Zellsuspensionskulturen verschiedene Aspekte der Resistenzantwort (LEVINE *et al.*, 1994; JABS *et al.*, 1996; JABS *et al.*, 1997; ALAREZ *et al.*, 1998).

Auch das in tierischen Systemen als „second messenger“ fungierende Stickoxid (NO) ist möglicherweise eine wichtige Signalkomponente in der Auslösung der pflanzlichen Pathogenantwort. In Tabak wurde gezeigt, dass nach Infektion mit avirulenten Pathogenen NO-Synthaseaktivität induziert wird (DURNE *et al.*, 1998). In *Arabidopsis*-Pflanzen und Soja-Zellsuspensionskulturen haben NO und H_2O_2 synergistische Wirkung in der Auslösung des Zelltods (DELLEDONNE *et al.*, 1998). In Tabak induziert eine NO-Behandlung die *PR*-Genexpression (DURNER *et al.*, 1998), in Soja und Kartoffel eine Phytoalexinproduktion (DELLEDONE *et al.*, 1998; NORITAKE *et al.*, 1996). Weitere Komponenten, die die pflanzliche Pathogenabwehr und die Induktion der systemischen Resistenz regulieren, sind die Phytohormone Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen (DONG, 1998, REYMOND und FARMER, 1999).

Das in Abb. 3 dargestellte Modell der Signaltransduktion pflanzlicher Abwehrmechanismen beruhen vor allem auf Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana*. Verglichen mit den Erkenntnissen, die über *Arabidopsis thaliana* vorliegen (vollständige Sequenz des Genoms, breites Mutantenspektrum), ist der Wissensstand über die Weinrebe in molekularbiologischer Hinsicht gering. Zu Beginn dieser Arbeit waren ca. 100 Gensequenzen aus *Vitis vinifera*, wobei die meisten nur Teilbereiche der kodierenden Sequenz darstellten, publiziert.

1.4.1 Salicylsäure (SA) als zentrales Molekül der induzierten Resistenz

In vielen Experimenten wurde bisher gezeigt, dass die Fähigkeit von Pflanzen, nach Pathogenbefall, den Level an freier Salicylsäure zu erhöhen, essentiell ist, um eine Resistenz

auszulösen (VERNOOIJ *et al.*, 1994; DELANEY *et al.*, 1994; CAMERON *et al.*, 1999, 2000). Dabei wird diese induzierte Resistenz gegen eine Vielzahl von Pathogenen erzielt, d. h. sie ist nicht spezifisch. Eine Salicylsäure Applikationen, oder deren Strukturhomolge, BTH und INA führen in *Arabidopsis*, Tabak und Gurke zur Expression von *PR*-Proteinen (DELANEY *et al.*, 1994; DONG, 1998). In anderen Pflanzen, wie Kartoffel und Reis, wurden hohe Salicylsäure Mengen auch in Abwesenheit von Pathogenen detektiert (SILVERMAN *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1997). Die Frage stellt sich, wie diese Pflanzen eine Resistenz ausbilden können. Transgene *NahG*-Kartoffelpflanzen verloren ihre Resistenz gegenüber *Phytophthora infestans*. Dies bedeutet, dass SA auch in dieser Wirt-Pathogen-Interaktion von entscheidender Bedeutung bei der Resistenzvermittlung ist. Dabei kommt es nicht zu einer Erhöhung der SA Menge in den Geweben, sondern es wird die Sensitivität gegenüber SA nach Pathogenbefall erhöht (YU *et al.*, 1997).

Der Wirkmechanismus, mit der SA Resistenzen vermitteln kann, ist vielfältig und bei weitem nicht aufgeklärt. Ein SA bindendes Protein wurde isoliert und konnte als Katalase identifiziert werden (CHEN und KLESSIG, 1991). Dabei führt die Bindung von SA zu einem Verlust der Enzymaktivität. Dies führt zu einer Erhöhung von H₂O₂, welches *per se* Signalkaskaden aktiviert (NEUENSCHWANDER *et al.*, 1995). Weiter wurde eine hemmende Wirkung von SA auf eisenhaltige Enzyme wie Ascorbatperoxidase oder Aconitase nachgewiesen (DURNER und KLESSIG, 1995; RUFFER *et al.*, 1995).

Pflanzliche Reaktionen auf exogene SA Applikation sind nicht einheitlich und variieren von Art zu Art. Dabei werden verschiedene SA abhängige Signalkaskaden aktiviert, die wiederum unterschiedliche Reaktionen auslösen (TENHAKEN *et al.*, 2001).

1.5 DER WIRT - Die Weinrebe *Vitis vinifera* L.

Die Weinrebe wird schon seit Jahrtausenden von Menschenhand kultiviert. Die Familie der Rebengewächse (*Vitaceae*) umfasst 12 Gattungen, in der nur die Untergattung *Vitis* sich zur Rebkultur eignet und wirtschaftlich von Bedeutung ist. Die kultivierten Arten, zu denen Ertrags- und Unterlagensorten gehören, gehören zur Untergattung *EuVitis*. Das Verbreitungsgebiet der Reben ist rund um den Globus, wobei sie in den gemäßigten Breiten der nördlichen Halbkugel zwischen 30. und 51. Breitengrad und der südlichen Halbkugel zwischen 30. und 40. Breitengrad bevorzugt zu finden sind.

Durch den globalen Wechsel von Warm- bzw. Eiszeiten und deren damit verbundenen Ausbreitungs- und Rückzugsgebiete der Pflanzen, kam es in Nordamerika zu einer großen Formenvielfalt der Arten. Demgegenüber hat sich in den europäischen/vorderasiatischen Verbreitungsgebieten nur eine Art entwickelt, nämlich *Vitis vinifera* L. Die verwandtschaftlich sehr nahe stehenden wilden Unterarten, wie *V. vinifera ssp. silvestris* und *V. vinifera ssp. sativa* waren bis in die zweite Hälfte des 19. Jahrhunderts in den gemäßigten Zonen Europas verbreitet. Sie kamen auch in den Auwäldern der südlichen Oberrheinebene

vor, wo sie aber aufgrund der aus Nordamerika eingeschleppten Schaderreger und der Zerstörung der Biotope stark dezimiert wurden. *V. vinifera ssp sativa* gilt als eine der Stammformen unserer heutigen Kulturreben (STRASBURGER *et al.*, 1998), die vom östlichen Mittelmeerraum bis an dessen Westrand beheimatet ist. Die Arten sind innerhalb der jeweiligen Untergattungen miteinander kreuzbar. Die meisten Kulturrebsorten werden der Unterart *Vitis vinifera ssp. sativa* zugeordnet.

Der Anbau von Weinreben wird durch eine Reihe pathogener Pilze beeinträchtigt, wozu der Erreger des Grauschimmels (*Botrytis cinerea*) und des echten Mehltaus (*Uncinula necator*) zählen. Das wirtschaftlich bedeutenste Pathogen der Weinrebe ist jedoch ein Oomycet, der Erreger der Rebenperonospora, *Plasmopara viticola*. Ursprünglich waren alle wichtigen Pathogene der Weinrebe, dazu gehört auch die Reblaus (*Phylloxera vitifolii*), in Nordamerika beheimatet. Im Zuge des immer größeren werdenden Handelsaufkommens und Warenaustausches Mitte des letzten Jahrhunderts zwischen „alter- und neuer Welt“, wurden diese Pathogene in Europa verbreitet.

Die europäischen Rebanlagen wurden im 19. Jahrhundert durch Reblausbefall weitgehend zerstört. Ironischerweise wurde im Zuge des Wiederaufbaues *Plasmopara viticola* eingeschleppt, welches weitere Epidemien verursachte. Im Laufe der Coevolution konnten „amerikanische“ Rebsorten, wie *Vitis rupestris* (Felsenrebe) und *Vitis riparia* (Uferrebe), eine ausgeprägte Resistenz gegenüber *U. necator*, *Plasmopara viticola* und der Reblaus entwickeln. Die europäischen Rebsorten, plötzlich konfrontiert mit „unbekannten“ Pathogenen, die sich auf die Gattung *Vitis* spezialisierten, besaßen keine Abwehrmöglichkeiten. Diese Umstände begünstigten die rasche Ausbreitung, so dass *Plasmopara viticola* für die zweite existentielle Bedrohung für den europäischen Weinbau sorgte. Kupferverbindungen wurden gegen *Plasmopara viticola*-Befall und Schwefel zur Bekämpfung von *U. necator* eingesetzt. Heutzutage werden moderne Fungizide im intensiven Weinanbau angewendet. Jedoch ist der Einsatz kupferhaltiger Präparate trotz der vorhandenen Ökotoxizität gerade für „Ökowinzer“ die einzige Alternative Pflanzenschäden weitestgehend unter Kontrolle zu halten. In Jahren mit, für *Plasmopara viticola*, günstigen Witterungsbedingungen und dadurch einem hohen Befallsdruck, ist eine hohe Anzahl von Kupferspritzungen (bis zu 15 mal) erforderlich.

Von Beginn an wurden Anstrengungen unternommen, die Probleme des Reblausbefalls und der Pilzkrankheiten mit Hilfe der Züchtung von resistenten Rebsorten zu lösen (DENZER, 1991). Es gelang Anfang des 20. Jahrhunderts durch Einkreuzen von „Amerikanerreben“ Hybride zu züchten, die gegen Reblaus- bzw. *Plasmopara viticola*-Befall resistent waren. Diese interspezifischen Sorten konnten sich jedoch aufgrund der Beeinträchtigung des Weingeschmackes (Foxton) nicht durchsetzen. Zusätzlich konnte sich die Reblaus nun auch an den Blättern vermehren, was bei den europäischen Sorten nicht möglich war. Dies führte sogar zu einem Verbot dieser Sorten. Zur erfolgreichen Bekämpfung der

Reblaus wurde schließlich eine blatttolerante europäische Trägersorte auf eine wurzeltolerante Amerikanerunterlage gepfropft.

Als Ursache der Resistenz der „Amerikanerreben“ gegenüber *Plasmopara viticola* vermutete man zunächst, dass der Bau der Spaltöffnungen das Eindringen der Zoosporen in die Blätter verhindert (INSTVANNFI und PALINKAS, 1913). Später wurde festgestellt, dass *Plasmopara viticola* auch bei den Amerikanerreben die Spaltöffnungen erfolgreich besiedelt (MÜLLER-THURGAU, 1924; ARENS, 1929; DENZER, 1991). MÜLLER-THURGAU (1924) beschrieb nach *Plasmopara viticola*-Inokulationen das Auftreten von Nekrosen in resistenten Sorten, was auf eine hypersensitive Reaktion als Ursache der Resistenz hinweist und somit einer inkompatiblen Wirt-Pathogen Interaktion entspricht. Bei europäischen Rebsorten wurde eine hypersensitive Reaktion und die daraus folgende Nekrosenbildung nie beobachtet. Das Pathogen kann den Wirt erfolgreich besiedeln, man spricht hier von einer kompatiblen Interaktion.

Die Möglichkeiten der pflanzlichen Resistenzforschung sind in den letzten Jahren durch die Einführung molekularbiologischer Techniken erheblich erweitert worden. Allerdings wurden bis heute an Weinreben im Vergleich zu anderen Pflanzen nur wenige molekulare Untersuchungen zu Grundlagen der Resistenz durchgeführt. Obwohl die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln in vielen Fällen zu einer Entspannung der Lage geführt hat, so ist dennoch die pflanzeneigene Abwehr und ihre gezielte Förderung aufgrund molekularbiologischer Erkenntnisse die zukunftsweisende Maßnahme.

1.6 DAS PATHOGEN - *Plasmopara viticola*

Plasmopara viticola wird in die Gruppe der Oomyceten gestellt, die zu den Chromista zählen. Ihr Thallus ist diploid und der Aufbau der Zellwände besteht überwiegend aus Kallose, einem β -1,3 Glucan. Es ist ein obligat biotropher Parasit, der bezüglich seiner Entwicklung auf lebendes Gewebe angewiesen ist. Der Entwicklungszyklus von *Plasmopara viticola* mit sexueller und asexueller Fortpflanzung ist in Abb. 4 dargestellt (SCHRUFFT und KASSEMEYER, 1999).

Die sexuell gebildeten Oosporen überdauern den Winter eingebettet in befallenem Gewebe der Rebe. Am Anfang der Vegetationsperiode keimen diese bei feuchter Witterung aus, indem sie einen Keimschlauch bilden, an dessen Ende ein Primärsporangium entsteht. Die Ausbreitung der Sporangien bzw. der zahlreichen freigesetzten Zoosporen (bis zu 60 pro Sporangium) erfolgt durch Wind oder Regenspritzer, wodurch sie an die Unterseite der Reblätter gelangen. Die auf einen Wasserfilm angewiesenen begeißelten Zoosporen bewegen sich zu den Spaltöffnungen, heften sich dort an und enzystieren. Bei diesem Vorgang werden die Geißeln abgeworfen, die Sporen kugeln sich ab und bilden eine Zellwand. Aus der enzystierten Zoospore wächst ein Keimschlauch durch die Spaltöffnung in die Atemhöhle. Hat dieser die Atemhöhle erreicht, verdickt er sich zum substomatären

Vesikel (Infektionsvesikel). Nach Verlagerung des Zellplasmas in die im Inneren liegenden Organe, ist die gegen Austrocknung empfindliche Phase der Wirtsbesiedlung abgeschlossen. Die Spitze des Keimschlauchs (Primärhyph) bildet sobald sie eine Zellwand erreicht hat ein Haustorium aus. Mit diesen Haustorien entzieht *Plasmopara viticola* den Pflanzenzellen lebensnotwendige Nährstoffe. Diese Erstinfektion der Rebblätter im Frühsommer wird auch als Primärinfektion bezeichnet.

Im Verlauf des weiteren Hyphenwachstums breitet sich das Myzel im Interzellularraum aus, vor allem im lockeren Gewebe des Schwammparenchyms, und bildet immer wieder Haustorien. Unter optimalen Bedingungen (24°C) dauert die Zeitspanne von der Infektion bis zum Auftreten der ersten Symptome (Inkubationszeit) vier bis fünf Tage. Bei einer Temperatur von über 13°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von mindestens 95% (BLAESER und WELTZIEN, 1978) bilden sich auf der Blattunterseite Sporangioophoren, die aus den Stomata auswachsen und sich vielfach verzweigen (MÜLLER, 1934). An den Zweigenden tragen sie jeweils ein zitronenförmiges Sporangium. Die Sporangienträger bilden dann in ihrer Gesamtheit einen weißen bis gräulichen Rasen. Diese Sporangien entlassen bei Benetzung je vier bis sechs Zoosporen, die weiteres Gewebe sekundär infizieren können. Solche Sekundärinfektionen können sich während einer Vegetationsperiode je nach Klimabedingungen sehr häufig wiederholen.

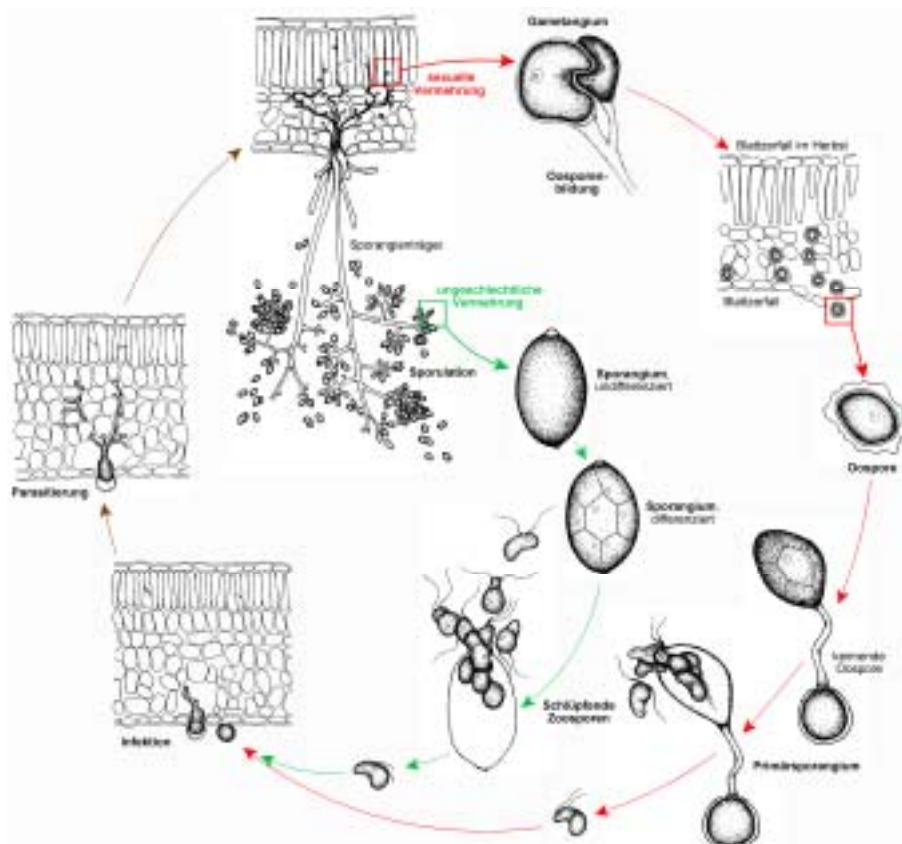


Abb. 4: Entwicklungszyklus von *Plasmopara viticola*. Der sexuelle Zyklus ist mit roten, der asexuelle mit grünen Pfeilen hervorgehoben. Braun sind Stadien gekennzeichnet, die in beiden Zyklen vorkommen (nach Schöpe).

Am Ende der Vegetationsperiode findet eine sexuelle Vermehrung statt, in der Oogonien und Antheridien gebildet werden, aus denen die Überwinterungsorgane, die Oosporen, hervorgehen. Diese keimen im Frühjahr aus und der Entwicklungszyklus von *Plasmopara viticola* wird erneut durchlaufen.

Plasmopara viticola verursacht hauptsächlich Ertragsverluste durch Befall der Beeren oder Blütenstände. Die aus den Infektionen resultierenden Blattschädigungen vermindern die Assimilationsleistung und somit die Qualität der Beeren. Weiterhin werden Wüchsigkeit, Leistungsfähigkeit und Frostwiderstandsfähigkeit als Folge jahrelanger Schädigung herabgesetzt (KRUMM, 1992).

Als erste Anzeichen eines Befalls entstehen auf der Blattoberseite aufgehellte gelbliche Flecken. An diesen sogenannten „Ölflecken“ bildet sich auf der Blattunterseite bei günstigen klimatischen Verhältnissen über Nacht einen weißlichen Sporangienrasen. Einige Tage nach Sporulation sterben die infizierten Blattflächen ab. Bei starkem Befall vertrocknen die Blätter vollständig und fallen letztendlich ab. Auch bei Ranken, Blütenständen und jungen Beeren kann ein solcher Sporangienrasen auftreten. Aus infizierten Beeren entwickeln sich die sogenannten „Lederbeeren“, die durch ihre rotbraune Färbung und die schlaffe vertrocknete Gestalt ein charakteristisches Merkmal für den Traubenbefall darstellen (MÜLLER und SLEUMER, 1934).

1.7 Zellsuspensionskulturen von *Vitis spec.* als Modellsystem pflanzlicher Abwehrmechanismen

Zellsuspensionskulturen von Petersilie und daraus isolierte Protoplasten reagieren nach Behandlung mit Elicitoren mit einem Programm, das der Resistenzantwort von Pflanzen gleicht (HAUFFE *et al.*, 1986; KOMBRINK und HAHNBROCK, 1986; DANGL *et al.*, 1987; SOMSSICH *et al.*, 1989; KAWALLECK *et al.*, 1995; HAHNBROCK *et al.*, 1995). Zellkulturen können daher ein gutes Modellsystem darstellen, um biochemisch und molekularbiologisch Perzeptions- und Signalmechanismen zu untersuchen, die zur Pathogenerkennung und zur Auslösung von Abwehrantworten führen. Da jede Pflanzenart nach Pathogenbefall mit einem individuellem Abwehrprogramm reagiert, ist es von Interesse, ob Zellkulturen von anfälligen- bzw. resistenten *Vitis*-Arten sich nach einer Stimulierung in Bezug auf Ionenflüsse und *PR*-Gen Expression unterscheiden.

Zudem sind die Zellen einer Zellsuspensionskultur in einem entwicklungsphysiologisch gleichen Zustand, so dass der Einfluss von z.B. Blattalter, Hormonstatus oder Temperaturschwankungen, denen Freilandpflanzen unterworfen sind, keine Rolle spielt. Außerdem sind Kontaminationen einer Zellsuspensionskultur sehr leicht erkennbar, so dass nur steriles Material bei Experimenten Verwendung findet, während unkontrollierte Infektionen von Gewächshaus- oder Freilandpflanzen der Weinrebe durch verschiedenste Pathogene nicht ausgeschlossen werden können. Zellkulturen ermöglichen zudem eine leichte, jahres-

zeitlich unabhängige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die so an Freiland- oder Gewächshauspflanzen nicht durchgeführt werden können.

Ein weiterer Vorteil von Zellsuspensionskulturen der Weinrebe ist, dass störende phenolische Substanzen des Sekundärstoffwechsels, die eine DNA- bzw. RNA Isolation erheblich behindern können, in geringerem Umfang produziert werden. Auch stellt die zur Verfügung stehende Menge an Zellmaterial, die zu den Untersuchungen herangezogen werden kann, keinen limitierenden Faktor dar.

Behandelt man Zellkulturen mit einem putativen Resistenzinduktor, so reagiert nahezu jede Zelle gleichzeitig auf diesen Stimulus, während bei einer Applikation auf Pflanzen in der Regel zunächst nur die epidermalen Zellschichten damit in Berührung kommen. Die Sensitivität, mit der Zellkulturen auf die Applikation von Wirkstoffen reagieren, ist somit stark erhöht. Untersuchungen an Zellkulturen sind daher, verglichen mit denen an Pflanzen, relativ schnell durchführbar.

1.8 Ziele der Arbeit

Vitis Arten, die wie das Pathogen *Plasmopara viticola* ihren Lebensraum ursprünglich in der neuen Welt hatten und ständig mit dessen Befall konfrontiert waren, haben wirksame Abwehrmechanismen gegen einen möglichen Befall entwickelt. *Vitis rupestris* ist weitgehend resistent und zeigt typische Reaktionen einer inkompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktion, wie die Ausbildung einer HR nach Pathogenbefall. Dagegen zeigen anfällige *Vitis*-Arten, wie *Vitis vinifera* keine solche Abwehrreaktionen. Dies führte zu der Arbeitshypothese, dass *Vitis rupestris* im Rahmen einer Coevolution ein Resistenzgen (*R*-Gen) entwickelt hat, das einen Befall durch *Plasmopara viticola* frühzeitig erkennen kann und dadurch schnell zur Aktivierung einer wirkungsvollen Abwehrantwort führt. Kinetiken von *PR*-Gen Induktionen zwischen anfälligen- und resistenten Arten könnten zur Aufklärung beitragen und somit einen entscheidenden Fortschritt zum Verständnis der Abwehrantwort der Weinrebe bringen. Dabei steht zunächst die Isolierung von Genen und deren Charakterisierung als *PR*-Gen im Vordergrund.

Die wesentlichen Ziele waren zunächst Kallus- bzw. Zellsuspensionskulturen der verschiedenen *Vitis* Arten anzulegen, sowie die Isolierung von *PR*-Genen und deren Regulation bei resistenten- und anfälligen *Vitis*-Arten nach Infektion mit *Plasmopara viticola* aufzuzeigen. Können Gene als *PR*-Gen charakterisiert werden rückt die Isolierung der korrespondierenden Promotoren in Vordergrund. Die stabile Integration eines *PR*-Gen Promotor-Reporter Konstruktes in das *Vitis*-Genom stellt ein zentrales Ziel dieser Arbeit dar. Dadurch soll ein, auf einer Zellkultur basierendes System, etabliert werden, welches die Möglichkeit bietet eine Vielzahl an Substanzen schnell und mit zeitlich hoher Auflösung auf ihr Potential hin, eine *PR*-Gen Expression hervorzurufen, zu analysieren. Solche Substanzen können anschlie-

ßend in Blattscheibentests bzw. an Gewächshauspflanzen auf ihre Resistenzinduktion getestet werden.

Die nicht proteinogene Aminosäure β -Aminobuttersäure (BABA) führt bei der Weinrebe als bisher einzig bekannter Pflanzenaktivator zu einer Resistenzausbildung gegenüber *Plasmopara viticola*. Der Wirkmechanismus dieser Resistenzausbildung ist jedoch weitgehend ungeklärt. Die vorliegende Arbeit soll mit Hilfe von mikroskopischen und molekularbiologischen Methoden mögliche Mechanismen dieser Resistenzinduktion nach BABA-Applikation an Blattscheiben, Pflanzen und in Zellkulturen aufzeigen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Anlegen, Anzucht und Induktion von *Vitis* -Zellkulturen

Als pflanzliches Ausgangsmaterial für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dienten Gewächshauspflanzen verschiedener *Vitis* Arten. Diese Pflanzen werden durch Propfung weitervermehrt, so dass von einem einheitlichem Erscheinungsbild ausgegangen werden kann.

2.1.1 Anlegen der Kalluskulturen von *Vitis spec.*

Als Ausgangsmaterial für die Kalluskulturen wurden junge Triebe und nicht verholzte Nodien von *Vitis vinifera* L. cv. Müller-Thurgau und *Vitis rupestris* verwendet. Mit einem Skalpell wurden die Pflanzenteile in ca. 1-2 cm große Stücke zerschnitten und 2 min in NaOCl sterilisiert. Anschließend wurden die Pflanzenteile mehrfach abwechselnd mit sterilem *Aqua bidest.* und Ethanol (70%) gewaschen. Die sterilen Gewebestücke wurden anschließend auf MS- bzw. B5-Medium gelegt und leicht in den Agar eingedrückt, so dass die Schnittstellen in Kontakt mit dem Medium kamen. Die Bildung von Kallusgewebe erfolgt bei 23°C in einer Phytokammer. Nach mehreren Passagen auf MS- bzw. B5 Medium wurden die Kalli alle 4-6 Wochen auf neues Medium überführt.

Eingesetzte Lösungen

MS-Medium

Murashige & Skoog Grundsatz Modification 1
2,3 g/l (Duchefa)
0,5 (w/v)% Gelrite (Roth)
2% Saccharose
2,4-D 1mg/l

Gamborg B5 Medium

3,1 g/l Grundsatz (Duchefa)
0,5 (w/v)% Gelrite (Roth)
2% Saccharose
2,4-D 1mg/l

2.1.2 Anzucht und Ernte der Zellsuspensionkulturen

Ausgehend von gut wachsenden Kalluskulturen wurden Zellsuspensionskulturen von *Vitis* angelegt. Hierzu wurden Zellen von Kallusgewebe in MS-Medium unter sterilen Bedingungen überimpft. Die Zellkulturen wurden im Konstantraum bei 23°C auf einem Rotationsschüttler (120 rpm) angezogen. Alle sieben Tage wurden ca. 5 ml Suspensionskultur mit 40 ml frischem MS-Nährmedium in einen 250ml Erlenmeyerkolben steril überimpft (Wellmann, 1971; Kombrick und Hahlbrock, 1986).

Für Untersuchungen wurden die Zellen entweder frisch verarbeitet oder durch Absaugen des Mediums durch Frittenfilter mit Hilfe einer Vakuumpumpe geerntet und in flüssigem Stickstoff sofort eingefroren und bei -80°C eingefroren.

2.1.3 Bestimmung des Zellfrischgewichtes

120 ml Zellsuspensionskulturen wurden homogen auf drei Erlenmeyerkolben zu je 40 ml aufgeteilt. Abwechselnd wurden aus jedem Kolben 2 ml der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 15000 rpm pelletiert. Anschließend wurde der Überstand mittels einer Kanüle abgenommen und das Pellet auf einer Waage gewogen.

2.1.4 Induktion der Zellsuspensionskulturen durch Elicitoren

13 Tage nach Überimpfen wurden Zellsuspensionskulturen mit biotischen Elicitoren induziert. Als mögliche Elicitoren wurden verwendet:

<u>Elicitor</u>	<u>Stammkonzentration</u>
pep 13	10 µM
HrpZ	1,3 mg/ml
HrpZ-HISTag	1,7 mg/ml
Hefeextrakt	10 mg/ml
<i>Plasmopara viticola</i> Sporen	40000 Sporangien/ml
Xylanase	10 mg/ml
Flagellin 22	1 mM
Chitin 6	10 mg/ml
Lipopolysaccharid E1	0,2 mg/ml
Lipopolysaccharid E2	0,2 mg/ml

Über die Natur der Lipopolysaccharide Elicitoren E1 bzw. E2 war leider nichts bekannt. Diese Substanzen wurden von Prof. Weckesser zur Verfügung gestellt.

Zusätzlich wurden synthetische Verbindungen, die eine Resistenz in Pflanzen auslösen können getestet.

Als Resistenzinduktoren wurden verwendet:

<u>Elicitor</u>	<u>Stammkonzentration</u>	<u>Endkonzentration</u>
Natriumsalicylat (SA)	1 mg/ml	10-500 µM
2,6-Dichloroisinikotinsäure (INA)	1 mg/ml	10-500 µM
Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbo- thiosäure-S-methylester (BTH)	1 mg/ml	10-500 µM
β-Aminobuttersäure (BABA)	1 mg/ml	10-500 µM
Glufosinat	1 mg/ml	0,1-100 µM

Die Stammlösungen mit den Resistenzinduktoren wurden mittels KOH auf pH 5,5 eingestellt und anschließend sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.1.5 Die Protoplastierung von Zellen der Petersilie-Zellkultur

Eingesetzte Lösungen:

0,24 M CaCl₂ x 2 H₂O

kio)

Elektrodenpuffer:

10 mM Tris/Hepes pH 7.2

15 mM MgCl₂

2% Saccharose

Enzymlösung:

1% Cellulase „Onozuka R-10“ (Yakult, To-

0,2% Mazeroenzym R-10 (Serva, Heidelberg)

in 0,24 M CaCl₂ x 2 H₂O

pH 5,6-5,8 mit KOH eingestellt.

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden in einer Sterilbank bei 25°C durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Gefäße wurden durch Sterilfiltration (Porengröße 0,2 µm) oder Autoklavieren sterilisiert. Als Ausgangsmaterial dient eine 13-18 d alte Zellkultur. Die Zellsuspension aus einem AnzuchtKolben wurde in ein 50 ml Zentrifugenbecher überführt und 5 min bei 1500 rpm (alle Zentrifugationsschritte in Heräus-Christ Laborzentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das erhaltene Zellpellet in 30 ml 0,24 M CaCl₂ x 2 H₂O resuspendiert. Je 3 ml dieser Suspension wurden mit 3 ml frisch angesetzter Verdauungslösung und 6 ml 0,24 M CaCl₂ x 2 H₂O in einer Petrischale (Ø 9 cm) vermischt. Der Enzymverdau der Zellwandbestandteile erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach 18-20 Stunden wurden die Petrischalen zunächst 30 - 45 min bei 50 rpm geschüttelt, anschließend wurden je 3-4 Verdauungsansätze in ein 50 ml Zentrifugenbecher überführt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 1500 rpm wurde das Pellet mit 30 ml 0,24 M CaCl₂ x 2 H₂O überschichtet, vorsichtig resuspendiert und erneut bei 1500 rpm 5 min wie oben abzentrifugiert. Dieses gewaschene Protoplasten-Pellet wurde in 15 ml Elektrodenpuffer vorsichtig und vollständig resuspendiert. Je 12 ml der Suspension wurden in 15 ml Corex Zentrifugengläser überführt, und 7 min bei 800 rpm zentrifugiert. Die aufgrund der niedrigeren Dichte der Lösung flottierenden Protoplasten wurden mit einer abgeschnittenen 1 ml Eppendorfspitze abgenommen, und in 15 ml Corex-Zentrifugenröhrchen vereinigt.

2.1.6 Die Protoplastierung von Zellen der *Vitis*-Zellkultur

Für die Protoplastierung von Zellen der *Vitis* Zellsuspensionskulturen wurden im Vergleich zur Protoplastierung von Petersiliezellen folgende Parameter verändert.

Der Anteil von Maceroenzym wurde auf 0,6 % erhöht, um einen ca. 90 %igen Anteil an protoplastierten Zellen zu erhalten.

2.1.7 Die Bestimmung der Zellzahl und Aliquotierung

Aus der vereinigten Protoplasten-Suspension wurde nach gründlichem Mischen ein Aliquot von 40 μ l entnommen und mit 960 μ l 0.24 M $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 1:25 verdünnt. Aus der Verdünnung wurde unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe eines Fuchs-Rosenthal-Hämatocytometers die Protoplastenkonzentration der Ausgangssuspension bestimmt.

2.1.8 Ernte von *Vitis* Protoplasten und Zellen

Die Protoplasten wurden in 15 ml Falconröhrchen überführt und auf 14 ml mit 0,24 M CaCl_2 aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 2500 rpm (Heräus Christ Laborfuge) wurde der Überstand abgegossen, das Protoplastenpellet im Restvolumen resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation (30 sec, 10000 rpm, Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgezogen und das Pellet in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2 Transiente Transformation von *Vitis*-Protoplasten durch Elektroporation

Eingesetzte Lösungen

Elektrodenpuffer:

10 mM Tris/Hepes pH 7,2

15 mM MgCl_2

0,5 M Saccharose

Durchführung:

Pro Transformationsansatz wurden 5×10^6 Protoplasten eingesetzt. Die flottierten Protoplasten wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen und pro Ansatz auf eine Zellzahl von ca. 8×10^6 /ml mit Elektrodenpuffer verdünnt. In ein 1.5 ml Eppendorfgefäß wurde 75 μ g Plasmid-DNA vorgelegt, mit 800 μ l Protoplastensuspension vermischt und in sterile Elektrodenküvetten (0,4 cm; Biorad; Hercules, Kalifornien) überführt. Die Elektroporation wurde in der Apparatur von Biorad (Kombination aus Gene Pulser II, Capacitance Extender II und Pulse Controller II; Hercules, Kalifornien) durchgeführt (320V, 125 μ F, $\Omega \rightarrow \infty$; durchschnittliche Pulsdauer ca. 8-10 ms). Die Protoplasten wurden anschließend mit 5 ml MS/0,4 M Saccharose vermischt und analysiert.

2.2.1 Bestimmung der Transformationseffizienz durch *in situ* β -Glucuronidase-Nachweis

Eingesetzte Lösungen

X-Gluc A Lösung:

2 mg X-Gluc A (5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronid)

angelöst in

20 μ l Dimethylformamid

Durchführung:

Vitis Protoplasten wurden durch Elektroporation mit dem *pHG1* Plasmid transformiert, welches in den Zellen zu der konstitutiven Synthese des Enzyms β -Glucuronidase führt. Von dem Ansatz transformierter Protoplas-

ten (in MS/0.4 M Saccharose) wurden 500 µl flottierende Protoplasten mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2 *In vitro* β-Glucuronidase-Assay (GUS-Assay)

Eingesetzte Lösungen

GUS Extraktionspuffer:

50 mM NaPi pH 7

1 mM EDTA

0,1 % Triton X 100

1 mM β-Mercaptoethanol

Stoplösung:

0,2 M NaCO₃

MUG-Lösung

3 mM MUG (Methylumbelliferyl β-D-glucuronid

in DMSO anlösen

Eichlösung:

Na-Metylumelliferon (Na-MU)

(10, 50, 100, 250 nM)

Durchführung:

Für den Aufschluss wurde das angetaute Protoplastenpellet mit 300 µl GUS Extraktionspuffer versetzt und 45 s im Potter bei 1500 rpm aufgeschlossen. Bei Durchführung zweier aufeinanderfolgender Nachweise z.B. Luziferase und β-Glucuronidase Nachweis, wurde der GUS Extraktionspuffer durch den *LUC I* Puffer ersetzt. Die Suspension wurde dabei mit Eis gekühlt um eine Erhitzung des Ansatzes zu verhindern. Der Ansatz wurde anschließend zentrifugiert (15000 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß übertragen, 100 µl wurden für die Proteinbestimmung und 60 µl für den GUS-Test abgenommen.

Pro Probe wurden 60 µl Proteinextrakt zu 30µl MUG Lösung pipettiert und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurden 45 µl abgenommen und in vorgelegte 1.25ml Stoplösung pipettiert. Der restliche Reaktionsansatz wurde weitere 30 min bei 37 °C inkubiert und danach mit Stoplösung versetzt. Das durch die Glucuronidaseaktivität entstandene Na-MU wird fluorimetrisch bestimmt (Exzitation 365nm, Emission 455 nm). Anhand des Substratumsatzes (Produktakkumulation), des Proteingehalts der Probe und der Dauer der Reaktion wurde die spezifische GUS-Aktivität als nmol MU/mg Protein/min berechnet (Jefferson *et al.*, 1986).

2.2.3 Mikroskopie und Dokumentation von GFP-Fusionsproteinen

Jeweils 80 µl transformierte Protoplastensuspension wurden mit abgeschnittener Spitze in die Mulde eines ausgefrästen Objektträgers pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Protoplasten flottieren im dichteren Medium und sammeln sich unter dem Deckglas. Am Fluoreszenzmikroskop Axiovert (Zeiss, Oberkochen) wurde mit einem Standard FITC-Filtersatz die *GFP*-Fluoreszenz angeregt und beobachtet. Nach mehrmaliger unabhängiger Transformation und Beobachtung wurden repräsentative Transformanten sowohl im Fluoreszenz- als auch im Durchlicht durch einen Photoaufsatz mit Belichtungsautomatik fotografiert (Kamera: Contax 167 MT; Filmmaterial: Kodack 64T, Kunstlichtdiafilm). Die Diapositive oder Abzüge der Diapositive wurden mit einem Nikon LS 1000 Diascanner oder Sharp JX-330 Flachbettscanner digitalisiert.

2.3 Stabile Transformation von Zellkulturen der Weinrebe mit der *Particle Inflow Gun* (PIG)

Bestimmung des Frischgewichts/ml Suspensionskultur:

Durchführung:

Vitis Zellkultur wurde leicht aufgeschüttelt und 1 ml Suspension mit einer abgeschnittenen 1 ml Spitze abgenommen und in ein vorher abgewogenes Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde 1 min bei 15000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und 900 µl des Überstandes abgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde mit einer 1 ml Spritze mit feiner Kanüle (30G) die gesamte Restflüssigkeit aus dem Zellpellet abgesaugt bevor die Zellen anschließend gewogen wurden. Eine Zellkultur die sich in der frühen logarithmischen Wachstumsphase befindet weist ca. 60-70 mg Zellen/ml Suspension auf (s. Abb. 8)

Ausplattieren der SuspensionskulturEingesetzte Lösungen:MS/Mannitol-Sorbitol-Platten:

MS-Medium

0.5 (w/v)% Gelrite (Roth)

2% Mannitol (Roth)

2% Sorbitol (Roth)

Durchführung

Autoklavierte Papierfilter (4.5 cm, Schleicher&Schüll) wurden in steriles H₂O_{dest.} eingelegt. Mit einer Pinzette wurde ein Filter entnommen und auf die Bodenfläche eines Büchnertrichters gelegt und dieser in die Gummimanschette einer Saugflasche mit Anschluss an eine Wasserstrahlpumpe eingesetzt. Die Zellkultur wurde leicht aufgeschüttelt und mit einer sterilen abgeschnittenen 5 ml Spitze eine Menge entnommen, die einem Frischgewicht der Zellen von 150 mg entsprach. Die Suspension wurde gleichmäßig auf den Papierfilter geträufelt und die Flüssigkeit durch kurzes Anpressen des Büchnertrichters in die Gummimanschette abgesaugt, so dass sich ein möglichst gleichmäßiger einschichtiger Zellbelag auf dem Papier bildete. Der Filter mit den anhaftenden Zellen wurde anschließend auf eine MS/Mannitol-Sorbitol-Platte überführt. Die Zellen wurden für mindestens 20 Stunden bei 25°C inkubiert.

DNA Präparation nach (Iglesias *et al.*, 1994):Eingesetzte Lösungen:Gold-Suspension:

50 mg Goldpartikel (Ø1.5-3 µm, Sigma)

sterilisiert in 100% EtOH, getrocknet

aufgenommen in 1 ml H₂O_{dest.}DNA-Quelle:

circuläre Plasmid DNA (1µg/µl)

Spermidinlösung:0.1 M Spermidin in H₂O_{dest.}, sterilfiltriert2.5 M CaCl₂-Lösung100% EtOHDurchführung:

50 µl Goldsuspension wurden in ein 0.5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 5-20 µl Plasmid DNA zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurden 50 µl CaCl₂-Lösung und 20 µl Spermidinlösung zugefügt und der Ansatz für 3 min gevortext. Anschließend wurden 100 µl Ethanol (-20°C) zupipettiert. Nach kurzem Vortexen wurden 200µl Ethanol zugeben und Gefäß mehrmals invertiert. Zur Fällung der DNA wurde 30 min bei -20°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (5 min, 15000 rpm, Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgenommen und das Gold/DNA-Pellet unter der Sterilbank getrocknet (10 min). Danach wurden 40 µl H₂O_{dest.} und 10 µl Plasmid DNA zupipettiert (optional) und das Pellet resuspendiert.

Beschuss mit der *Particle Inflow Gun* (PIG):Eingesetzte Materialien:

Streunetze aus Nylon 1 µm Fadenabstand (Eckert, Waldkirch)

in H₂O_{dest.} autoklaviert

Kimwipes, steril

Filterhalter (Gelman sciences)

in H₂O_{dest.} autoklaviert

Metallgittereinsätze für PIG, steril

Durchführung:

Die DNA/Gold-Lösung wurde kurz mit dem Ultraschallstab (25% Leistung, 10s) behandelt, um eine vollständige Suspension der Partikel zu erreichen. Der Druck des Heliumgases an der PIG wurde auf 8 bar eingestellt und die Gittereinsätze in die gewünschten Positionen eingelegt. Das Streunetz wurde auf die obere Gitterplatte mit Öffnung gelegt und mit einem sterilen Metallring fixiert. Von der DNA/Gold-Suspension wurden nach kurzem Mischen 10 µl abgenommen und durch die obere Öffnung auf das Innengitter des Filterhalters pipettiert. Anschließend wurde der 'beladene' Filterhalter in die Düse oberhalb des Streunetzes eingeschraubt. Die vorbereiteten ausplattierten Zellen wurden auf der unteren Gitterplatte positioniert, so dass sich der Filter mit Zellen genau unter dem Zentrum des Streunetzes befand. Die Kammer der PIG wurde geschlossen und ein Vakuum von 0.8 bar angelegt. Sobald dieser Wert erreicht wurde, wurde über die Zündelektronik ein Heliumstoß ausgelöst, welcher die DNA/Gold-Partikel aus der unteren Öffnung des Filterhaltes auf das Streunetz und die darunterliegenden Zellen beschleunigte. Das Vakuum wurde langsam abgelassen und die Platte aus der PIG entnommen, der Deckel aufgelegt und mit Parafilm verschlossen.

PIG entnommen, der Deckel aufgelegt und mit Parafilm verschlossen. Sowohl auf dem Streunetz als auch auf dem Filterpapier mit Zellen ist nach dem Partikelbeschuss ein schwacher bräunlicher Schatten sichtbar. Zum Beschuss weiterer Platten wurde der Filterhalter jeweils herausgeschraubt und erneut mit der DNA/Gold-Suspension 'beladen'. Wurden verschiedene DNA-Präparationen zur Transformation verwendet, wurden Filterhalter und Streunetz jeweils ausgetauscht. Die beschossenen Platten wurden für 1 – 2 d bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

2.3.1 Stabile Transformation und Selektion von *VrGL/LUC* Linien

Eingesetzte Lösungen:

<u>MS-Platten:</u>	<u>Kanamycinlösung und G-418-Lösung</u>
MS-Medium	50 mg/ml in H ₂ O _{dest.} , sterilfiltriert
0.5 (w/v)% Gelrite (Roth)	

Durchführung:

Die Ermittlung geeigneter Selektionsbedingungen zur Regeneration stabil transformierter Zellen wurden in Vorversuchen mit Kanamycinkonzentrationen von 0 - 100 mg/l- bzw. G-418 0-50mg/l Medium ermittelt. Zellen aus der WT-Suspensionskultur wurden wie in Kap. 2.3 beschrieben auf Filterpapierscheiben (Ø 4.5 cm, Schleicher & Schüll) abgenutscht und auf MS-Platten mit verschiedenen Kanamycin- bzw. G-418 Konzentrationen überführt. Für die verschiedenen Konzentrationsstufen wurden jeweils 3 Platten angesetzt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und für 6-8 Wochen bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde das Wachstum bei den verschiedenen Konzentrationen mit den Kontrollen verglichen.

Die mit der PIG transformierten Zellen wurden 1 – 2 d nach der Transformation auf selektives Medium (30 mg/l G-418) überführt. Nach 6-8 Wochen hatten sich 2-15 mm große Kalli aus stabil transformierten Zellen gebildet. Diese wurden auf Einzelplatten überimpft. Um den Kontakt mit dem selektiven Medium zu verbessern wurden die Kalli vorsichtig ausgestrichen. Für diese Kalluskulturen wurde ein Überimpfrhythmus von 14 d eingehalten.

2.4 Bestimmung der Luziferaseaktivität in Protoplasten und Zellen

2.4.1 *In vitro* Luziferase Nachweis

Eingesetzte Lösungen

<u>LUC I Extraktionspuffer:</u>	<u>LUC II Puffer:</u>
100 mM KPi pH 7.8	80 mM Glycylglycin pH 7.8
1 mM DTT	40 mM MgSO ₄
0.05% Tween 20	60 mM ATP

Luziferin: 10 mM Stammlösung in H₂O_{dest.}

Durchführung:

Für den Aufschluss wurde das angetaute Zellpellet mit 300 µl *LUC I* Extraktionspuffer versetzt und 45 s im Potter bei 1500 rpm aufgeschlossen. Die Suspension wurde dabei mit Eis gekühlt um eine Erwärmung des Ansatzes zu verhindern. Nach der anschließenden Zentrifugation (20000 g, 15 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß übertragen. Vom Gesamtproteinüberstand wurden 25 - 75 µl für den Luziferaseassay eingesetzt. Sollte mit denselben Proben ein GUS Nachweis durchgeführt werden, wurde statt des *LUC I* Extraktionspuffers GUS Extraktionspuffer verwendet. Aliquots zur Bestimmung der GUS Aktivität und des Proteingehalts wurden abgenommen.

Die Luziferinlösung (1 mM) wurde in das Reservoir des Luminometers (Microumat LB96P, Berthold) gegeben. Je 25 µl des *LUC II* Puffers wurde in die Vertiefungen einer 96 well Microtiterplatte (Berthold) vorgelegt, anschließend 75 µl des jeweiligen Proteinextraktes zugegeben. Die Injektion der Substratlösung erfolgte automatisch unmittelbar vor der Messung für jede einzelne Vertiefung der Mikrotiterplatte. Die Zahl

der emittierten Photonen in der jeweiligen Probe kann über ein gewünschtes Zeitintervall bestimmt werden (Integrationsmodus).

2.4.2 *In vivo* Luziferase Nachweis

Das im Luziferaseassay verwendete Substrat Luziferin ist membranpermeabel und in geringen Konzentrationen für die Zelle nicht toxisch (deWet *et al.*, 1987). Damit wurden auch *in vivo* Messungen der Luziferaseaktivität in transformierten Protoplasten, Zellen oder Pflanzen möglich (Millar *et al.*, 1992).

Eingesetzte Lösungen

Luziferin: 10 mM Stocklösung in H₂O_{dest.} (Zellen)
1.5 mM Stammlösung in MS/Saccharose Medium (Protoplasten)

Durchführung:

In MS/Saccharose befindliche Protoplasten oder Suspensionszellkultur wurden direkt in die Vertiefungen einer 96 Mikrotiterplatte pipettiert. Die Luziferinlösung wurde 1 – 1.5 mM in MS/Saccharose Medium angesetzt, auf diese Weise wurde ein osmotischer Schock, der zur Lyse der Zellen hätte führen können, vermieden. Die Injektion der Substratlösung erfolgte automatisch unmittelbar vor der Messung für jede einzelne Vertiefung der Mikrotiterplatte. Die Messung der emittierten Photonen erfolgte über einen Zeitraum von 15 s bis 2 min.

Für die Messung der Luziferaseaktivität größerer Kalli oder flächig verteilter Zellen wurde eine 1 mM Luziferinlösung in H₂O_{dest.} angesetzt und in einen Sprühbehälter gegeben. Das Substrat wurde damit direkt auf die zu untersuchenden Proben aufgesprüht. Die anschließende Analyse der Photonemission wurde für größere Proben in der N₂ gekühlten CCD Kamera (Astrocam, UK) vorgenommen. Zum Vergleich wird von der Platte eine belichtete Aufnahme in der CCD Kamera angefertigt (Belichtungszeit: 10-100 ms). Die bei der anschließenden Dunkelaufnahme verwendeten Messzeiten bewegten sich im Bereich von Millisekunden bei starker Expression bis Minuten bei schwacher Expression. Die bei der Umsetzung des Luciferins emittierten Photonen werden von der hochsensitiven Kamera aufgenommen und in Helligkeitswerte/Pixel übersetzt. Die digitalen Aufnahmen wurden gespeichert und über erstellte Masken ausgewertet.

2.5 Anzucht und Infektionen der Weinrebe

6-8 Wochen alte Topfpflanzen verschiedener *Vitis* Arten wurden im Gewächshaus bei etwa 28°C am Tag und 23°C in der Nacht herangezogen. Blätter von 60-80 cm hohen Pflanzen in mittlerer Blattetage wurden mit *Plasmopara viticola* infiziert und nach definierten Zeitpunkten zur weiteren Analyse geerntet.

2.6 Nachzucht des Pathogens *Plasmopara viticola*

Topfpflanzen der Sorte *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau werden zur Anzucht von *Plasmopara viticola* verwendet. Für die Inokulation wurde eine Sporangiensuspension mit einer Konzentration von ca. 40.000 Sporangien/ml hergestellt. Nach Infektion der Unterseite der Blätter wurde über Nacht eine innen befeuchtete Plastiktüte über die Pflanzen gestülpt, um eine sehr hohe Luftfeuchtigkeit zu erzielen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde über Nacht erneut eine befeuchtete Plastiktüte über die Pflanzen gezogen, um die Sporulation zu induzieren. Das Sammeln des Sporenmateri als erfolgte durch Abpinseln.

2.6.1 Infektionen von *Vitis* Pflanzen

Die Blätter der Weinreben wurden mit frisch gesammelten Sporen von *Plasmopara viticola* infiziert, die zuvor in Wasser suspendiert worden waren (ca. 40000 Sporen/ml). Die Sporensuspension wurde als feiner wässriger Nebel auf die Blattunterseite gesprüht, bis das Blatt vollständig benetzt war. Bei Infektionen nur einzelner Blätter wurde ein Gefrierbeutel über die jeweiligen Blätter gestülpt und über Nacht bei ca. 23°C inkubiert. Die Tüten wurden am nächsten Tag abgenommen und das jeweilige infizierte Blatt (lokal) und das darüber liegende Blatt (systemisch) zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet (s. Abb. 11). Die Blätter wurden

sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und entweder bei -70°C eingelagert, oder im Falle von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau immer sofort weiterverarbeitet.

Infektionen mit *Uncinula necator* erfolgten durch Überstreichen der Blattoberseiten mit bereits infiziertem Blattmaterial, wobei der Pilz bereits reichlich sporulierte. Ein genaues Inokulum konnte aufgrund dieses Infektionsverfahrens nicht angegeben werden. Die Pflanzen wuchsen unter den oben beschriebenen Bedingungen heran.

2.6.2 Infektionen von Blattscheiben

Eingesetzte Lösungen

2 ml Lösung mit den Resistenzinduktoren in unterschiedlichen Konzentrationen

Sporangiensuspension (je nach Experiment 40.000-80.000 Sporangien/ml)

Durchführung

Für Experimente zur Sporenkeimung auf der Wirtspflanze wurden Blattscheiben verwendet. Hierzu wurden turgeszente Blätter von *Vitis vinifera* im gleichen Blattalter (6. entfaltetes Blatt ab Triebspitze) geerntet. Die Oberfläche der Blätter wird kurz mit Ethanol sterilisiert, dreimal in destilliertem Wasser gewaschen und vorsichtig mit saugfähigen Wischtüchern abgetrocknet. Mit einem Edelstahlkorkbohrer werden dann auf einer Kautschukunterlage Blattscheiben mit einem Durchmesser von 11 mm ausgestanzt. Beim Ausstanzen der Blattscheiben ist darauf zu achten, dass sich keine größeren Blattadern in der Mitte der Blattscheiben befinden, da sonst der Inokulumstropfen abrollt. Die Blattscheiben werden nach dem Ausstanzen mit der Blattunterseite nach oben in *wells* mit einem Durchmesser von 11,5 mm und 2 ml Lösung, die die Resistenzinduktoren enthält, gelegt. Nach 24 Stunden wurde das Inokulum in Form von 50 µl Tropfen aufpipetiert. Von der davor ausgezählten und eingestellten Sporangiensuspension werden pro Blattscheibe 100 µl verwendet. Die mit Blattscheiben und Inokulum bestückten Schalen werden bei 22°C im Weißlicht inkubiert.

2.7 DNA Isolation aus der Weinrebe

Zur Isolation von hochmolekularer DNA aus *Vitis spec.* wurde die Methode nach STEENKAMP, 1994 in abgeänderter Form angewandt.

Eingesetzte Lösungen:

DNA Extraktionspuffer

3% (w/v) CTAB

1,4 M NaCl

20 mM EDTA

1 m Tris-HCl pH 8,0

Chloroform/Isoamylalkohol

Chloroform/Isoamylalkohol 24:1

Isopropanol

70% Ethanol

Durchführung:

Zuerst wird der DNA-Extraktionspuffer auf 65°C vorgeheizt. Das gefrorene Material wurde im Mikrodis-membrator pulverisiert und anschließend in 2 ml Reaktionsgefäße mit 1ml heißem Extraktionspuffer versetzt. Die Proben werden kurz gemischt (Vortex) und dann für 2-3 min bei 65°C geschüttelt. Im Anschluss wird mit Chloroform/Isoamylalkohol aufgefüllt, gemischt (Vortex) und bei 4°C und 13000rpm 10 min zentrifugiert. Nach der Phasentrennung wird die Oberphase vorsichtig mit der Pipette abgenommen und in ein neues Reak-tionsgefäß überführt. Die Extraktion mit dem Chloroform/Isoamylalkohol wird ein zweites Mal durchgeführt, die Oberphase abgenommen und der Überstand mit 60% dessen Volumens mit Isopropanol aufgefüllt. Die Fällung erfolgt bei -20°C für 1h. Nach der Fällung wird die DNA bei 4°C und 13000rpm für mind. 20 min abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 1ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Eintrocknen in der *SpeedVac* wird die DNA in einem geeigneten Volumen aufgenommen und zur Über-prüfung der Qualität wird ein Aliquot dieser Lösung auf ein Agarose Gel gegeben.

2.8 Isolierung von Gesamt-RNA aus der Weinrebe und deren Zellsuspensionskulturen

Bei RNA-Extraktion aus Zellkulturen wurden ca. 15 ml Zellkultur entnommen, über ein Filterpapier abge-nutscht und sofort in einer Microdissmembratorkartusche in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei unter-

schiedlichen Entnahmezeitpunkten geht man entsprechend vor, entnimmt jeweils ca. 15 ml, nutsch ab und friert die Zellen bei -70°C ein bis die letzte Probe entnommen ist und die RNA von allen Proben isoliert wird. Bei der RNA-Extraktion aus Blättern wurden die Blätter ebenfalls in Microdissmembratorkartuschen und flüssigem Stickstoff schockgefroren und sofort weiterverarbeitet.

Eingesetzte Lösungen:

RNA Extraktionspuffer:

100 mM Tris/HCl pH 8,0

2 M NaCl

25 mM EDTA

2% (w/v) CTAB

0,5 g/l Spermidin

2% β -Mercaptoethanol*

* frisch zugeben

Isoamylalkohol/Chloroform:

1:24 Isoamylalkohol/Chloroform

Präzipitationspuffer:

10 M LiCl

0,5% SDS

Durchführung:

Zuerst wird der RNA-Extraktionspuffer auf 65°C vorgeheizt. Die gefrorenen Zellen werden im Mikrodisseminator pulverisiert und anschließend in Reaktionsgefäße mit 1 ml heißem Extraktionspuffer versetzt. Die Proben werden kurz gemischt (Vortex) und dann für 2-3 min bei 65°C geschüttelt. Im Anschluss wird mit Chloroform/Isoamylalkohol aufgefüllt, gemischt (Vortex) und bei 4°C und 13000rpm 10 min zentrifugiert. Nach der Phasentrennung wird die Oberphase vorsichtig mit der Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol wird ein zweites Mal durchgeführt, die Oberphase abgenommen und der Überstand mit $\frac{1}{4}$ dessen Volumens durch LiCl (10M) gefällt (zum Mischen nur 3x wenden, nicht vortexen!). Die Fällung erfolgt bei 4°C über Nacht.

Nach der Fällung wird die RNA bei 4°C und 13000rpm für mind. 20 min abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 0,5 ml SDS (0,5%) resuspendiert (Vortex) und für 3 min bei 65°C inkubiert. Die Proben werden nun erneut mit 0,5ml Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, wie oben zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und mit dem zweifachen Volumen Ethanol versetzt. Die RNA wird nun mindestens für 2h bei -20°C gefällt (oder auch über Nacht).

Bei 4°C und 13000rpm wird die RNA 20 min lang pelletiert und in $50\mu\text{l}$ DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Mit dieser Methode konnten aus 100 mg Blattgewebe ca. 15 μg Gesamt-RNA mit einer hohen Reinheit ($A_{260/280\text{nm}}$ betrug 1,9-2,0) isoliert werden.

2.8.1 Elektrophoretische RNA-Auftrennung und Kapillarblot (*Northern Blot*)

Eingesetzte Lösungen:

Denaturierungspuffer:

720 μl Formamid, deionisiert

160 μl 10x MOPS

260 μl 37% Formaldehyd

10 μl Glycerin

80 μl Bromphenolblau (gesättigte Lösung)

180 μl H_2O

Gellaufpuffer

1x MOPS (3-[N-morpholin]propansulfonsäure)

10x MOPS:

0,2M MOPS

0,05 M NaAc

0,01 M EDTA

Durchführung:

Vakuumgetrocknete Gesamt-RNA (je 20 μg /Spur) wurden in 20 μl Denaturierungspuffer aufgenommen, 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend in Ethidiumbromid-haltigen (0,01%) Agarose (1%)-Formaldehyd-Gelen (Davis *et al.*, 1986) elektrophoretisch bei $200 V_{\text{const}}$ aufgetrennt. Die aufgetrennte RNA wurde über Nacht mit der Kapillarblotmethode auf UV Duralon Membranen (Stratagene; La Jolla, USA) transferiert und diese anschließend 2-3 Stunden bei 80°C getrocknet (Davis *et al.*, 1986). Neben der Bestimmung des RNA-Gehalts der Proben wurde über eine optische Kontrolle des mittransferierten Ethidiumbromids unter UV-Bestrahlung der Membran die gleichmäßige Beladung der einzelnen Gelspuren überprüft.

Agarose/Formaldehyd Gelsystem:

Flachbettgel mit 0,5 - 1 cm Schichtdicke. Zusammensetzung des Gels ad 250 ml:

- 3g Agarose (Gibco BRL)
- 25 ml 10 x MOPS Puffer
 - 213 ml H₂O
 - 12,5 ml 37% Formaldehyd
 - 12,5 µl 10 % Ethidiumbromid

Die Agarose wurde in H₂O und 10x MOPS in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 45°C wurde 12,5 ml Formaldehyd (37%) sowie 20µl Ethidiumbromid-Lösung zugegeben (Abzug). Die Agarose-Lösung wurde in die abgedichtete Elektrophoresekammer gegossen, und der Kamm plaziert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von konst. 150 V ca. 3 Stunden durchgeführt.

2.8.2 Markierung genspezifischer DNA Sonden und DNA/RNA Hybridisierung

Durchführung:

Zum quantitativen Nachweis bestimmter mRNA-Spezies in den aufgetrennten und transferierten Gesamt-RNA-Extrakten wurden spezifische, aufgereinigte Fragmente von *Vitis*-cDNA (25-50ng) mit ³²P-Nukleotiden (50µCi) radioaktiv nach FEINBERG und VOGELSTEIN (1983; *random priming*) markiert.

Eingesetzte Lösungen:

DNA: 25-50 ng der durch Restriktionsverdau
oder PCR gewonnenen Zielsequenz

Primer: *random* Hexamer (5 µg/µl)

Desoxynucleotide: dATP, dTTP, dGTP
(8 mM Stammlösungen in H₂O)

radioaktiv markiertes Desoxynucleotid:
γ-[³²P]-dCTP (50µCi, 110 TBq/mmol)

Pipettierschema:

- 1 µl DNA-Lösung (50ng DNA)
- 1 µl primer (5 µg/µl)
- 24 µl H₂O_{dest.}

wurden in einem Reaktionsgefäß vermischt und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde die Mischung für 10-15 min langsam abkühlen gelassen und die weiteren Bestandteile zugegeben.

- je 4 µl dATP, dTTP, dGTP
- 5 µl Klenow-Reaktionspuffer
- 5 µl γ-[³²P]-dCTP
- 2 µl Klenow-Polymerase I (2U/µl)

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig durchmischt und 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide wurde der Ansatz über eine Sephadex G-50-Säulchen chromatographisch aufgetrennt. Dazu wurde in eine Pasteurpipette als Auslaufschutz Glaswolle eingelegt und TE-äquilibriertes Sephadex G-50 bis 0,5 cm unter den Rand eingefüllt. Nach dem Auftragen des Reaktionsgemisches wurde das Eluat in Reaktionsgefäße unter weiterem Auftragen von TE-Puffer aufgefangen. Mit einem Geiger-Müller Zählrohr wurde die erste radioaktive Fraktion, welche die markierte Sonde enthält, detektiert. Die ersten 400 µl dieser Fraktion wurden gesammelt und nach Hitzedenaturierung (7 min, 95°C) ad 5 ml mit Hybridisierungspuffer aufgefüllt.

Für die Hybridisierung eingesetzte Lösungen:100 x Denhardts Reagenz (ad 100 ml):

- 2% (w/v) BSA
- 2% (w/v) PVP
- 2% (w/v) Ficoll 400

Hybridisierungspuffer:

- 50 mM NaPi pH 6,5
- 5x SSC
- 5x Denhardt's
- 0,2% SDS
- 0,1 mg/ml denaturierte
salm sperm DNA
- 50 % Formamid deionisiert

TE-Puffer

- 10 mM Tris/HCl pH 8,0
- 1 mM EDTA

20 x SSC:

- 0.3 M NaCitrat pH 7,0
- 3 M NaCl

20% SDS

Durchführung:

Die getrockneten Membranen wurden mit 5 x SSC befeuchtet und luftblasenfrei in Hybridisierungsröhren eingelegt. Nach Zugabe von 4 –8 ml angewärmten Hybridisierungspuffers wurden die Membranen für 3-5 Stunden bei 42°C in im Hybridisierungssofen (Bachofer) vorhybridisiert. Anschließend wurden die Membranen mit der radioaktiv markierten Sonde in Hybridisierungspuffer über Nacht bei 42°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde unspezifisch gebundene Sonde mit erwärmten SSC/SDS Lösungen abgewaschen. Anschließend wurden die Membranen auf beschichtetes Papier gelegt, mit Haushaltsfolie luftdicht verpackt und in lichtdichten Kassetten zur Exposition bei -70°C von Röntgenfilmen eingesetzt. Zur Detektion schwacher Signale wurde ein signalverstärkender Biomax Screen in Verbindung mit hochsensitiven Biomax Röntgenfilmen (Kodak) eingesetzt.

Verwendete Sonden und Waschbedingungen:

Alle Blots wurden unabhängig von den verwendeten Sonden zweimal 15 min in 2 x SSC bei 42°C und einmal 15 min in 2 x SSC bei 55°C gewaschen.

<i>VGL:</i>	full length cDNA, dreimaliges Waschen für 5 min in 0,5 x SSC bei 60°C.
<i>VCH:</i>	full length cDNA, dreimaliges Waschen für 5 min in 0.5 x SSC bei 60°C.
<i>VKS:</i>	<i>EcoRI</i> Fragment aus dem pCR-4 TOPO Vektor, zwei- bis dreimaliges Waschen für 5 min in 1 x SSC bei 60°C..
<i>LUC</i>	<i>xbaI-NarI</i> Fragment dreimaliges Waschen für 5 min in 2 x SSC bei 60°C

2.9 Techniken zur Manipulation von DNA Sequenzen

2.9.1 Restriktionsverdau von DNA (Vektoren und PCR-Produkte)

Durchführung:

In der Regel wurde folgender Ansatz gewählt: 1 µg DNA wurde mit 1 µl des entsprechenden 10x Puffer, mit 4 Units des Restriktionsenzym und mit H₂O add 15 µl Endvolumen versetzt. Der Verdau wurde bei 37°C 2 Stunden inkubiert. Bei größeren DNA-Mengen wurden die Volumina bzw. Aktivitäten der anderen Komponenten entsprechend erhöht. Die Vollständigkeit des Verdau bzw. die Charakteristik der Bandenmuster wurde auf einem Agaroseminigel geprüft. Bei präparativem Verdau wurde die geschnittene DNA mit einem präparativen Minigel aufgetrennt. Das Gelstück mit dem zu isolierenden Fragment wurde ausgeschnitten und mit dem Gel Extration Kit (Qiagen) extrahiert.

2.9.2 Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden

Durchführung:

Um die Religation eines mit nur einem Restriktionsenzym verdauten Vektors zu verhindern, wurde die linearisierte DNA dephosphoryliert. Zu geschnittener Vektor-DNA wurde die entsprechende Menge an 10x Puffer und 0,2 units/pM DNA-Enden an Calf-Alkaline-Phosphatase (1U/µl) zugeben. Die Reaktion wurde 45 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde nochmals die gleiche Menge Enzym zugegeben und für weitere 45 min inkubiert. Danach erfolgte eine 15 min Inkubation bei 70°C um die Phosphatase zu deaktivieren.

2.9.3 Reinigung von DNA

Mit Qiagen speed columns. Nach Angaben des Herstellers.

2.9.4 DNA-Fällung mit Ethanol

Eingesetzte Lösungen:

3 M NaAc pH 5.5

100% Ethanol (-20°C)

Glykogen (Boehringer)

zur Fällung genomischer DNA

70% Ethanol (-20°C)

Durchführung:

Der Probe wurde 1 Zehntel Volumenanteil Natriumacetat und 2.5 Volumenanteile Ethanol p.A. zugesetzt. Zur Fällung geringer Mengen genomischer DNA wurde dem Ansatz zudem 10-20 µg Glykogen beigegeben. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe ca 30 min bei -20°C gefällt, danach wurde 20 min bei 15000 rpm (0°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet unter Vakuum in der Speed-vac getrocknet und in TE-Puffer oder H₂O_{dest.} aufgenommen.

2.9.5 Ligation von Vektor und DNA-Fragment

Durchführung:

Die Konzentrationen der Vektor- und Insert-DNA wurden auf einem Minigel abgeschätzt. Von der Vektor-DNA wurden 50 – 100 ng/Ligationsansatz eingesetzt, die Insert-DNA wurde in ca. 3 fach höherer Molarität zugegeben. Nach Zugabe von entsprechender Mengen 10x T4-Ligasepuffer und 1 U T4-Ligase wurde mit H₂O_{dest.} ein Endvolumen von 10 µl eingestellt. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 14°C.

2.9.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Eingesetzte Lösungen:

Ethidiumbromid-Lösung:

10µg/ml Ethidiumbromid

Laufpuffer:

1 x TBE (2.13.1.)

Durchführung:

Für bestimmte Größenbereiche der zu isolierenden DNA-Fragmente sind Gele verschiedener Agarosekonzentrationen nötig: 1.5 – 2.0 % (w/v) Agarose-Gel: DNA Fragmente von 50 bis 500 bp; 1.0 % Agarose-Gel: DNA Fragmente von 500 bis 1000 bp; 0.8% Agarose-Gel: DNA größer 1000 bp (Maniatis *et al.*, 1982). In 100 ml 1x TBE-Puffer wurde die entsprechende Menge an Agarose eingewogen. Die Suspension wurde in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurden 2µl Ethidiumbromid-Lösung zupipettiert und die Agarose-Lösung in die abgedichtete Elektrophoresekammer gegossen. Je nach Trenngrößenbereich und Agarosekonzentration wurde die Elektrophorese bei konst. 100 V 1 - 2 Stunden durchgeführt. Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die aufgetrennten Nukleinsäuren werden diese auf dem Transilluminator bei 254 nm Anregung sichtbar.

Agarose-Minigele wurden zur Abschätzung von kleinen DNA-Mengen, zur Kontrolle von Plasmidverdaus, zur Auftrennung von verdauten DNA-Fragmenten im präparativen Maßstab und zur Isolation von DNA-Fragmenten für Markierungen benutzt.

2.9.7 Elution von DNA aus Agarose Gelen:

Durchführung:

Mit Qiagen Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers.

2.9.8 PCR von Plasmiden/DNA Fragmenten und von genomischer DNA

Standard PCR von Plasmiden und DNA Fragmenten:

Eingesetzte Lösungen:

PCR-Mix:

5 µl 10x Puffer
 1 µl dNTP (10 mM)
 20 pmol 5'Primer
 20 pmol 3' Primer
 0.1-10 ng DNA
 Zyklen)
 0.5 U *Taq* Polymerase
 ad 50 µl mit H₂O_{bidest.}

DNA-Quellen:

Verschiedene Vektoren mit Inserts oder cDNA Frag-

Standard PCR Programm:

3 min 94°C
 30 s 54°C, 1 min/1000 bp 72°C, 30 s 94°C (28-33
 Zyklen)
 30 s 54°C, 5 min 72°C, ∞ 4°C.

Durchführung

Die zu amplifizierende DNA wurde auf Eis mit dem PCR Mix versetzt. Das PCR Programm wurde gestartet und die Ansätze in den Block gegeben sobald die Blocktemperatur 94 °C erreicht hatte. Dadurch soll die Synthese unspezifischer Produkte verhindert werden. Die Primer wurden so gestaltet, dass eine *annealing* Temperatur T_m von 52-60°C zur komplementären *template* Sequenz besteht, dabei soll die Differenz der *annealing* Temperatur eines Primerpaares nicht mehr als 5°C betragen. Die DNA Amplifikation durch die PCR wurde auf einem Minigel überprüft und die DNA nach Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) für Restriktionsverdau oder Markierung eingesetzt.

PCR Amplifizierung genomischer Sequenzen:

Eingesetzte Lösungen:

PCR-Mix:

2.5 µl 10x *Taq/Pwo* Puffer *incomplete*
 1 µl dNTP (10 mM)
 3 µl MgCl₂ (25 mM)
 100 ng 5'Primer
 100 ng 3'Primer
 0.1-1 µg genomische DNA
 (35-38 Zyklen)
 ad 25 µl mit H₂O_{bidest.}

DNA-Quelle:

gereinigte genomische DNA aus *Vitis spec.*

PCR Programm:

5-10 min 94°C
 ∞ 80°C, Zugabe des *Taq/Pwo*-Mix
 15 s 62°C, 2 min/1000 bp 68°C, 30 s 94°C
 15 s 62°C, 8 min 68°C, ∞ 4°C.

2.5 U *Taq/Pwo* Polymerase-Mix (separat zugeben)

Durchführung

Das Reaktionsvolumen wurde auf 25 µl verkleinert, die Konzentration der Primer und dNTP jedoch beibehalten. Da die Zielsequenz nur einen äußerst geringen Teil der genomischen DNA darstellt, mußten relativ große Mengen an DNA als *template* eingesetzt werden. Die Primer wurden so gestaltet, dass eine *annealing* Temperatur T_m von mehr als 60 °C zur komplementären *template* Sequenz bestand. Dies verhindert eine Bindung der Primer an Sequenzabschnitte die der komplementären Sequenz ähnlich sind. Die Ansätze wurden bei 94°C in den Block gegeben und 10 min denaturiert. Die lange Denaturierungszeit wird benötigt, da die genomische DNA aufgrund ihrer Größe ein anderes Schmelzverhalten zeigt als Plasmid-DNA. Um die Aktivität der DNA Polymerase nicht durch den langen Denaturierungsschritt zu beeinträchtigen, wurde danach bei 80°C ein *hot start* durchgeführt. Die zur Amplifikation verwendete *Taq/Pwo*-Polymerasenmischung verhindert durch die *proof reading* Aktivität der *Pwo* Polymerase das Auftreten falsch eingebauter Nucleotide in den synthetisierten DNA Molekülen. Dies ist wichtig, da es sonst bei der relativ hohen Anzahl von Amplifikationszyklen leicht zu einer Akkumulation von falsch eingebauten Nucleotiden kommt. Die DNA Amplifikation durch die PCR wurde auf einem Minigel nachgewiesen und die DNA nach der Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) subkloniert und sequenziert.

2.9.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung nach SANGER *et al* (1977) beruht auf einem kontrollierten Abbruch der DNA Synthese durch den Einbau von Didesoxynukleotiden. Die Markierung erfolgt durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten dNTP. Während der elektrophoretischer Auftrennung wurden die Fragmente durch Laseranregung visualisiert. Die Proben wurden von der Servicestation des Zentrums für Biotechnologie sequenziert.

2.9.10 Isolierung genomischer DNA Sequenzen – *Genome Walking*

Jeweils 2.5 µg genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *DraI*, *PvuII*, *ScaI*, *StuI* und *EcoRV* verdaut. Die Ansätze wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform bzw. Chloroform ausgeschüttelt und die wässrige Phase abgenommen. Die DNA wurde anschließend in Anwesenheit von Glykogen gefällt (2.7.4.), getrocknet und in 10 µl TE (10:0.1) aufgenommen. Je 1 µg der geschnittenen DNA wurde nach Angaben des Herstellers zur Ligation mit spezifischen DNA Adaptern (Genome Walking Kit, Clontech) eingesetzt.

Auf diese Weise entstehen 5 genomische Banken aus unterschiedlichen, sich überlappenden Restriktionsfragmenten die am 5' und am 3' Ende die bekannte Adaptersequenz tragen. Durch PCR Amplifikation mit einem adapterspezifischen und einem genspezifischen Primer können auf diese Weise gesuchte 5' oder 3' Sequenzbereiche isoliert werden. Es wurde DNA/Adapter-Banken von *V. vinifera* cv. Müller-Thurgau und *Vitis rupestris* erstellt.

2.10 Transformation von Bakterien

2.10.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (XL-1 blue)

Eingesetzte Lösungen:

<u>TB</u>	<u>SOB-Medium</u> (2.13.1)
10 mMPipes	
55 mM MnCl ₂	<u>LB-Medium</u> : (2.13.1)
15 mM CaCl ₂	
250 mM KCl	

Durchführung:

Bakterienzellen wurden auf eine LB Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 10 -12 grössere Kolonien wurden zur Inokulation von 250 ml SOB (in 2 Liter Erlenmeyerkolben) verwendet. Die Zellen wurden bei 200 rpm und 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 inkubiert (ca. 72 Stunden). Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 min, 4C, 3500g) gesammelt. Das Pellet wurde in 80 ml TB (kalt) resuspendiert und nach weiteren 10 min Inkubation im Eisbad erneut wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 20 ml TB vorsichtig resuspendiert und bis zu einer Endkonzentration von 7 % mit DMSO versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 500 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Zellen können bei Lagerung bei -80°C bis zu 2 Monaten verwendet werden, ohne das die Transformationskompetenz wesentlich beeinflusst wird (INOUE *et al.*, 1990).

2.10.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (BL 21)

Eingesetzte Lösungen:

<u>CaCl₂-Puffer</u>	<u>LB-Medium</u> : (2.13.1)
25 mM Tris-HCl pH 7,5	
10 mM NaCl	
50 mM CaCl ₂	

Durchführung:

Um Bakterien des Stammes BL 21 kompetent zu machen, wurde das Standardprotokoll etwas modifiziert, um in kleineren Mengen arbeiten zu können.

2 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* (Stamm BL21) werden abgenommen, und die Zellen bei 5000rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird resuspendiert und in 2ml eiskaltem CaCl₂-Puffer (25mM Tris-HCl pH7,5, 10mM NaCl, 50mM CaCl₂). 50 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (5min, 5000rpm). Die Zellen wurden in 200µl - CaCl₂ Puffer aufgenommen und für die Transformation bereit gestellt.

2.10.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

*Eingesetzte Lösungen*LB-Medium: (2.13.1)LB/Amp-Medium: (2.13.1)LB/Amp-Agarplatten: (2.13.1)LB/Amp-Kan-Medium: (2.13.1)*Durchführung*

100 µl kompetenter Zellen wurden mit 0.5 µg Plasmid-DNA bzw. 5 - 10 µl Ligationsansatz versetzt, und die Zellsuspension 30-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 60 s auf 42°C inkubiert (heat shock) kurz auf Eis zurückgestellt, mit 400 µl LB-Medium (RT) versetzt und 60 min bei 37°C geschüttelt (200 rpm). Je 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer selektiven LB-Agarplatte ausgestrichen, und die Platten über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Angewachsene Kolonien wurden einzeln in 3ml selektives LB-Medium überführt und wieder über Nacht bei 37°C geschüttelt. Nach diesem Vermehrungsschritt stehen die Bakterien zur Isolation der Plasmid-DNA zu Verfügung („Über-Nacht“ Kultur).

2.10.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Präp)

*Eingesetzte Lösungen:*Aufschlußpuffer:

25 mM Tris/HCl pH 8

50 mM Glucose

10 mM EDTA

2 mg/ml Lysozym (frisch eingewogen)

Acetatpuffer:

3 M NaAc pH 4.8

Aufschlußlösung:

0.2 M NaOH

1% (w/v) SDS

Ethanol p.a.

70% Ethanol

Durchführung:

1,5 ml der Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und mit der Tischzentrifuge 5 min bei 15000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Aufschlußpuffer resuspendiert und nach Zugabe von 5 µl Lysozymlösung 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lysepuffer zugegeben und die Suspension durch mehrfaches Umdrehen durchmischt. Sobald die Suspension aufgeklärt war wurden 150 µl Acetatpuffer zugegeben und gemischt. Das Lysat wurde durch Zentrifugation geklärt (10 min, 20000g, 4°C) und der klare Überstand mit 1.125 ml Ethanol versetzt. Die ausgefallene Plasmid DNA wird durch Zentrifugation gesammelt (45 min, 20000g, 4°C) und anschließend mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung in der Speedvac (5-10 min, RT) wurde das DNA Pellet in 20-30 µl H₂O_{dest} aufgenommen.

2.10.5 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Megapräp)

*Eingesetzte Lösungen:*LB/Amp-Medium:*Durchführung:*

Um größere Mengen (≥ 500 µg) an Plasmid-DNA aus einer Präparation zu gewinnen, wurde nach dem „Plasmid Mega Protocol“ unter Einsatz der Säulen Qiagen-tip 2500 (Qiagen, Hilden) vorgegangen. Eine Einzelkolonie von transformierten *E. coli* wurde für 3 Stunden bei 37°C in 3 ml LB_{Amp} bei 200 rpm vermehrt.

0,5 ml dieser Vorkultur wurde in 500 ml LB_{Amp} überführt und über Nacht unter den gleichen Wachstumsbedingungen weiter angezogen. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (10 min, 6000g, RT) und entsprechend dem Protokoll von Qiagen aufgearbeitet. Die Ausbeute an Plasmid-DNA lag bei den verwendeten Vektoren bei 1-2 mg pro Ansatz.

2.11 Expression von Fusionsproteinen

2.11.1 Überexpression und Aufarbeitung von His6- Fusionsprotein

Eingesetzte Lösungen:

LB-/Kan-Lösung: (50 mg/l)

IPTG:

1 M in H₂O_{dest.}, sterilfiltriert

Durchführung:

1 µg des jeweiligen Expressionsplasmids wurde in kompetente BL21 Zellen transformiert. Die transformierte Vorkultur wurde in 3 ml LB-Medium bei 180 rpm und 37 °C geschüttelt. Aus dieser Übernachtskultur wurde 1 ml zur Inokulation von 500 ml LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) verwendet. Die Bakterien wurden bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ 0,7 - 0,9 herangezogen, anschließend erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG-Lösung bis zur Endkonzentration von 2 mM (Kontrolle ohne IPTG Zugabe). Für die Expressionskinetik wurde zu diesem Zeitpunkt 1 ml der Suspension als Nullwert abgenommen, die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (3 min, 15000 rpm, Tischzentrifuge) und eingefroren. Dieser Schritt wurde vor der Ernte der Zellen wiederholt. Die Ernte der Zellen nach 1h, 3h und 5h erfolgt durch Zentrifugation (10 min, 6000g, RT) der Bakteriensuspension. Bis zur Aufarbeitung können die Zellen bei -20°C aufbewahrt werden.

Bei der Überexpression und Aufreinigung von Harpin kann man sich die enorme Hitzestabilität dieses Proteins zu Nutze machen. Harpin bleibt durch den hohen Gehalt an Glycin bei Temperaturen bis 100°C in nativem Zustand. Dadurch ermöglicht sich die Aufreinigung nach folgender Methode:

Eingesetzte Lösungen

SDS-Probenpuffer:

65 mM Tris/HCl

4 M Harnstoff

15% (v/v) Glycerin

7% (w/v) SDS

0,05% (w/v) Bromphenolblau

14 mM β-Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)

Extraktionspuffer:

50 mM Tris pH 8,0

100 mM NaCl

1mM EDTA

1 mM PMSF (frisch zugesetzt)

Durchführung:

500 ml der Bakterienkultur OD 0,8 wurden mit IPTG induziert und 5h bei 200 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert und in Extraktionspuffer resuspendiert. Die Lösung wurde nun für 30 sec mit Ultraschall behandelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 100°C für 10min um die Proteine zu denaturieren. Nun können die Zellwandfragmente und denaturierte Proteine abzentrifugiert (4°C, 13000rpm, 10 min) werden. Der Überstand wurde vereinigt und durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat (45% Endkonzentration einer gesättigten Lösung) gefällt. Durch erneutes Abzentrifugieren bei 4°C, 13000rpm, 10 min wird das Protein pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.11.2 Die Bestimmung des Proteingehalts mit Amidoschwarz

Eingesetzte Lösungen

Fällungslösung:

10% Essigsäure

90% Methanol

1 Spatelspitze Amidoschwarz

Waschlösung:

10% Essigsäure

90% Methanol

0,2 M NaOH

Durchführung:

Die Proteinbestimmung wurde mit Amidoschwarz modifiziert nach Popov *et al.* (1975) durchgeführt. Ein Volumenteil Proteinlösung wurde mit dem vierfachen Volumen Fällungslösung auf dem Vortex gemischt und 15 min bei Raumtemperatur und 15000 rpm (Sigma-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat zur Entfernung von überschüssigem Amidoschwarz mit 1 ml Waschlösung versetzt und anschließend 15 min bei Raumtemperatur und 15000 rpm (Sigma-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml 0,2 M NaOH gelöst und die Extinktion der Lösung bei 615 nm gemessen. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve, die im Bereich zwischen 1 und 40 µg Protein pro Milliliter Messlösung Linearität aufwies. Für jede Proteinbestimmung einer Probenlösung wurden zwei Parallelmessungen durchgeführt.

2.11.3 Gelsysteme zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen

Eingesetzte Lösungen:

Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung:

30 % (w/v) Acrylamid

10 % Ammoniumpersulfat

TEMED

Gellaufpuffer:

25 mM Tris / HCl pH 8,3

0,1 % (w/v) SDS

192 mM Glycin

Für ein Minigel wurden 10 ml Trenngellösung und 2 ml Sammelgellösung angesetzt

Die Proteine aus den Proteinlösungen wurden nach ihrer Größe im denaturierendem Gelsystem nach Lämmli elektrophoretisch aufgetrennt. Das verwendete Gelsystem besitzt einen optimalen Trennungsbereich zwischen 40 - 90 kDa. Die Auftrennung erfolgte in einer Minigelapparatur (Biometra, Göttingen). Vor dem Zusammensetzen der Minigel-Apparatur wurden die Glasplatten, Spacer und Kämmen mit tech. Ethanol gereinigt. Nach dem Eingießen der Trenngelmischung wurde die langsam auspolymerisierende Lösung mit 2-Propanol/Wasser (1:1) überschichtet, um ein Eintrocknen des Gels zu vermeiden. Nach dem Ende der Polymerisierungsreaktion, am Auftreten einer scharfen Phasengrenze zwischen Gel und Isopropanol/Wassergemisch erkennbar, wurde die überschichtete Lösung vollständig entfernt. Die vorbereitete Sammelgellösung wurde nun eingegossen und die mit 10% APS befeuchteten Kämmen eingesetzt. Die auspolymerisierten Gele konnten bis zum Gebrauch noch ein bis zwei Tage bei 4°C und Wasserdampfsättigung gelagert werden oder wurden sofort verwendet. Vor dem Beladen wurden die Taschen nach dem Entfernen des Kammes auf Verunreinigungen durch Gelstückchen hin untersucht.

Je nach Trenngeltyp und Proteingröße laufen die Gele bei konst 25-30 mA und einer Spannungsbegrenzung von 150 V zwischen 2 und 6 Stunden.

2.11.4 Coomassie-Brillant-Blue Färbung

Eingesetzte Lösungen:

Färbelösung:

7 % (v/v) Essigsäure

47 % (v/v) Methanol

0,2 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue

Entfärbelösung:

10 % (v/v) Essigsäure

40 % (v/v) Methanol

Durchführung :

Das Gel wurde unter Schütteln ca 15-60 min in der Färbelösung inkubiert, danach bis zur optimalen Kontrastierung der Banden in der Entfärbelösung geschüttelt.

2.12 Extraktion von Salicylsäure (SA)

Eingesetzte Lösungen:

Methanol 90%

TCA 15%

TCA 5%

Ethylacetat

Durchführung:

Nach Wiegen der Blätter wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Mikrodismembrator pulverisiert. Aufgeteilt in vier 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde das Blattmaterial mit je 1ml Methanol (90%) versetzt, um die SA zu lösen. Nachdem das übrige Blattmaterial 15 min bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugiert wurde, konnte der Überstand, der die in MeOH gelöste SA enthält, in einen Rotationsverdampferkolben überführt werden. Die Extraktion wird ein zweites Mal mit 1ml MeOH wiederholt und von den gesammelten Überständen wird bei 40°C und 200mbar das Methanol abgezogen bis nur noch 2ml des Extrakts übrig sind. Die verbliebene wässrige Phase wird mit 50µl Trichloressigsäure (TCA 5%) versetzt und bei Bedarf mit H₂O_{bidest.} auf 2 ml in Reaktionsgefäße aufgefüllt.

Bis alle Blattproben aufgearbeitet waren, wurden die Extrakte auf -20°C gelagert. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgt dann mit allen SA-Extrakten gemeinsam. Die 2ml Extrakt wurden bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert und 500µl des Überstandes mit 100µl TCA (15%) und einer Spatelspitze NaCl versetzt und mit KOH auf pH 7 eingestellt. Es wurde zweimal mit 0,75 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und zwischendurch 1min gemischt. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die oberen Phasen wurden in neue Eppendorfgefäße überführt, das Ethylacetat im Speedvac abgezogen. Für die HPLC-Messung der freien SA wurden die Proben in 350µl MeOH (HPLC-Qualität) und 1,05 ml Wasser resuspendiert und in *HPLC-Vials* abgefüllt.

2.13 Untersuchungen zum Protoneninflux in Zellsuspensionskulturen

Eingesetzte Lösungen:

Zellsuspensionskulturen

Elicitoren

pH 5- pH 6 Eichlösung (Roth)

Durchführung:

Aus einer Zellkultur von *Vitis rupestris* werden 5 ml in ein kleines Rundhalsgefäß gegeben und auf einem Schüttler (180 rpm) vorbereitet. Nachdem die pH Elektrode in Eichlösungen äquilibriert und die entsprechenden pH-Werte auf dem Schreiber markiert wurden, wurde die pH-Elektrode in das Rundhalsgefäß hineingestellt und so fixiert, dass die stets von der Zellkultur umspült wird. Vor der ersten Elicitorgabe lässt man den pH-Wert der Kultur auf einen konstanten Wert einpendeln. Dieser liegt idealerweise zwischen pH 5 und pH 5,5.

Hat sich das System auf einen konstanten Wert eingependelt, so kann die Zugabe des Elicitors erfolgen.

2.14 Mikroskopische Analysen

2.14.1 Entfärbung von Blattscheiben

Entfärbung von Blattscheiben durch Kaliumhydroxid

*Eingesetzte Lösungen*Entfärbelösung A

1 M Kaliumhydroxid (KOH)

Durchführung:

Die Blattscheiben wurden in 30 ml 1 M KOH überführt. Anschließend wurden die Blattscheiben in KOH bei 121°C und 1,2 bar für 10 Minuten autoklaviert. Das KOH wurde danach vorsichtig durch destilliertes Wasser ersetzt. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend konnten die nun ausgebleichten Blattscheiben auf einen Objektträger überführt und gefärbt werden (HOOD *et al.*, 1996).

2.4.1.2 Entfärbung der Blattscheiben durch Chloroform/Ethanol/Trichloressigsäure

*Eingesetzte Lösungen*Entfärbelösung B

9,2 mM Trichloressigsäure (TCA) in

20% (v/v) Chloroform

80% (v/v) Ethanol

Durchführung:

Die Blattscheiben wurden in 30 ml der Entfärbelösung überführt. Nach einer ca. dreistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur waren die Blattscheiben ausgebleicht. Die Entfärbelösung wurde dann durch destilliertes Wasser ersetzt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Die Entfärbelösung konnte mehrfach verwendet werden. Nach dem Waschvorgang wurden die Blattscheiben auf einen Objektträger gebracht und gefärbt (WILLIAMSON *et al.*, 1999).

2.14.2 Färbungen von *Plasmopara viticola*Anilinblau-Färbelösung0,05% (w/v) Anilinblau in 0,067 M Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) pH 9,8*Durchführung:*

Einige Tropfen der Anilinblau-Färbelösung wurden auf die Blattscheiben gegeben. Nach 5 bis 10 Minuten wurde die Färbelösung vorsichtig mit Wischtüchern entfernt und durch einen Tropfen destilliertes Wasser ersetzt. Sie konnten nun mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden (HOOD *et al.*, 1996).

2.14.3 Fluoreszenzmikroskopie

Für die mikroskopische Auswertung wurde ein Epifluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Göttingen) mit einer Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50 verwendet. Aniliblau-gefärbte Präparate wurden bei einer Anregungswellenlänge von 395-440 nm, einem Farbteiler bei 460 nm und einem 470 nm-Emmissionsfilter ausgewertet. Die Präparate wurden mit Plan-Neofluar-Objektiven bei 40-facher Vergrößerung betrachtet. Die Aufnahme von Bildern erfolgte durch eine Digitalkamera (AxioCam, Zeiss), für die Bildbearbeitung und -analyse wurde das zugehörige Programm AxioVision verwendet.

2.14.4 Elektronenmikroskopie

Die Präparation und Berarbeitung der Gewebeproben für die Elektronenmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Volker Speth (Universität Freiburg), wie in EICHENBERG *et al.*, 1999 durchgeführt.

2.15 Anhang zum Methodenteil:**2.15.1 Häufig verwendete Lösungen und Puffer:**LB-Medium:

10 g Bacto-Tryptone

5 g Bacto-Yeast Extract

5 g NaCl

10 mM Tris/HCl pH 8

0,1 mM EDTA

LB-Agarplatten:

wie LB-Medium; zusätzlich 15 g Bacto-Agar/l zugeben. Nach Autoklavieren gießen.

LB-/Amp-Agarplatten:

wie LB-Platten, mit 100 µg/ml Ampicillin, erst nach Autoklavieren zugeben.

SDS-Probenpuffer:

65 mM Tris/HCl pH 7,8
 4 M Harnstoff
 5% SDS
 10 mM DTE
 15% (v/v) Glycerin
 0,05% (w/v) Bromphenolblau

10x TBE:

0,5 M Tris/HCl pH 8,3
 0,5 M Borsäure
 10 mM EDTA

Färbepuffer:

1% (w/v) Bromphenolblau
 1% (w/v) Xylencyanol
 49% (v/v) Glycerin
 49% (v/v) 10x TBE

SOB: (11)

20 g Bacto-Tryptone
 5 g Bacto-Yeast Extract
 0,5 g NaCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄

MS-Medium Modifikation Nr. 1:

Makroelemente:

825 mg/l NH₄NO₃
 950 mg/l KNO₃
 85 mg/l KH₂PO₄
 87,86 mg/l MgSO₄
 166 mg/l CaCl₂

Spurenelemente:

6,2 mg/l HBO₃
 16,9 mg/l MnSO₄ x H₂O
 8,6 mg/l ZnSO₄ x 7 H₂O
 0,25 mg/l Na₂MoO₄x 2H₂O
 0,025 mg/l CuSO₄ x 5 H₂O
 0,025 mg/l CoCl₂ x 6 H₂O
 36,7 mg/l FeNaEDTA

Vitamine:

100 mg/l myo-Inosit
 0,1 mg/l Thiamin HCl
 0,5 mg/l Pyridoxal HCl
 0,5 mg/l Nicotinsäure
 2 mg/l Glycin

Hormone/ Zucker:

1 mg/l 2,4 D
 20 g/l Saccharose

pH-Wert mit KOH auf 5,5 einstellen

MS-Platten:

MS-Medium

0.5 (w/v)% Gelrite (Roth)

Für die Nachzucht von *Phytophthora infestans* wurden Gemüsesaftagar-Platten verwendet.

Gemüsesaftagar-Platten 11

200 ml (Albi)

2g CaCO₃

18 g Agar

ad H₂O

Für die Nachzucht von *Pseudomonas syringae* wurde M1-Platten bzw. Flüssigmedium verwendet.

M1-Medium 11

5 g Pepton
 3g Fleischextrakt
 Glycerin 10 ml
 ad H₂O
 18 g Agar (optional)

2.15.2 Verwendete Plasmid-Vektoren

pBS KS II (Stratagene)
 pLUC+ (Promega)
 pGHi (G. Neuhaus) – Vektor mit 35S-CaMV-GUS Kasette.
 pET-24a (Novagen)
 pET-24b (Novagen)
 p CAMBIA2300 (Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture)

2.15.3 Verwendete E.coli-Stämme

BL21(Stratagene)
 XL-1 blue (Stratagene)
 DH10B (Clontech)

2.16 Oligosequenzen:**2.16.1 Klonierungen und Primersequenzen:**

Die Amplifikation der cDNAs mit spezifischen Schnittstellen erfolgte mittels PCR, die annealing Temperaturen der genspezifischen Primer lagen für Standard-PCR bei 54°C, für die PCR Amplifikation unbekannter 5' Bereiche wurden Primer mit einer annealing Temperatur von 62 – 68°C verwendet. Die angefügten Schnittstellen sind jeweils angegeben. Als Template für die PCR Amplifikationen wurde eine bereits vorhandene cDNA aus *V. vinifera* (BUSAM, 1997 Dissertation) benutzt, falls nicht anders angegeben. Für die Klonierung der *VGL* wurde ein 3' Primer in der codierenden Sequenz hergestellt und mit Primern, die an den Vektoren greifen (T3, T7, M13-20, reverse) die PCR durchgeführt.

2.16.2 Primer zur Amplifikation der Glukanase (*VGL*)

Für die Klonierung der *VGL* wurde ein 3' Primer in der codierenden Sequenz hergestellt und mit Primern, die an den Vektoren greifen (SK-1) die PCR durchgeführt.

VGL

5' GSP 1 : CCC TTG ACA TGC TGA ATC AAA TTG G

SK-1

5' GGC GGC CGC TCT AGA AC

2.16.3 Primer zur Amplifikation der Chitinase III (*VCH*)

Die Sequenz war in der Datenbank vorhanden und es wurden Primer konstruiert, die sowohl für die Klonierung in den pSK- Vektor und in den Expressionsvektor pET 24a geeignet waren.

VCH III

5'GSP 1: *Sal I* : GAA TGG CTA GAA CCC CCC AA

5'GSP 2 : *Not I* CAC ACA CTG CTC TTA ATG GAA G

2.16.4 Primer zur Amplifikation für ein Fragment der Kallososeynthese

Aus der Datenbank wurden Sequenzvergleiche mehrerer Gene, die für eine Kallososeynthese aus der Gruppe der dikotylen Pflanzen codieren verglichen und in konservierten Bereichen degenerierte Primer konstruiert, die ein Fragment von ca. 845 bp amplifizieren sollen. Es wurden keine Schnittstellen angehängt, sondern über einen *TA Kit* kloniert

VKS

5'GSP 1 : CNG GNA TGA TGT AYT TAY AG

5'GSP 2 : ACY ZGD ATR TAY TCR TGR TG

2.16.5 Primer für die Klonierung der VGL Promotoren in den pLUC-Vektor

Um die isolierten und sequenzierten Promotoren in den geeigneten Reporter-Vektor zu klonieren, wurde ein Primer entwickelt, der eine *Nco I* Schnittstelle besitzt, wobei das Startcodon in diese Schnittstelle integriert wurde. Die Promotoren konnten in einer Länge von 920 bp bzw. 922 bp isoliert werden, bei -920 bp bzw. -922 bp wurden Primer gemacht, denen eine *Kpn I* Schnittstelle angeheftet wurden. Da beide Promotoren bei -250 bp eine interne *Nco I* aufwiesen, wurde das erhaltene PCR-Produkt zunächst *Kpn I* - *Nco I* geschnitten, beide Fragmente (250bp und 670bp) aus dem Gel isoliert, und zuerst das 670 bp große Fragment in den pLUC-Vektor ligiert. Durch erneuten *Nco I* Verdau wurde der Vektor linearisiert und das 250 bp große Fragment eingeführt. Über Restriktionsanalysen und Sequenzierung wurde die Orientierung überprüft. Es wurde nur mit den in richtiger Orientierung erhaltenen Klone weitergearbeitet.

VGL Promotor

5,GSP 1 : *Kpn I* : CTC GGA TTA AGT TAT TTK ACT TTT C

5,GSP 2 : CGC CAT GGT GGA GRA GAA AGA GAA (enthält *Nco I* Schnittstelle)

2.16.6 Primer für die Überprüfung der Integration des VGL Promotors in transgenen Zellkulturen

Die durch *particle inflow Gun* transformierten Zellkulturen wurden durch einen PCR Nachweis auf die Integration des Luziferasegens hin überprüft. Dabei wurde ein Primer entwickelt, der bei + 58bp des Luziferasegens bindet und bei erfolgreicher Integration mit dem VGL Promotor GP 1 Primer nach Amplifizierung ein Produkt von 980 bp entsteht.

5,GSP 1 : *Kpn I* : CTC GGA TTA AGT TAT TTK ACT TTT C

5,GSP 2 : ATA GAA TGG CGC CGG GC (enthält *Nar I* Schnittstelle)

2.16.7 Primer für die Klonierung genomischer 5' Sequenzabschnitte

VGL

5'GSP 1: ATC TTG CAC CAC AAC TCC AGG AGC CTT

5'GSP 2: CCG GCT GAT GGC CAA CCA CTC TCT GA

VCH3III

5'GSP 1: *xba I* : GAG GAA GGC TAT GTT AAC GTA GGA GT

5'GSP 2: *xho I* : TGA GAG GGA GAT GAG CAG AGG TGT

Adapterprimer 1

5'AP 1: GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C

Adapterprimer 2

5'AP 2: ACT ATA GG CAC GCG TGG T

2.16.8 Primer für GFP-Konstrukte

Die cDNA des *VGL* wurde mit den entsprechenden Primern amplifiziert. Die Ligation der *BamHI* bzw. *xho I* geschnittenen Fragmente erfolgte über die *BamHI* - *xho I* Schnittstellen in der MCS des pMAV4 Vektors (verändert KIRCHER Dissertation 1999).

VGL

5' GSP 1 : *BamHI* : ATG GCT ATG TTT GAT TCC AC

5' GSP 2 : *xho I* : GTT GAA ATT GAT TGG GTA TTT

2.16.9 Primer für pET 24 - Konstrukte

Die cDNA der *VGL* sowie der *VCH III* wurden für eine Expression E. coli in pET 24a Vektoren kloniert.

VGL

5' GSP 1 : *EcoRI* : ATG GCT ATG TTT GAT TCC AC

5' GSP 2 : *xho I* : CGT TGA AAT TGA TTG GTA TTT

VCH III

5' GSP 1 : *Sal I* : ATG GCT AGA ACC CCC CAA

5' GSP 2 : *Not I* : CAC ACA CTG CTC TTA ATG GAA G

Für die Amplifizierung des Harpin Elicitors wurden Primersequenzen ermittelt, die ein Harpin (HrpZ) aus *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola amplifizieren. Die Primer wurden so gesetzt, um das PCR-Produkt direkt in den pET 24a Vektor klonieren zu können.

5' GSP 1 : *EcoRI* : ATG CAG AGT CTC AGT CTT

5' GSP 2 : *Hind III* : GGC AGC AGC CTG GTT TTT

2.16.10 Primer für die Amplifizierung der 35S-Kan (npt II) Kasette

Um das Gen für die Neomycinphosphotransferase in den *LUC* Vektor einzubauen, wurde zunächst die npt II Kasette aus einem pUC 18 Vektor über *EcoRI* ausgeschnitten und in den pSK Vektor eingebaut. Anschließend wurde über PCR diese Kasette amplifiziert, wobei an diesen Primern eine *Nde I* Schnittstelle angehängt wurde.

5' GSP 1 : *xho I-Nde I* : ACT CAC TAT AGG GCG AAT TGG AG

5' GSP 2 : *Nde I* : CTA AAG GGA ACA AAA GCT GGG TAC

2.16.11 Primer für die VGL Promotordeletionskonstrukte

Der vollständige *VrGL* Promotor bzw. die verkürzten Promotorfragmente wurden durch PCR amplifiziert, und die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen Fragmente in den *LUC+* Vektor ligiert.

DEL I: Δ -568 VrGL Promotor

5' *Kpn I* : ATT TTA AAA RTR TAT TTG ACA

DEL II: Δ -324 VrGL Promotor

5' *Kpn I* : TTG GGA TTA GAG ATT AAC TTA GG

DEL III: Δ -163 VrGL Promotor

5' *Kpn I* : TCA AAT TTC CAT GGA GTG C

für alle PCR Amplifikationen wurde folgender 3' Primer verwendet

5' GSP : ATA GAA TGG CGC CGG GC (enthält *Nar I* Schnittstelle)

Alle Promotorfragmente wurden über *Kpn I/Nar I* in den entsprechend geöffneten *LUC+* Vektor inseriert.

2.17 Protein- und DNA Größenmarker

SDS 7B (Sigma)

210 kDa, 125 kDa, 96 kDa, 74 kDa, 56 kDa, 35 kDa, 25 kDa

DNA-Größenmarker:

GeneRuler 1kb DNA Ladder (MBI)

2.18 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid.....	Roth,Karlsruhe
Agarose.....	Gibco BRL,Karlsruhe
Ammoniumpersulfat.....	Merck,Darmstadt
Amidoschwarz.....	Sigma, München
Ampicillin.....	Boehringer,Mannheim
Bacto-Agar.....	DIFCO,KARLSRUHE
Bacto-Tryptone.....	DIFCO,KARLSRUHE
Bacto-Yeast.....	DIFCO,Karlsruhe
Bovines Serum Albumin Fraktion V.....	Sigma,Deisenhofen
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP).....	Biomol,Hamburg
Bromphenolblau.....	Merck,Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R/G 250.....	Serva,Heidelberg
Dithioerytrit (DTE).....	Serva,Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO).....	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintriessigsäure.....	Roth,Karlsruhe
Ethidiumbromid.....	Roth,Karlsruhe
Fleischextrakt.....	DIFCO,KARLSRUHE
Formamid.....	Roth,Karlsruhe
Formaldehyd.....	Roth,Karlsruhe
β -Mercaptoethanol.....	Roth,Karlsruhe
N,N,N',N'-Methylenbisacrylamid (Bis).....	Roth,Karlsruhe
Milchpulver.....	Frema,Herrenberg
Natrium Dodecylsulfat (SDS).....	Roth,Karlsruhe
Nitroblue Tetrazolium (NBT).....	Sigma,Deisenhofen
Nylonmembranen, positiv geladen.....	Boehringer, Mannheim
Phenol.....	Roth,Karlsruhe
Röntgenfilme Fuji und Kodak.....	Siemens,Freiburg
Röntgenentwickler Kodak.....	Siemens Freiburg
Röntgenfixierer Agfa.....	Agfa-Gevaert,Belgien
N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin (TEMED).....	Serva,Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Tris).....	Roth,Karlsruhe
Tween20.....	Roth,Karlsruhe
Whatman-3MM.....	Whatman,Maudstone,England

Weitere im Text erwähnte Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Sigma, Fluka oder Merck in der Qualitätsstufe p.a. bezogen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Infektionen von *Plasmopara viticola* an *Vitis vinifera* und *Vitis rupestris*

Werden Pflanzen der Art *Vitis vinifera* durch *Plasmopara viticola* infiziert, so treten starke Schädigungen des befallenen Gewebes auf. Das Pathogen dringt über die Spaltöffnungen ein, breitet sich im Interzellularraum aus und führt dadurch zu starken Schädigungen des Blattes (Abb. 5) und letztlich zu dessen Absterben. Infektionen an Gescheinen (Infloreszenzen) oder an jungen Beeren führt zum Absterben der Gescheine bzw. zu den sogenannten Lederbeeren, die einen enormen Ertragsverlust bedeuten. Da offensichtlich keine Abwehrreaktionen der Pflanze zu beobachten sind, deutet dies auf eine kompatible Wirt-Pathogen Interaktion hin.

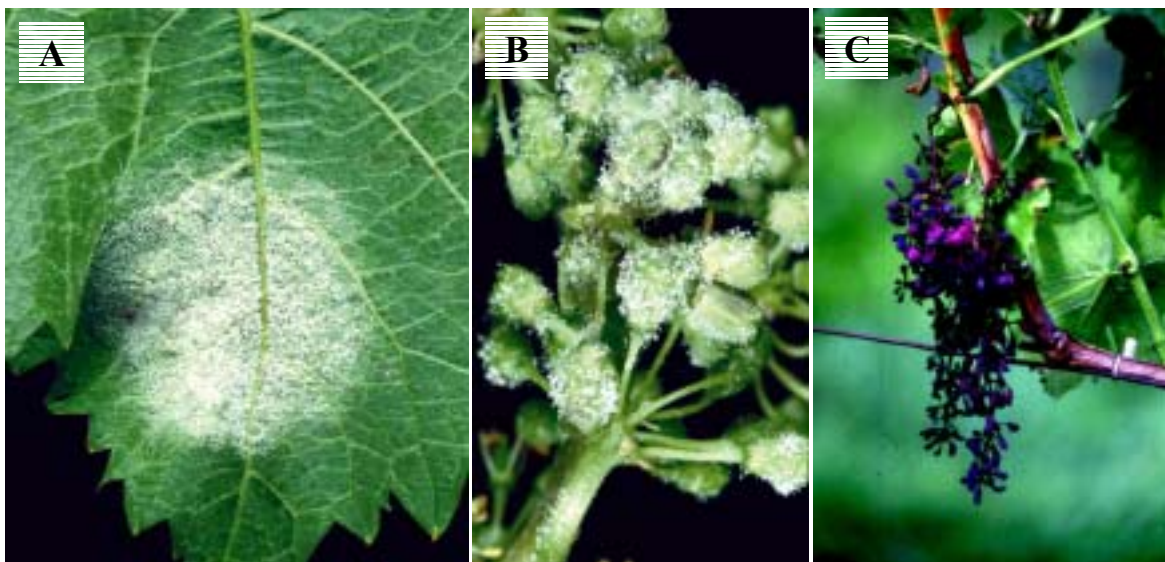


Abb. 5: Infektionen von *Plasmopara viticola* an *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau. Bild A zeigt die Sporangienträger von *P. viticola* an einer Blattunterseite. Bild B zeigt den Befall an Gescheinen, welches in einem späteren Stadium zu den sogenannten Lederbeeren führt (Bild C).

Werden dagegen amerikanische Arten, wie *Vitis rupestris* oder *Vitis riparia* durch *Plasmopara viticola* infiziert, kommt es zur Bildung einer hypersensitiven Reaktion (HR), erkennbar an der Bildung von Nekrosen. Das Pathogen wird an seiner Ausbreitung gehindert und stirbt ab. Man spricht von einer inkompatiblen Interaktion (Abb. 6). Voraussetzung für die Bildung einer HR ist, dass das Pathogen frühzeitig von der Pflanze erkannt wird und dadurch eine Signalkaskade auslöst, welches zum gezielten Absterben der befallenen Zellen führt. Dieser gezielte Tod von Wirtszellen ist dann auf einen engen Bereich um Spaltöffnungen begrenzt, an denen Infektionen stattfanden.

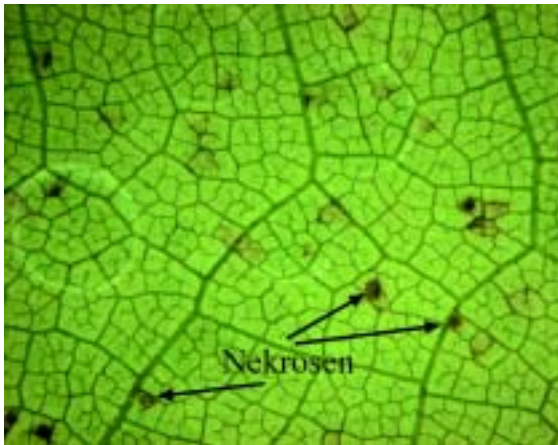


Abb. 6: Infektionen von *Plasmopara viticola* an einem Blatt von *Vitis rupestris*. 5 dpi mit *P. viticola* ist die Bildung von Lokalnekrosen erkennbar. Die Bildung solcher Nekrosen ist die typische Abwehrreaktion einer HR und an den bräunlichen Verfärbungen der Zellen um eine Infektionsstelle erkennbar.

Vergleicht man die Reaktionen zwischen den amerikanischen und europäischen *Vitis*-Arten nach Befall durch *Plasmopara viticola*, so kann man leicht den Unterschied zwischen einer inkompatiblen- und kompatiblen Wirt-Pathogen Interaktion erkennen. Um die unterschiedlichen Reaktionen der *Vitis*-Arten biochemisch und molekularbiologisch zu charakterisieren, wurden Kallus- bzw. Zellsuspensionskulturen von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau und *Vitis rupestris* angelegt.

3.2 Zellkulturen von *Vitis spec.*

Auch im Gewächshaus können *Vitis*-Pflanzen ohne die Gefahr eines unkontrollierten Schädlingsbefall nicht angezogen werden. Insbesondere während den Sommermonaten war unter den gegebenen Bedingungen eine Infektion durch pilzliche oder tierische Schaderreger nicht auszuschließen. In Anbetracht dieser Probleme und um weitere Analysen zu erleichtern, war die Etablierung von *Vitis*-Zellkulturen erforderlich. Zellkulturen lassen sich jahreszeitlich unabhängig kultivieren und stellen eine geeignete Quelle für homogenes Zellmaterial dar. Zellen in Kultur sind in der Regel für die Gabe exogener Substanzen (z. B. Elicitoren) gut geeignet (NÜRNBERGER *et al.*, 1994). Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Zellkulturen ist, dass nahezu jede Zelle gleichzeitig in Kontakt mit den Substanzen kommt und dadurch eine mögliche Reaktionsantwort der Zellen besser nachzuweisen ist. Mit wenigen Ausnahmen sind die Reaktionen der Zellen auf Pflanzen übertragbar, da die gleichen Abwehrreaktionen in Zellen nach Elicitorbehandlung induziert werden wie in Pflanzen nach Pathogenbefall (HAHLBROCK *et al.*, 1995). In dieser Arbeit werden Untersuchungen von Resistenzinduktoren gegen *Plasmopara viticola* an einer anfälligen Rebart (*Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau) und einer resistenten Art (*Vitis rupestris*) vorgestellt. Aus beiden Arten wurden sowohl *in vitro*- Kalluskulturen, als auch Zellsuspensionskulturen angelegt.

3.2.1 Kallus-Kulturen

Hierfür wurden Stengelgewebe und Nodien verschiedener Rebarten wie *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau und *Vitis rupestris* als Ausgangsmaterial zur Anlage von Kalluskulturen benutzt. Das Gewebe wurde mittels 3,5 %iger Natriumhypochloridlösung (NaOCl) oberflächensterilisiert und auf 2,4 D-haltiges Kulturmedium übertragen.

Kallusgewebe bildete sich nach ca. 10 Tagen an den Schnittstellen aus meristematischen Gewebe. Die Kulturen wurden bei 23°C und in einem Licht/Dunkelwechsel (16h/8h) gehalten. Die mehrfache Subkultivierung der Kalli auf jeweils frische Medien in Abständen von ca. 1-2 Monaten lieferte ausreichende Mengen an Kallusgewebe.

3.2.2 Zellsuspensionskulturen

Zur Anlage von Zellsuspensionskulturen wurden die Kalluskulturen beider *Vitis*-Arten mehrfach in flüssiges Medium überimpft, wodurch nach ca. 6 Wochen eine rasch wachsende und stabile Suspensionskultur erhalten wurde. Die Zellen aller zwei Arten bildeten kleine Zellaggregate, wuchsen homogen und waren weißlich gefärbt. Die Zellen der Art *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau waren im Gegensatz zu den Zellen der *Vitis rupestris* Zellsuspensionskultur kleiner und stärker pigmentiert (Abb. 7).

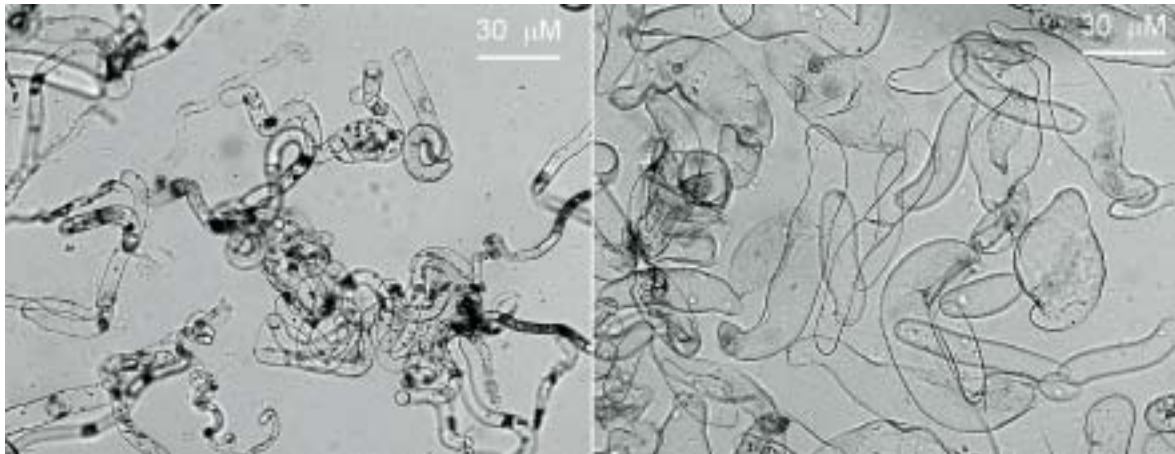


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahme von Zellsuspensionskulturen. Das linke Bild zeigt Zellen der Zellsuspensionskultur von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau, das rechte Bild von *Vitis rupestris*.

Um eine Zellkultur mit hoher Wachstumsrate zu erhalten, erwies es sich als günstig ca. 5 - 10 ml Zellkultur im zweiwöchigen Rhythmus zu überimpfen. Hierdurch erreichten die Zellkulturen nach etwa 18 d ihr maximales Zellfrischgewicht (Abb. 8). In diesem Rhythmus wurden die Zellen weiterkultiviert und lieferten in Bezug auf Wachstum und Induzierbarkeit gut reproduzierbare Werte.

3.2.3 Wachstum

In der Literatur sind bisher nur wenige *Vitis*-Zellkulturen beschrieben worden, darunter keine von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau (DO *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 1995; HOOS und BLAICH, 1998). Um den Wachstumsverlauf der Zellkultur zu ermitteln, wurde die Frischgewichtszunahme über 3 Wochen hinweg verfolgt.

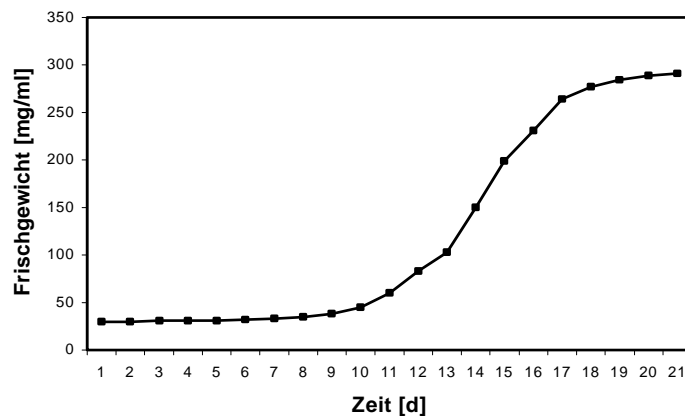


Abb. 8: Wachstum der verwendeten *Vitis rupestris* Zellsuspensionskultur. 10 ml einer zwei Wochen alte *Vitis rupestris* Zellkultur wurden in 40 ml frisches MS-Medium steril überimpft und zu den angegebenen Zeitpunkten das Frischgewicht bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Parallelen.

Dazu wurden 10 ml einer zwei Wochen alten Zellkultur steril in 40 ml frisches Medium überimpft und das Frischgewicht täglich bestimmt. Zwischen dem 9. und 17. Tag zeigten die Zellen ein exponentielles Wachstum, das nach 17 Tagen eine stationäre Phase erreichte. In Abhängigkeit der durchzuführenden Versuche wurde der Zeitraum zwischen dem 13.- und 17. Tag gewählt. Für die Luziferaseexpressionsstudien zeigte es sich vermutlich aufgrund der niedrigeren Dichte (ca. 100mg/ml) als günstiger, Zellen vom 13. Tag zu verwenden. Bei Versuchen zum Protoneninflux erwies es sich als günstiger Zellen vom 17. Tag (ca. 280 mg/ml) zu verwenden, da diese mit einer stärkeren pH-Differenz reagierten (Abb. 52).

3.3 Charakterisierung einer Glukanase (VGL) aus *Vitis vinifera*

3.3.1 Isolierung einer extrazellulären Glukanase (VGL)

Um Analysen einer potentiellen Pathogeninduktion von *PR*-Genen durchzuführen, wurde durch PCR mit genspezifischen Primern die cDNA einer Glukanase kloniert (Abb. 9). Das 3'-Fragment einer putativen extrazellulären *Vitis*-Glukanase (AF053750), welches in der Datenbank vorlag, wurde benutzt, um mittels genspezifischen Primern dieses Gen in voller Länge zu erhalten. Die Sequenz wurde in die Datenbank unter der Accessionnummer AJ277900 eingegeben.

VGL kodiert für ein Protein mit 345 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 37,5 kDa. Datenbankanalysen ergaben, dass diese Glukanase das für Glykosyl-Hydroxylasen

typische Sequenzmotiv aufweist (JUNCOSA *et al.*, 1994). Sequenzvergleiche wiesen zudem hohe Homologien zu Glukanasen aus anderen Pflanzen, (höchste Homologie: 77%ige Identität auf Nukleinsäureebene zu einer extrazellulären β -1,3 Glukanase aus *Prunus persica*).

1	atggctatg tttgattccactgttataaagttcttcaagaatggccatactgctgcttggt	
	M A M F D S T V K S S S R M A I L L L V	20
61	tttgggctgctaatggctagcctacacttaacagttgcccaaacgggagtggttatgga	
	F G L L M A S L H L T V A Q T G V C Y G	40
121	atggagggtgacaacttgccaccgccagggcaagttgtaggtctctataaccagtacagc	
	M E G D N L P P P G Q V V G L Y N Q Y S	60
181	atccgaagaatgagactctacgaccctaaccaagctgctctccaagcccttagaggctcc	
	I R R M R L Y D P N Q A A L Q A L R G S	80
241	aacattgagctcatgataggtgtcccaaatgatgctcttcaaaacattgcttccatccaa	
	N I E L M I G V P N D A L Q N I A S I Q	100
301	ggcaatgccaattcatgggttcaaaacaatattaaaaactacggtaatgtcagattccga	
	G N A N S W V Q N N I K N Y G N V R F R	120
361	tacgttgcggttggaatgaagtaagccctacgggccccactgccaatttggttctcct	
	Y V A V G N E V S P T G P T A Q F V L P	140
421	gccatgagaaacattttcaatgcaatttccgcagctggcctggggaaccaaattaaagtt	
	A M R N I F N A I S A A G L G N Q I K V	160
481	tccactgccattgacactggggttctgggaacatcctaccctccatcaaaaggcgccttc	
	S T A I D T G V L G T S Y P P S K G A F	180
541	aagcctgaagtcacgtcctttctcaaccccatcatcagcttctgggtcaaaaaccgtgcc	
	K P E V T S F L N P I I S F L V K N R A	200
601	ccactgcttgtaacctgtacccttacttcagttacattggtaacacccgggacattcgc	
	P L L V N L Y P Y F S Y I G N T R D I R	220
661	ctagattatgctcttttcaaggctcctggagttgtgggtgcaagatggacagcttgggttac	
	L D Y A L F K A P G V V V Q D G Q L G Y	240
721	aagaatctttttgatgccatattggatgctgtttactcggcacttgagaggggttgggtggc	
	K N L F D A I L D A V Y S A L E R V G G	260
781	ggttcttgcaggttgttatctcagagagtggtggccatcagccgggtgggacggcaacc	
	G S L Q V V I S E S G W P S A G G T A T	280
841	acagttggtaatgcaaagacttacaactccaatttgattcagcatgtcaaggggtgggact	
	T V G N A K T Y N S N L I Q H V K G G T	300
901	ccaaagaagcctggagggcctatcgagacttacgtgttgccatgtttaatgagaacagg	
	P K K P G G P I E T Y V F A M F N E N R	320
961	aaatcccagaatatgagaaacactgggggctctttttaccaacaacaggctaaatac	
	K S P E Y E K H W G L F L P N K Q A K Y	340
1021	ccaatcaatttcaact taa	
	P I N F N -	345

Abb. 9: Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenz der Glukanase-cDNA (VGL-AJ277900). Startcodon, Stopcodon und Signalpeptid sind durch Fettdruck hervorgehoben. Das für Glykosylhydroxylasen typische Sequenzmotiv ist fettgedruckt und unterstrichen dargestellt.

Ein Signalpeptid von 36 Aminosäuren, welches für einen Transport in den Apoplasten verantwortlich ist, konnte in der VGL Sequenz nachgewiesen werden. Die Analyse erfolgte mit dem Programm SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*, LETUNIC *et al.*, 2002).

3.3.2 Subzelluläre Lokalisation der VGL

β -1,3 Glukanasen, denen eine mögliche Rolle in der Pathogenabwehr zukommt, kommen in zwei Klassen vor. Eine Form, die in die Vakuole eingelagert wird und eine extrazelluläre Form, die in den Apoplasten sezerniert wird (NEUHAUS *et al.*, 1992). *Plasmopara viticola* wächst interzellulär und besitzt Polyglucane als Zellwandhauptbestandteil, welches als Substrat der Glukanasen dienen kann. Um die Lokalisation des Enzyms in der Zelle zu untersuchen, wurde diese Glukanase mit einem GFP (*green fluorescent protein*) fusioniert. Die Expression erfolgte konstitutiv unter Kontrolle des 35S-*CaMV* Promotors als 5'VGL-GFP 3' Fusionsprotein in Protoplasten, die mittels Elektroporation transformiert wurden. Dem Transformationsansatz entnommene Protoplasten wurden anschließend unter dem Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskop analysiert.

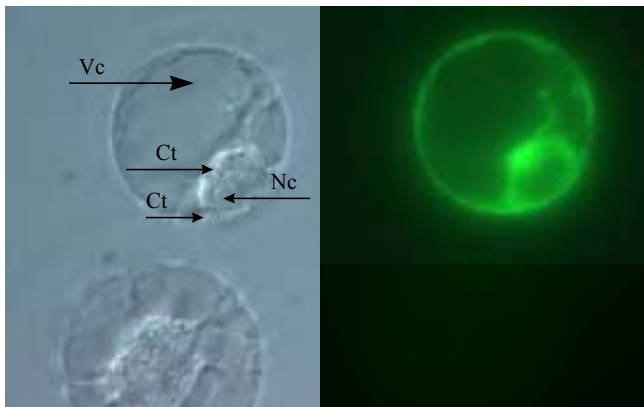


Abb. 10: *In vivo* Lokalisation des Glukanase-GFP Fusionsproteins in Petersilie Protoplasten. Die im Durchlicht (links) und unter UV-Anregung (rechts) im Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder repräsentieren einen identischen Bildausschnitt. Die untere Zelle ist nicht transformiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Zellkern und die Vakuole nicht leuchten, während das Cytoplasma eine starke Fluoreszenz aufweist. Vc Vakuole, Ct Cytoplasma, Nc Nucleolus

Eine fehlende vakuoläre Lokalisation und eine starke Expression im Cytoplasma deutet auf einen extrazellulären Transport hin. Wird die Glukanase aus der Zelle transportiert, wird das Fusionsprotein stark verdünnt, was die fehlende Fluoreszenz um die Zelle erklärt. Zusätzlich ergaben Datenbankrecherchen, dass am N-Terminus ein Signalpeptid, welches für einen Transport in den Apoplasten verantwortlich ist, vorliegt (Abb. 9).

3.3.3 Regulation der VGL-mRNA Akkumulation nach Infektionen durch *Plasmopara viticola*

Die Regulation der VGL wurde in *Northern blot* Analysen untersucht. Topfpflanzen von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau (suszeptibel) und *Vitis rupestris* (resistent) wurden an einem Blatt mit *Plasmopara viticola* infiziert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus dem infizierten- und dem direkt darüberliegenden Blatt zu verschiedenen Zeitpunkten extrahiert (Abb. 11). Für die Versuche wurde darauf geachtet, jeweils Blätter in gleicher

Insertionshöhe und vergleichbarer Größe zu verwenden. Die isolierte Gesamt-RNA repräsentiert somit die durchschnittliche Expression der spezifischen Transkripte im Blatt.



Abb. 11: Infektion eines Blattes der Pflanze *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Infektion mit *Plasmopara viticola* 9 dpi. Eine ca. 8 Wochen alte Pflanze wurde an einem Blatt mit einer Sporensuspension ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) von *P. viticola* infiziert (lokal). 9 dpi sind deutlich die Schädigungen des Blattgewebes zu erkennen. Das direkt darüber liegende (systemische) Blatt wurde nicht infiziert und zeigt keine Schädigungen. Die RNA beider Blätter wurden für Northern blot Analysen herangezogen.

Blätter von anfälligen- (*Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau) und resistenten (*Vitis rupestris*) Arten wurden in die Untersuchungen einbezogen. Die Infektion der *Vitis*-Arten mit *Plasmopara viticola* ergibt ein Schadbild charakteristisch für den Resistenzgrad der befallenen Art. So äußert sich das Schadbild bei anfälligen *Vitis vinifera*-Sorten zunächst mit einer Gelbfärbung (Ölflecken) der befallenen Blattbereiche. Im Gegensatz hierzu bilden Blätter von resistenten Arten wie *Vitis rupestris* schon nach 4-6 Tagen sichtbare Lokalnekrosen aus (Abb. 6). Die weitere Ausbreitung von *Plasmopara viticola* wird stark gehemmt oder findet nicht mehr statt. Dies deutet in diesem Fall auf eine inkompatible Interaktion von Wirt und Pathogen hin (s. Kap. 1.1), während der Infektionsverlauf zwischen *Vitis vinifera* und *Plasmopara viticola* auf eine kompatible Interaktion hindeutet.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Reaktionen der Arten auf die Infektion, wurde untersucht, ob sich dies auch in einer unterschiedlichen Regulation des Glukanasegens auf Transkriptebene manifestiert.

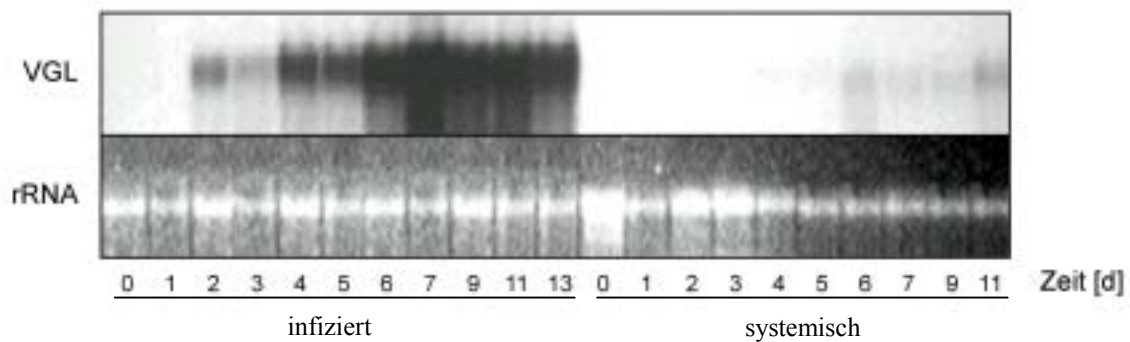


Abb. 12: Northern blot Analyse der VGL Expression in Blättern von *Vitis vinifera* nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Je ein Blatt einer gesunden *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau Pflanze wurde mit *Plasmopara viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils lokal infizierte Blatt und das erste darüberliegende Blatt (systemisch) wurde in den angegebenen Zeitintervallen nach der Infektion geerntet. Pro Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der VGL-Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA-Etbr gefärbt) abgebildet.

Die Northern blot Analyse mit VGL-cDNA als Sonde zeigt in der kompatiblen Interaktion im lokal infizierten Blatt bereits 2 Tage nach Infektion den Beginn einer erhöhten VGL-mRNA Akkumulation (Abb. 12). Nach 4 Tagen kommt es zu einer weiteren Erhöhung der Transkriptmenge, die ein Maximum zwischen dem 6.- und 9. Tag erreicht. Der Transkriptlevel war bis zum 13. Tag deutlich erhöht. Zu späteren Zeitpunkten war jedoch aufgrund starker Schädigungen des Blattgewebes keine RNA-Isolation mehr möglich. In den nicht infizierten systemischen Blättern kommt es nach 5 Tagen zu einer leichten Erhöhung des VGL-mRNA Transkriptlevels, welches im Vergleich mit den infizierten Blättern auf einem deutlich geringem Niveau stattfindet.

Um den zeitlichen Verlauf der VGL-Transkriptakkumulation in einer resistenten Art, zu analysieren, wurde zum Vergleich der entsprechende Ansatz mit Topfpflanzen von *Vitis rupestris* durchgeführt.

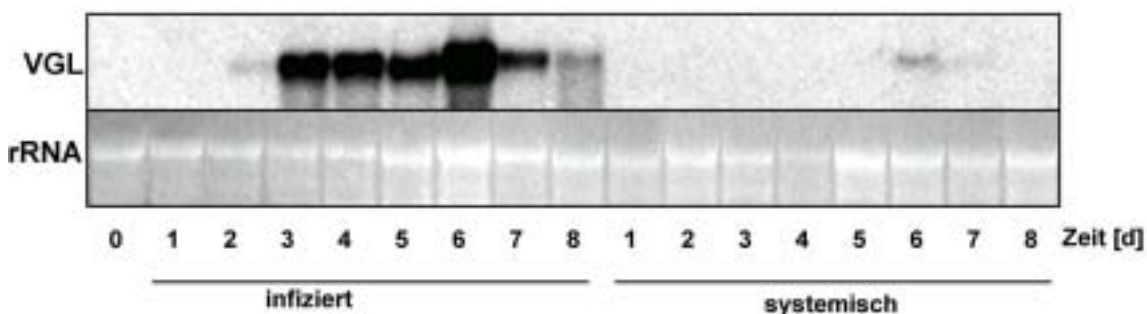


Abb. 13: Northern blot Analyse der VGL Expression in Blättern von *Vitis rupestris* nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Je ein Blatt einer gesunden *Vitis rupestris* Pflanze wurde mit *Plasmopara viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils lokal infizierte Blatt und das erste darüberliegende Blatt (systemisch) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion geerntet. Je Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der VGL-Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA-Etbr gefärbt) abgebildet.

Die *Northern blot* Analyse mit *VGL* zeigte in der inkompatiblen Wirt-Pathogen Interaktion im lokal infizierten Blatt bereits am 2. Tag nach Infektion den Beginn einer erhöhten *VGL*-mRNA Akkumulation (Abb. 13). Bereits am 3. Tag kommt es zu einer weiteren Erhöhung der Transkripte und erreicht ein transientes Maximum nach 6 Tagen. Danach fällt der *VGL*-mRNA Pegel wieder ab. Eine sehr schwache Erhöhung des *VGL* Transkriptlevels in den nicht infizierten systemischen Blättern ist am 6. Tag zu sehen. Dies ist bemerkenswert, da Pflanzen, die eine inkompatible Interaktion mit einem Pathogen zeigen, eine systemische Akkumulation von *PR*-Genen (*SAR*, *systemic acquired resistance*) aktivieren könnten. Dieses Phänomen wurde jedoch bisher nur in krautigen Pflanzen, wie *Arabidopsis*, Tabak oder Gurke gezeigt (STICHER *et al.*, 1997). Um eine *SAR* auszulösen ist es unumgänglich, dass das entsprechende Pathogen eine HR als Abwehrantwort auslöst (WARD, 1991; CONRATH *et al.*, 2002; JOE KUC', persönliche Mitteilung).

Wie in Abb. 12 und Abb. 13 zu sehen, scheint die Regulation von *PR*-Genen in resistenten und anfälligen *Vitis* Arten zu Beginn der mRNA-Induktion ähnlich zu sein. Um einen genaueren Verlauf der *VGL*-mRNA Akkumulationskinetik zu erhalten wurden Pflanzen mit *Plasmopara viticola* infiziert und aus den infizierten Blättern wurde jeweils nach 12 Stunden RNA extrahiert. Diese Analysen sollten insbesondere darüber Aufschluss geben, zu welchem Zeitpunkt resistente- bzw. anfällige *Vitis*-Arten mit einer Erhöhung der *PR*-Gen Expression reagieren. Zudem wurde zu diesem Versuch noch die hoch resistente Art, *Vitis riparia*, hinzugezogen.

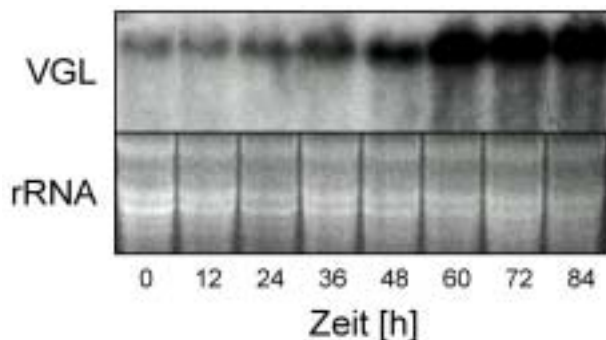


Abb. 14: *Northern blot* Analyse der *VGL* Expression in Blättern von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Je ein Blatt einer *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau Pflanze wurde mit *Plasmopara viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils infizierte Blatt wurde in Zeitintervallen von 12 Stunden nach Infektion geerntet. Pro Spur wurden $20 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit *VGL* hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.

Die *Northern blot* Analyse in Abb. 14 zeigte eine geringe Grundexpression des *VGL* Transkriptes, welches zum Zeitpunkt 36 hpi leicht erhöht wird. Das Maximum der Transkriptakkumulation wird nach 60 Stunden erreicht und bleibt auf gleichem Niveau.

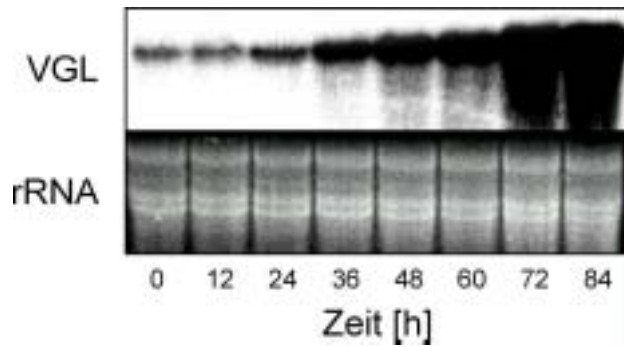


Abb. 15: Northern blot Analyse der VGL Expression in Blättern von *Vitis rupestris* nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Je ein Blatt einer *Vitis rupestris* Pflanze wurde mit *Plasmopara viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils infizierte Blatt wurde in Zeitintervallen von 12 Stunden nach Infektion geerntet. Pro Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit VGL hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.

Wie in Abb. 15 zu sehen ist die Expression des VGL-Transkriptes in *Vitis rupestris* Pflanzen gegenüber den Zeitpunkten 0- und 12 hpi nach 24 Stunden bereits erhöht und akkumuliert bis zu dem Zeitpunkt 84 hpi stetig. Nach 84 hpi ist die maximale Expression der VGL-mRNA erreicht.

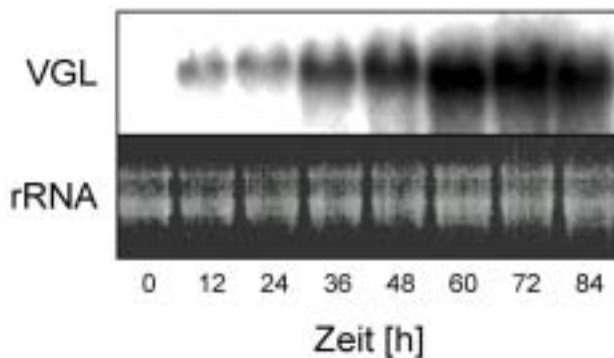


Abb. 16: Northern blot Analyse der VGL Expression in Blättern von *Vitis riparia* nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Je ein Blatt einer *Vitis riparia* Pflanze wurde mit *Plasmopara viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils infizierte Blatt wurde in Zeitintervallen von 12 Stunden nach Infektion geerntet. Pro Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit VGL hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.

Abb. 16 zeigt die VGL-mRNA Expression in hoch resistenten *Vitis riparia* Pflanzen nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Die Kinetik der Transkriptakkumulation unterscheidet sich deutlich von den oben gezeigten Northern blot Analysen der anfälligen Art (*V. vinifera*) und resistenten Art (*V. rupestris*). Bereits 12 hpi ist eine Erhöhung der VGL Transkriptmenge zu beobachten. Es kommt zu einer stetigen Erhöhung der VGL Expression und führt zu einem Maximum der mRNA zum Zeitpunkt 72 hpi. Nach 84 hpi fällt der VGL-mRNA leicht ab.

Die oben dargestellten Northern blot Analysen zeigen, dass der Grad der Resistenzausprägung in Zusammenhang mit dem zeitlichen Muster der VGL-mRNA Akkumulation steht. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Autoren, die zeigten, dass die schnelle und rechtzeitige Induktion von PR-Genen mit einer erfolgreichen Abwehr korrelieren (STICHER *et al.*, 1997; DONG, 1998).

3.3.3.1 Bestimmung des freien Salicylsäuregehaltes in Blättern von *Vitis vinifera* nach lokalen Infektionen durch *Plasmopara viticola*

Salicylsäure (SA) ist nach aktuellem Wissensstand ein zentrales Molekül in der pflanzlichen Pathogenabwehr (VERNOOIJ *et al.*, 1994; DELANEY *et al.*, 1994; CAMERON *et al.*, 1999, 2000). Eine Erhöhung des freien Salicylsäuregehaltes, also der nicht glykosylierten Form, im Cytoplasma ist bei einer Vielzahl von Pflanzen an der Aktivierung von *PR*-Genen beteiligt (s. 1.4.1). Dies wurde durch Versuche gezeigt, in denen SA oder deren Strukturanaloga wie BTH bei Pflanzen appliziert wurde und dies zu einer Induktion der Abwehrgene führte. *Arabidopsis*-Pflanzen, die durch Überexpression einer bakteriellen Salicylsäurehydroxylase eine erniedrigte intrazelluläre SA-Konzentration aufweisen (*NahG*), waren nicht mehr in der Lage, nach einer Infektion *PR*-Gene zu aktivieren und damit eine *SAR* auszulösen (SILVERMAN *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1997). Wie in Abb. 12 und Abb. 13 schon gezeigt wurde, sind *Vitis*-Arten nicht in der Lage eine systemische Aktivierung ihrer *PR*-Gene, zu aktivieren. Untersuchungen zum freien SA-Gehalt der Weinrebe nach Infektion von Pathogenen wurden bisher keine durchgeführt.

Zunächst wurden Untersuchungen zum Gehalt an freier SA an Pflanzen von *Vitis vinifera* nach Pathogenbefall mit *Plasmopara viticola* durchgeführt. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob zumindest die Aktivierung von *PR*-Genen nach Pathogenbefall mit einer Erhöhung des freien SA-Gehaltes einhergeht. Im folgenden wurde der kinetische Verlauf des Gehalts an freier SA im Blatt von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Infektion mit *Plasmopara viticola* bestimmt.

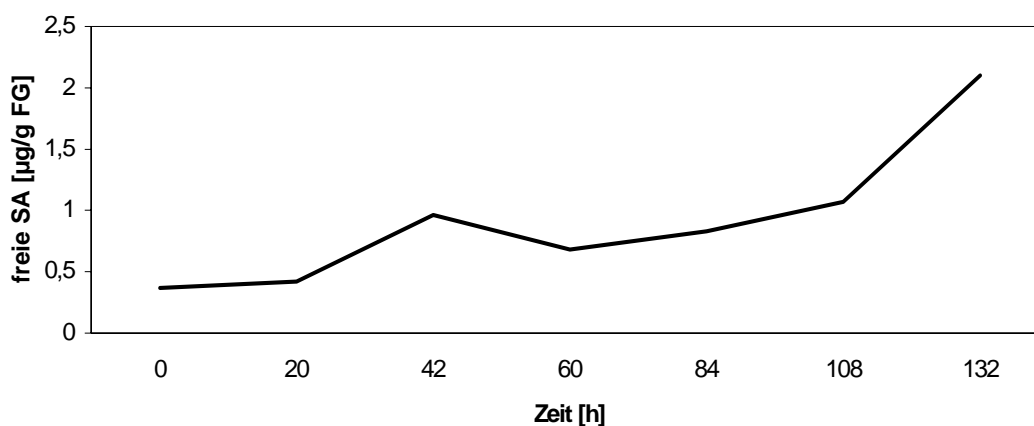


Abb. 17: Gehalt an freier Salicylsäure (SA) in Blättern von *Vitis vinifera* nach Infektion durch *P. viticola*. 7 Pflanzen wurden mit einer Sporangienlösung von *P. viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine SA Extraktion durchgeführt. Der Gehalt an freier SA wurde in Bezug zum Frischgewicht (FG) der Blätter gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.

Wie in Abb. 17 zu sehen ist, kommt es bereits nach ca. 42 hpi zu einer Verdoppelung des freien SA-Gehaltes in den Blättern. Anschließend fällt der SA-Pegel leicht ab und erreicht

ein Maximum nach 132 hpi. Zu diesem Zeitpunkt beträgt der Gehalt an freier SA mehr als das vierfache im Vergleich zum Zeitpunkt 0 hpi.

3.3.4 Regulation der *VGL*-mRNA Akkumulation nach Infektionen durch *Uncinula necator*

Nachfolgend wurde die mögliche Akkumulation der *VGL*-mRNA nach Infektion durch ein weiteres Pathogen, den Ascomyceten *Uncinula necator*, untersucht. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob eine Induktion der *VGL* Transkription auch gegenüber anderen Pathogenen stattfinden kann, oder spezifisch durch *Plasmopara viticola* aktiviert wird. Neben dem Hauptschädling der Weinrebe, *Plasmopara viticola*, ist der Erreger des Echten Mehltaus *Uncinula necator* ein weiteres bedeutendes Pathogen. *Uncinula necator* gehört zu den Ascomyceten und dringt in die Weinrebe durch eine Appressorienbildung in die Epidermiszellen der Blätter ein. Anhand der *Northern blot* Analysen aus Abb. 12 wurden die Zeitpunkte für eine mögliche Induktion der *VGL*-Transkripte 5- bzw. 8 Tage nach Infektion mit *Uncinula necator* gewählt.

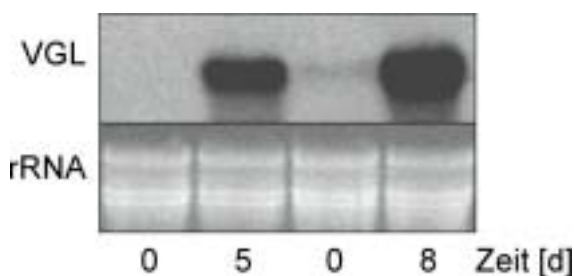


Abb. 18: *Northern blot* Analyse der *VGL* Expression in Blättern von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Infektion mit *Uncinula necator*. Je ein Blatt einer gesunden *Vitis vinifera* Pflanze wurde mit *Uncinula necator* infiziert. Das jeweils infizierte Blatt wurde 5 d bzw. 8 d nach Infektion geerntet. Pro Spur wurden 20 µg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit *VGL* hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.

Die Induktion der *VGL*-Transkription nach Infektion durch *Uncinula necator* ist in Abb. 18 deutlich zu erkennen. Während in den nicht infizierten Blättern keine Erhöhung der *VGL*-mRNA zu sehen ist, kommt es in den infizierten Blättern zu einer deutlichen Akkumulation der *VGL*-Transkripte. 5 Tage nach Infektion ist bereits eine signifikante Erhöhung der *VGL* Expression zu beobachten, welche 8 Tage nach Infektion weiter zunimmt. Dieses Experiment zeigt, dass die *VGL*-Genaktivität nicht nur durch den Oomycet *Plasmopara viticola*, sondern auch durch den Ascomycet *Uncinula necator* induziert wird und damit die Eigenschaften eines typischen *PR*-Gens zeigt.

3.3.5 Isolierung genomischer Sequenzen

Zusätzlich zu den vollständigen cDNA-Sequenzen wurde auch die genomische Sequenz mit den Promotorbereichen des *VGL*-Gens aus *Vitis vinifera* und *Vitis rupestris* durch

genome walking isoliert. Die Promotorsequenzen wurden mit den Programmen MatInspector (QUANDT *et al.*, 1995) und PlantCARE (LESCOT *et al.*, 2002) analysiert.

3.3.5.1 Vergleich der Sequenzen des VGL-Promotors aus *Vitis vinifera* (VvGL) und *Vitis rupestris* (VrGL)

Abb. 19 zeigt die Sequenzen der VGL-Promotoren aus *Vitis vinifera* und *Vitis rupestris*. Der besseren Übersicht wegen, sind nur *cis*-regulatorische Elemente, denen eine Rolle in der Pathogenabwehr zugeschrieben werden, hervorgehoben. Es sind nur solche pflanzlichen *cis*-regulatorische Elemente dargestellt, die im Kernbereich (*core*) eine Übereinstimmung von 100 % und in den flankierenden Sequenzen der Matrix eine Überstimmung ≥ 85 % zeigten. Unter diesen Bedingungen können putative Bindungsstellen für die entsprechenden Transkriptionsfaktorklassen aufgezeigt werden. Die Analyse des Promotors sollte insbesondere Aufschluss über das Vorkommen von *cis*-regulatorischen Elementen, für die bereits eine Beteiligung an der Pathogenantwort von Promotoren nachgewiesen wurde, geben. Beide Promotoren wurden in die Datenbank mit der Accessionnummer AJ430781 (VvGL-*Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau) und AJ430784 (VrGL-*Vitis rupestris*) eingegeben.

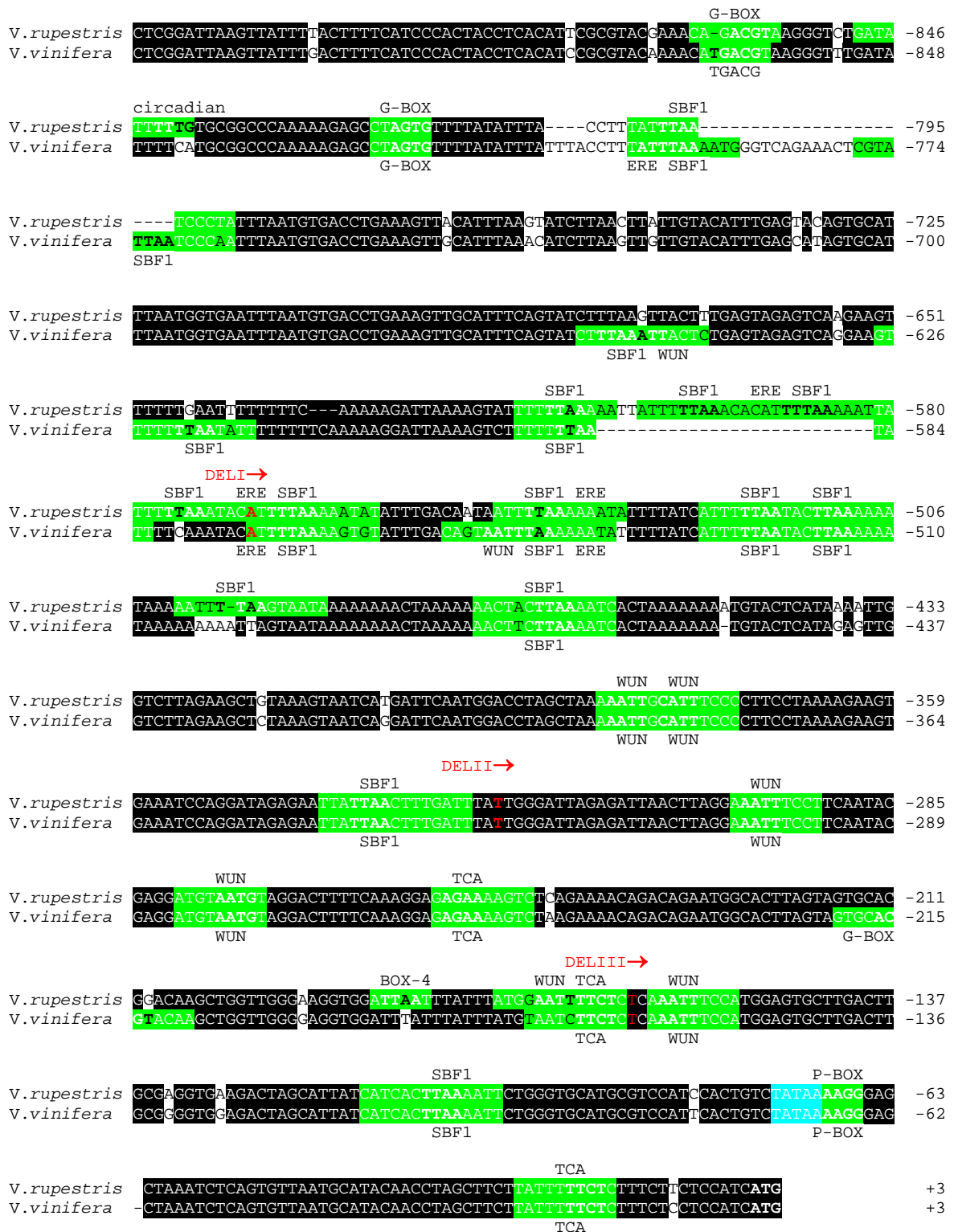


Abb. 19: Sequenzvergleich der Glukanase Promotoren aus *Vitis rupestris* (*VrGL*) und *Vitis vinifera* (*VvGL*). Cis-regulatorische Elemente, die in der Literatur durch die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren charakterisiert sind oder denen eine regulatorische Funktion nachgewiesen wurde, sind grün hervorgehoben. Die core-Sequenz der Matrix ist jeweils durch Fettdruck, der mögliche Transkriptionsstart blau hervorgehoben. Die roten Pfeile bzw. Buchstaben zeigen das 5' Ende der Deletionskonstrukte (DEL-I,II,III) an.

Der Vergleich beider Promotoren zwischen der aus Amerika stammenden und resistenten *Vitis rupestris* und der anfälligen europäischen Art *Vitis vinifera* zeigt eine sehr hohe Homologie bezüglich ihrer DNA-Sequenz. Sowohl in *VvGL* als auch in *VrGL* tritt je ein kurzer Bereich auf der keine Homologien aufweist. Lässt man die 2 „Deletionsbereiche“ von 30 bp bei -610 und 23 bp bei -818 außer Acht, so ergibt sich eine Homologie von 95%. Unter Berücksichtigung dieser Bereiche ergibt sich eine Homologie von 89%. Abb. 19 zeigt, dass die Glukanase Promotoren eine Vielzahl von konservierten Erkennungssequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktorklassen besitzt.

Über den gesamten Promotorbereich treten eine Vielzahl putativer Bindestellen für Dof 1-3 bzw. PBF1 (Prolamin Box *binding factor*) homologe Transkriptionsfaktoren auf. Diese Proteine spielen eine Rolle bei der kooperativen Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren, die an räumlich benachbarte Sequenzabschnitte innerhalb des Initiationskomplexes binden (ZHANG *et al.*, 1995). Der besseren Übersicht wegen wurden diese ebenso wie zahlreiche durch Licht induzierbare Bindungsstellen in Abb. 19 nicht dargestellt.

Im Promotorbereich von -20 bis -260 fanden sich drei Konsensussequenzen (TCA-BOX), die für die Aktivierung einer Glukanase in Hafer und Tabak durch Salicylsäure verantwortlich sind (GOLDSBOROUGH *et al.*, 1993). Die Aktivierung dieses Glukanasepromotors durch Salicylsäure oder deren Strukturhomologe wurde in Experimenten in Tabak gezeigt (GOLDSBOROUGH *et al.*, 1993).

P-BOXEN kommen bei einer Vielzahl von Pathogen induzierten Genen vor (DA COSTA *et al.*, 1993) und wurden zuerst an dem Promotor der Phenylalaninammoniumlyase (PAL) charakterisiert. Eine solche P-BOX ist bei -75 lokalisiert. In Petersilie wird die P-BOX von BPF-1 gebunden, welches nach Elicitorbehandlung oder Pathogenbefall stark akkumuliert. Dies bekräftigt die Annahme, dass P-BOXEN putative *cis*-regulatorische Elemente darstellen, denen eine Rolle in der *PR*-Gen Expression zukommt.

G-BOXEN spielen eine Rolle bei einer Vielzahl von Genen, die durch Umwelteinflüsse reguliert werden, wie z.B. ABA, Licht, UV-Bestrahlung, Verwundung sowie nach Pathogenbefall (MENKENS *et al.*, 1995). An sie binden bZIP-Proteine, denen man eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Genen bei der pflanzlichen Pathogenabwehr zuspricht (DRÖGE-LASER *et al.*, 1997). G-Boxen sind Mitglieder der Familie von *cis-acting* Elementen mit ACGT-Motiv und spielen für die Aktivierung einer Vielzahl von Genen nach Pathogenbefall eine Rolle (GIANCARLO *et al.*, 1999). Dabei funktionieren sie oft in einem Zusammenspiel mit anderen Boxen, wie im Fall des Chalkonsynthasepromotors der Ackerbohne, wo G-Box bindende Proteine mit H-Box bindenden Proteinen interagieren (LOAKE *et al.*, 1992; FAKTOR *et al.*, 1996).

Bei -862 des *Vitis vinifera* Glukanasepromotors ist eine TGACG-Box lokalisiert. Dieses Sequenzmotiv ist für eine Induktion durch Methyljasmonat verantwortlich, welches nach

Verwundung oder Insektenfraß gebildet wird (ROUSTER *et al.*, 1997). Diese Box wird von Transkriptionsfaktoren des bZIP + bHLH Typs gebunden.

Bei -182 ist eine BOX-4 lokalisiert. Dieses *cis-acting* Element wurde zunächst aus dem PAL-Promotor der Erbse (*Pisum sativum*) charakterisiert und ist reich an AT Basen (TETSUJI *et al.*, 1994). Dieses Sequenzmotiv ist für eine elicitorvermittelte Aktivierung der PAL bei der Erbse verantwortlich.

Ein Sequenzmotiv, welches der Steuerung einer circadianen Rhythmik dienen könnte ist bei -850 lokalisiert (CIRCADIAN). Dieses *cis*-Element wurde zunächst aus dem Promotor eines Lhc-Komplexes der Tomate charakterisiert (PIECHULLA *et al.*, 1998). Durch Deletionsanalysen konnte in transgenem Tabak gezeigt werden, dass allein dieses Element für die Expression nach einer circadianen Uhr verantwortlich ist. Dieses Motiv ist in zahlreichen Promotoren von Genen, die einen circadianen Rhythmus aufweisen, konserviert.

Ein generelles Motiv, welches bei Pflanzen für Geninduktionen nach Verwundung verantwortlich ist, wird als Wun bezeichnet und findet sich 7 mal zwischen -380 und -125. In *Brassica oleracea* wurde gezeigt, dass Promotoren, die dieses Sequenzmotiv besitzen ihre nachfolgenden Gene sowohl nach Verwundung, als auch nach Infiltration mit Bakterien der Art *Xanthomonas* anschalten (PASTUGLIA *et al.*, 1997).

Die Induktion von Genen durch Ethylen in Pflanzen wird durch sogenannte *ethylene-responsive elements* (ERE) reguliert. Man unterscheidet hierbei jedoch zwei unterschiedliche Sequenzmotive: GCC-Boxen und ATTTCAAA-Boxen (ITZHAKI *et al.*, 1994; RUSHTON *et al.*, 1998). Während GCC-Boxen bei einer Vielzahl von Promotoren Pathogen induzierten Gene vorkommt, findet man EREs vom ATTTCAAA-Typ bei GST-Genen, die während der Seneszenz durch Ethylen reguliert werden. Beide Glukanasepromotoren weisen ausschließlich ATTTCAAA-Sequenzmotive auf. Alle drei *cis*-regulatorischen Elemente sind zwischen -568 und -525 eng hintereinander lokalisiert. Auf dem Promotor von *Vitis vinifera* fehlt das ERE bei -568, hat aber ein drittes ERE bei -794, welches wiederum bei *Vitis rupestris* fehlt.

Zwischen -799 und -105 sind im Glukanasepromotor von *Vitis rupestris* 13 benachbarte Motive für die Bindung eines SBF1-homologen Faktors vorhanden. Dieses Element reguliert im wesentlichen den CHS-Promotor in der Ackerbohne nach Pathogenbefall. Bei der Ackerbohne wird die Chalkonsynthese nach Pathogenbefall induziert und zählt bei dieser Art zu den *PR*-Genen (HARRISON *et al.* 1991)

Zelllinien schnell und effizient generieren zu können, sollten verschiedene Parameter zur stabilen Transformation der *Vitis*-Zellkultur mit Luziferase-Reporterkonstrukten getestet und beurteilt werden.

3.4.1 Transiente Expression eines *VrGL/LUC* Reporterkonstrukts in Petersilie Protoplasten mittels Elektroporation

Um die korrekte Konstruktion des *VrGL/LUC* Plasmids zu testen wurden zunächst Protoplasten aus einer Petersilie Zellsuspensionkultur transient transformiert. Dafür wurde das *VrGL/LUC*-Plasmid, welches den *Vitis rupestris* VGL-Promotor (920 bp) vor dem Luziferase-Gen und dem E9 Terminator des *RBCS* Gens aus Erbse trägt, verwendet. Transiente Transformationen von Petersilie Zellkulturen sind gut etabliert und aufgrund dessen ist es leicht zu überprüfen, ob das *VrGL/LUC* Konstrukt in diesem System funktionell ist.

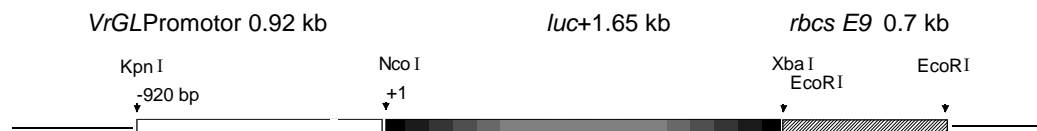


Abb. 21: Ausschnitt einer linearen Vektorkarte des *VrGL/LUC* Plasmids. Als Ausgangsvektor wurde der luc^+ Vektor (Promega) verwendet. Die Größe des vollständigen Plasmids umfasst ca. 5.7 kb.

Zunächst sollte geprüft werden, ob eine durch Natriumsalicylat (NaSA) induzierbare Luziferaseaktivität gemessen werden kann. Die Induktion von *PR*-Genen durch Salicylsäure ist ein zentrales Element von Wirt-Pathogen Interaktionen und konnte bisher bei einer Vielzahl von Pflanzen nachgewiesen werden (DELANEY *et al.*, 1994; CAMERON *et al.*, 1999, 2000).

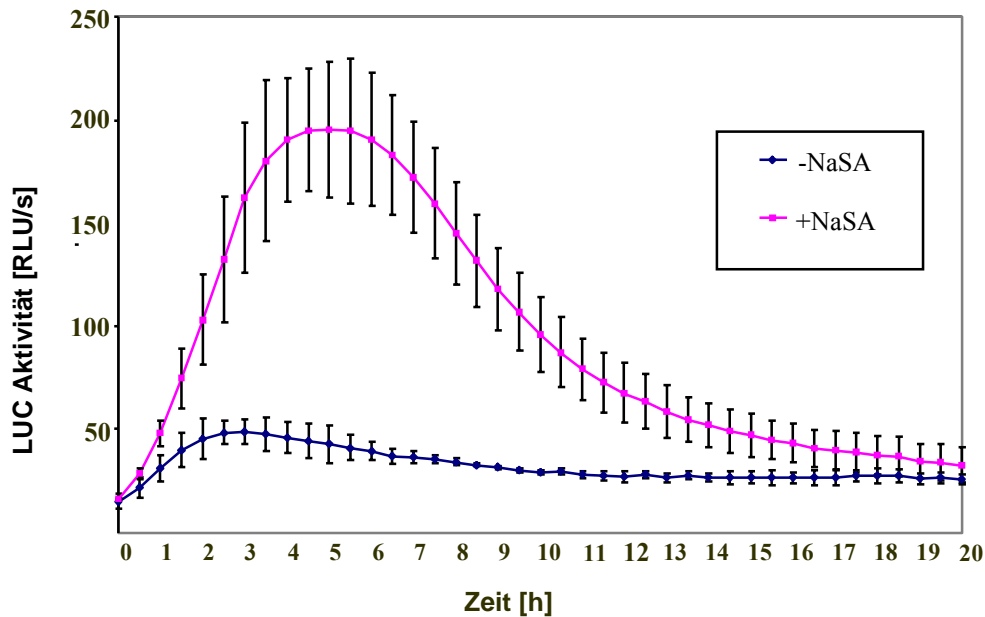


Abb. 22: Luziferaseexpression von Petersilie-Protoplasten nach transients Transformation mit *VrGL/LUC*. Protoplasten wurden mit 75µg DNA des *VrGL/LUC*-Plasmid transformiert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Salicylsäure (NaSA-50µM) oder mit H₂O behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Luziferaseaktivität gegen die Zeit aus drei parallelen Messungen.

Abb. 22 zeigt, dass der Glukanasepromotor der Weinrebe im heterologen System der Petersilie eine NaSA abhängige Expression des *LUC*-Reportergens bewirkt. Das Maximum der Expression ist nach 4-6 Stunden erreicht. Danach kommt es zu einem Abfall des Signals und fällt nach 20 Stunden annähernd auf das Niveau der nicht stimulierten Kontrolle. Die Kontrolle, die mit Wasser behandelt wurde, zeigt einen leichten Anstieg der Luziferaseexpression mit einem transienten Maximum nach 2 - 3 Stunden. Dies könnte auf eine Stressinduktion der Protoplasten, wie sie durch Scherkräfte beim Pipetieren auftreten (*Touch effect*), zurückzuführen sein. Die aus der Luziferaseaktivität bestimmte relative Induktion lag nach Induktion durch NaSA bei 3,6-facher Stimulierung. Dieses Experiment bestätigt die Induzierbarkeit des Promotors in Petersilie-Protoplasten.

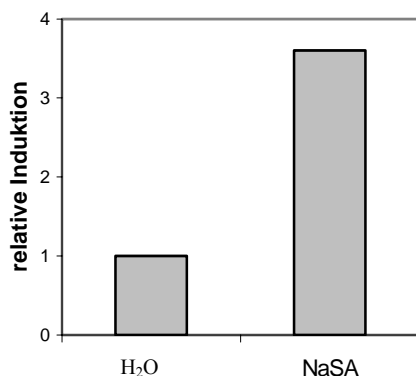


Abb. 23: Luziferase Expression des *VrGL/LUC* Plasmids in Petersilieprotoplasten. Protoplasten wurden mit 75µg DNA des *VrGL/LUC*-Plasmid transformiert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde mit Salicylsäure (NaSA-50µM) oder mit H₂O behandelt. Zur Ermittlung der relativen Induktion wurde das Integral der Kurven aus Abb. 22 gebildet und zur Expression der Kontrolle in Bezug gesetzt.

3.4.2 Transiente Expression eines *VrGL/LUC* Reporterkonstrukts in *Vitis*-Protoplasten

Für die transiente Transformation der *Vitis rupestris* Zellkultur wurde das gleiche Plasmid, wie in Abb. 21 dargestellt, verwendet. Im wesentlichen wurde der gleiche Ansatz wie zur Transformation von Petersilie-Protoplasten gewählt. Zur Protoplastierung von *Vitis*-Zellen wurde nach einigen Vorversuchen eine andere Enzymzusammensetzung zum Zellwandverdau angesetzt. Der Anteil des Maceroenzyms wurde auf 0,6% erhöht, um einen vollständigen Verdau der Zellwand nach ca. 12 Stunden zu gewährleisten. Durch die Erhöhung des Maceroenzymanteils lag in der Regel ein Protoplastenanteil von über 90% vor.

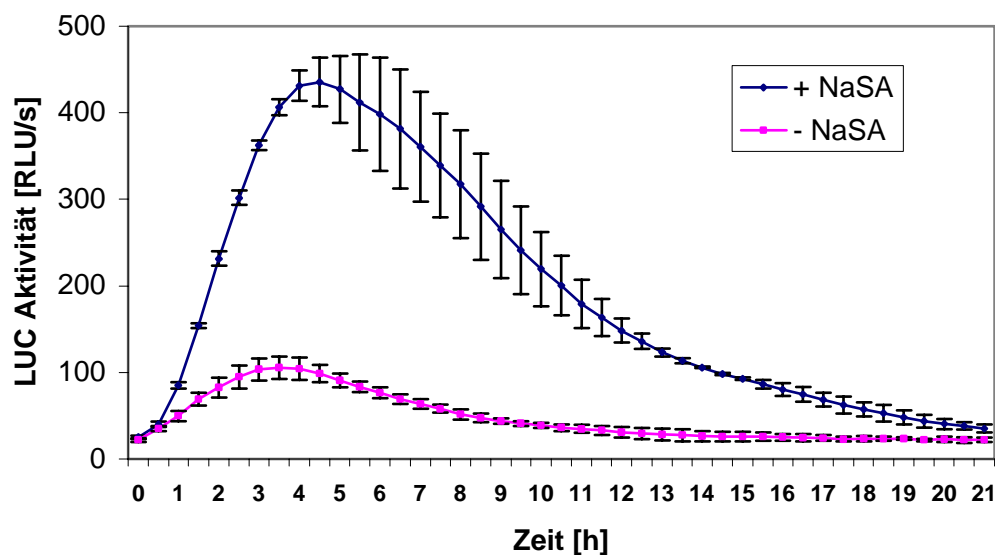


Abb. 24: Luziferaseexpression von *Vitis rupestris* Protoplasten nach transienter Transformation mit *VrGL/LUC*. Protoplasten wurden mit 75µg DNA des *VrGL/LUC*-Plasmid transformiert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Salicylsäure (NaSA-50µM) oder mit H₂O behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Luziferaseaktivität gegen die Zeit aus drei parallelen Messungen.

Abb. 24 zeigt, dass der Glukanasepromotor aus *Vitis rupestris* ähnlich wie in dem heterologen System der Petersilie eine NaSA abhängige Expression des *LUC* Reportergens bewirkt. Die Expression des *LUC*-Gens in den Protoplasten wurde durch NaSA induziert. Das transiente Maximum der Expression ist nach 4-5 Stunden zu erkennen. Danach kommt es zu einer Abschwächung des Signals und erreicht nach 21 Stunden das Niveau der nicht stimulierten Kontrolle. Die Kontrolle, die mit Wasser behandelt wurde, zeigt auch einen ähnlichen Kurvenverlauf, der aber in der Ausprägung der Amplitude nur sehr gering ist.

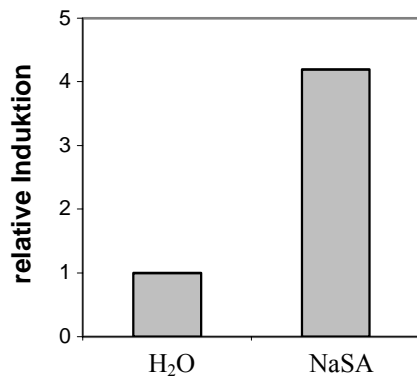


Abb. 25: Luziferase Expression des VrGL/LUC Konstruktes in Vitis rupestris Protoplasten. Protoplasten wurden mit 75µg DNA des VrGL/LUC-Plasmid transformiert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde mit Salicylsäure (NaSA-50µM) oder mit H₂O behandelt. Zur Ermittlung der relativen Induktion wurde das Integral der Kurven aus Abb. Abb. 24 gebildet und zur Expression der Kontrolle in Bezug gesetzt.

Die aus der Luziferaseaktivität bestimmte relative Induktion lag nach NaSA-Applikation bei 4,2-facher Stimulierung. Dieses Experiment zeigt eine Induzierbarkeit des VrGL-Promotors durch NaSA in Vitis rupestris Protoplasten.

Ebenfalls wurde der VGL-Promotor aus Vitis Vinifera cv. Müller-Thurgau (VvGL) auf die Luziferaseexpression durch transiente Transformation von Vitis rupestris Protoplasten getestet. Dies ermöglicht in Induktionskinetiken den direkten Vergleich beider Promotoren auf etwaige Unterschiede bzgl. des zeitlichen Verlaufs, oder der Stärke der Expression.

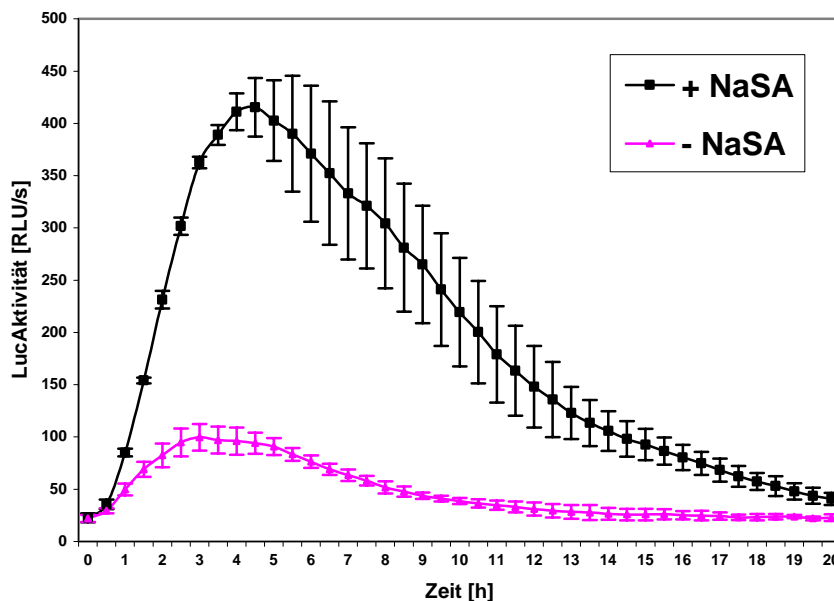


Abb. 26: Luziferaseexpression von Vitis rupestris Protoplasten nach transientser Transformation mit VvGL/LUC. Protoplasten wurden mit 75µg DNA des VvGL/LUC-Plasmid transformiert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Salicylsäure (NaSA-50µM) oder mit H₂O behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Luziferaseaktivität gegen die Zeit aus drei parallelen Messungen.

Abb. 26 zeigt, dass der VvGL Promotor der Weinrebe eine ähnlich Luziferaseexpression hervorruft, wie der VrGL Promotor aus Vitis rupestris. Die Expression des Luziferasegens in den Protoplasten wurde durch NaSA induziert. Das transiente Maximum der Expression ist nach 4-5 Stunden zu erkennen. Danach kommt es zu einer Abschwächung des Signals

und erreicht nach 20 Stunden das Niveau der nicht stimulierten Kontrolle. Die Induktionskinetiken von *VvGL* und *VrGL* in *Vitis rupestris* Protoplasten sind nahezu identisch und zeigen keine Unterschiede bzgl. ihres zeitlichen Verlaufs.

3.4.3 Ansätze zur stabilen Transformation von *Vitis rupestris* Zellsuspensionskulturen

Für die stabile Transformation der *Vitis rupestris* Zellkultur wurde eine Resistenzkassette in das *VrGL/LUC*-Plasmid eingebracht (Abb. 27). Diese vermittelt über einen 35S-Promotor in transformierten Zellen die konstitutive Expression des Enzyms Neomycinphosphotransferase (*NTP-II*) und ermöglicht die Selektion von Transformanten auf kanamycinhaltigem Medium.

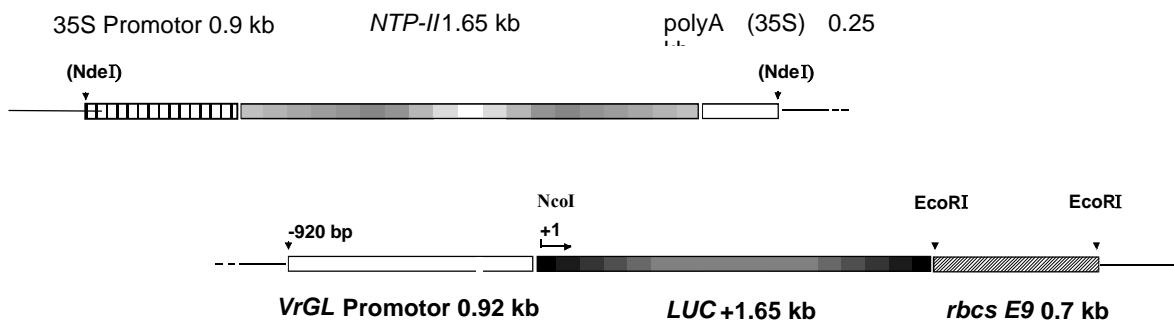


Abb. 27: Ausschnitt einer linearen Vektorkarte des *VrGL/LUC* Plasmids mit Kanamycinresistenz. Als Ausgangsvektor wurde das *VrGL/LUC* Plasmid (Abb. 21) verwendet. Die Resistenzkassette umfasst die codierende Sequenz des *NTP-II* Gens, welches unter der Kontrolle eines 35S-Promotors konstitutiv exprimiert wird. Die Größe des vollständigen Plasmids umfasst ca. 8,6 kb.

Das modifizierte *VrGL/LUC* Konstrukt mit Kanamycinresistenz wurde transient in Protoplasten transformiert und diese mit NaSA induziert. Die NaSA-induzierte Luzifera-seexpression des *VrGL/LUC* Konstrukts mit Kanamycinresistenz (in beiden Orientierungen) entsprach der des Vergleichkonstrukts ohne Resistenzkassette. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die inserierte Resistenzkassette einen Einfluss auf die Luzifera-seexpression hat. Für die stabile Transformation wurde das Plasmid gewählt, welches den 35S-Promotor in entgegengesetzter Orientierung zum *VrGL*-Promotor trägt.

In einem ersten Versuchsansatz wurde getestet, bei welchen Kanamycin-Konzentrationen den Zellen ein Wachstum ermöglicht wird. Dabei wurden die Zellen so behandelt, wie sie später auch für die stabile Transformation eingesetzt wurden. Außerdem wurde nicht nur Kanamycin als Antibiotikum eingesetzt, sondern auch das funktionell Homologe G-418.

Tab. 2: Einfluss der Antibiotikakonzentrationen auf das Wachstum der *Vitis rupestris* Zellkultur. Es wurde sowohl Kanamycin (Kan), als auch G-418 getestet. Das Wachstum der Zellen auf kanamycinhaltigem Medium wurde durch eine Konzentration von 50 mg/l deutlich gehemmt, während das Wachstum auf G-418 haltigem Medium schon ab einer Konzentration von 25 mg/l stark reduziert wurde. + bedeutet gutes Wachstum, - bedeutet deutliche Wachstumshemmung.

Anitibiotikum	Kan 10 mg/l	Kan 25 mg/l	Kan 50 mg/l	Kan 100 mg/l
Wachstum	+++++	+++++	+----	-----
Anitibiotikum	G-418 10mg/l	G-418 25mg/l	G-418 50mg/l	G-418 100mg/l
Wachstum	+++++	+----	-----	-----

Tab. 2 zeigt, dass Wachstum der Zellkultur auf selektiven Medien. Da über die Aktivität des 35S-Promotors in diesen *Vitis*-Zellkulturen keine Daten vorlagen, wurde für die weiteren Arbeiten eine Kanamycin Konzentration von 50 mg/l-, bei G418 eine Konzentration von 25 mg/l gewählt. Dadurch war zwar ein Wachstum von nicht transformierten Zellen auf selektivem Medium nicht gänzlich auszuschließen. Die Zellen die größere Aggregate bildeten konnten auch bei diesen Antibiotika-Konzentrationen wachsen, so dass für die nachfolgenden Experimente darauf geachtet wurde eine sehr feine Zellkultur aufrecht zuerhalten.

3.4.4 Stabile Transformation von *Vitis rupestris* Zellen mit der *Particle Inflow Gun* (PIG)

Das *particle inflow bombardment* Verfahren bietet die Möglichkeit, an einen Träger gebundene DNA in intakte pflanzliche Zellen einzubringen und kann sowohl zur transienten wie auch zur stabilen Transformation genutzt werden (KLEIN *et al.*, 1987, 1988). Der Hauptvorteil dieser Transformationsmethode besteht darin, dass intakte Zellen innerhalb eines Gewebeverbandes transformiert werden können. Die zur Transformation eingesetzte DNA wird über Spermidin an Goldpartikel gebunden (IGLESIAS *et al.*, 1994; HANSEN und WRIGHT, 1999), welche als DNA Träger fungieren. Mit einem kurzen Helium-Druckstoß werden die Partikel stark beschleunigt und über ein Streugitter auf die darunter platzierten Zellen gelenkt. Dabei wird eine Schädigung der Zellen durch das Anlegen eines Unterdruckes in der Kammer weitgehend verhindert (FINER *et al.*, 1992). Die Technik wurde bereits erfolgreich zur stabilen Transformation von Sojazellen (MITHOFER *et al.*, 1999) und Petersiliezellen (LOYALL *et al.*, 2000) eingesetzt und sollte für die Transformation von *Vitis*-Zellkulturen adaptiert werden.

3.4.4.1 Variation der Schussparameter

In Untersuchungen von LOYALL (LOYALL, Dissertation 2000) wurde gezeigt, dass die Streuverteilung der Partikel auf dem zu transformierenden Objekt ein ausschlaggebender Faktor für die Zahl der erhaltenen transformierten Zellen ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass der Beschuss von Papierfiltern ohne Streunetz zu einer scharf begrenzten ringförmigen Verteilung der Goldpartikel führt. Das Einsetzen eines Streunetzes 8 cm oberhalb des Papierfilters führte zu einer annähernd kreisförmigen Partikelverteilung.

Zur Bestimmung der Transformationsrate wurde ein *35S-CaMV-GUS* Plasmid über Spermidin an Goldpartikel gebunden und die Goldsuspension zum Beschuss der auf Filterpapier ausplattierten 10 Tage alten *Vitis*-Zellen mit der *particle inflow gun* verwendet. 24- 48 Stunden nach der Transformation wurde ein histochemischer *GUS*-Nachweis durchgeführt (Abb. 28)

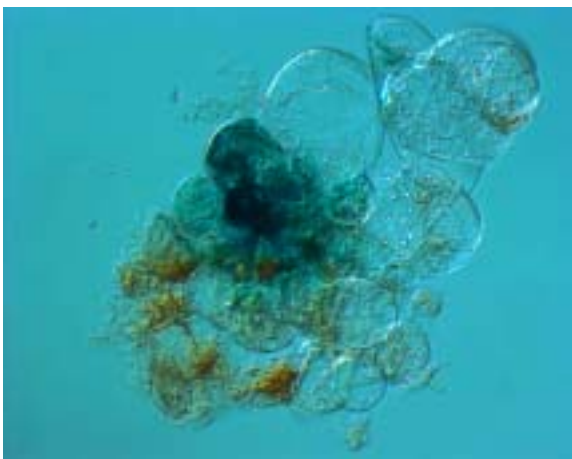


Abb. 28: Positiv transformierte *Vitis rupestris* Zelle.

Zu sehen ist ein Zellhaufen einer *V. rupestris* Zellsuspensionskultur, die durch *particle inflow gun* mit *35S-GUS* transformiert wurde. Die anschließende Färbung erfolgte mit xGluc. Es ist deutlich eine tiefe Blaufärbung zu erkennen, was auf eine positiv transformierte Zelle schließen lässt. Die umliegenden Zellen wurden nicht transformiert, erkennbar an der fehlenden Blaufärbung.

Die Transformation mit *35SGUS* dient der Überprüfung der Effizienz mit der die DNA in die Zellen aufgenommen wird. Mit verschiedenen Einstellungen (Druck, Abstand, DNA-Menge) an der *particle inflow gun* wurde die Transformationseffizienz ermittelt. In 15 Ansätzen zu je drei parallelen Variationen wurde Druck, Abstand und DNA-Menge verändert und die blau gefärbten Zellen ausgezählt. Für die weitere Optimierung der Schussparameter wurde von einer Grundeinstellung ausgegangen, die sich für die Transformation von Petersilie Zellkultur als optimal erwiesen hatte (LOYALL *et al.*, 2000). Unter diesen Einstellungen wurde eine durchschnittliche Transformationsrate von 25-35 Zellen pro beschossener Platte erreicht. Alle Zellen wurden 24 Stunden vor dem Beschuss auf $\frac{1}{2}$ MS Platten inkubiert, die zusätzlich noch 2% Sorbitol und 2% Mannitol enthielten. Dadurch wird die Osmolarität erhöht, was zu einer Verbesserung der Transformationseffizienz führt, sowie eine Schädigung der transformierten Zellen verhindert (KEMPER *et al.*, 1996).

Tab. 3: Relative Transformationsrate bei Variation verschiedener PIG Parameter. Parameter, die variiert wurden sind jeweils grau unterlegt.

Abstand Streunetz [cm]	μ l DNA*Gold/Schus s	Druck [bar]	Abstand [cm]	Streunetz	Anzahl transformier- ter Zellen/ Platte
8	15	8	16	+	32,3
8	15	8	16	-	16,7
8	15	8	16	+	33
6	15	8	16	+	29
10	15	8	16	+	30
8	5	8	16	+	22,3
8	15	8	16	+	33
8	30	8	16	+	36,3
8	15	7	16	+	32
8	15	9	16	+	32,7
8	15	10	16	+	29,7
8	15	8	14	+	32
8	15	8	18	+	27,7
8	15	8	20	+	24,3

Die Auswertung der unter verschiedenen Bedingungen erzielten Transformationsraten ergab, dass die Anzahl der transformierten Zellen mit dem optimalen Streuungsmuster der Partikel korrelierte. Der Beschuss von Zellen ohne Streunetz oder unter hohem Heliumdruck führte dagegen zu einer Schädigung der Zellen und reduzierter Transformationseffizienz. Auch bei dem eingesetzten Volumen scheint bei 15 μ l das optimale Verhältnis von rel. DNA zu absoluter DNA Menge zu liegen. Für die anschließenden Transformationen mit dem *VrGL/LUC* Konstrukt wurde ein Abstand des Streunetzes von 8 cm, 15 μ l DNA*Gold/Schuss, 8 bar Druck und ein Abstand von 16 cm gewählt.

3.4.4.2 Selektion stabil transformierter Linien

Geeigneten Bedingungen zur Selektion stabil transformierter Zellen wurden in Vorversuchen mit unterschiedlichen Kanamycin- bzw. G-418 Konzentrationen ermittelt (Tab. 2).

Kanamycinkonzentrationen ≥ 50 mg/l oder G-418 Konzentrationen ≥ 25 mg/l verhinderten das Wachstum von Wildtyp *Vitis*-Zellen stringent.

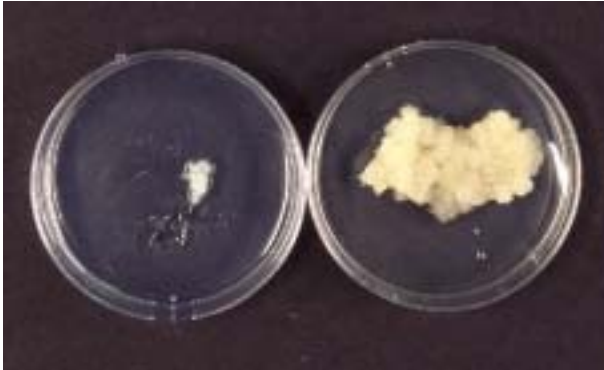


Abb. 29: Wachstum von Wildtyp- und stabil transformierten *Vitis rupestris* Zellen auf G-418-haltigem Medium. Die rechte Bildhälfte zeigt Zellen von *Vitis rupestris*, die mit dem *VrGL/LUC*-Konstrukt beschossen wurden und auf selektivem $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium (25 mg/l G-418) 8 Wochen bei 23°C inkubiert wurden. Zum Vergleich ist links eine Kontrollplatte mit nicht transformierten Wildtypzellen abgebildet, die nach 8 Wochen keinerlei Wachstum auf dem selektiven Medium zeigen.

Zellen einer 10 Tage alten Suspensionskultur wurden über *PIG* Beschuss mit dem *VrGL/LUC* Konstrukt transformiert und 2 Tage später auf selektives Medium überführt. Nach ca. 4 Wochen wurden auf den beschossenen Platten kleinste Anhäufungen aus potentiell stabil transformierten Zellen sichtbar, aus denen sich nach Übertragung auf neues Medium nach weiteren 4-6 Wochen 0.1–1 cm große Kalli gebildet hatten.

Insgesamt 100 potentiell transformierte Kalli wurden zur weiteren Kultivierung von den Platten abgenommen und vereinzelt. Nachdem genügend Zellmaterial zur Verfügung stand, wurde die Luziferaseexpression der Zelllinien nach Besprühen von NaSA mit einer CCD-Kamera *in vivo* ermittelt (Abb. 29). Die Aktivität des Reportergens in den transformierten Zellen wurde durch Besprühen der eingebetteten Zellen mit Luziferinlösung überprüft. Das Luziferin diffundiert innerhalb kurzer Zeit in die Zellen ein. Exprimieren die Zellen das Transgen, kommt es infolge der oxidativen Decarboxylierung des Luziferins durch die Luziferase zur Freisetzung von Photonen. Diese können mit einer mit CCD-Kamera (Abb. 30) detektiert werden (KOST *et al.*, 1995).

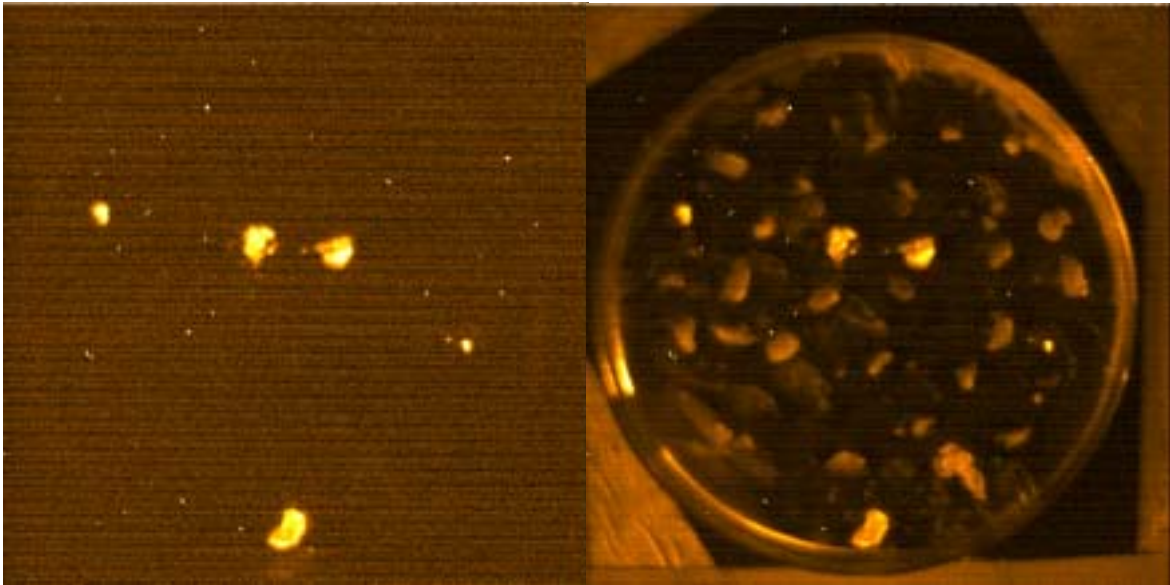


Abb. 30: Screening der VrGL/LUC Linien mit der CCD Kamera. Von separat kultivierten Einzellinien wurde Zellen abgenommen und auf die nummerierten Felder einer Platte mit $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium überführt. Die Zellen wurden mit einer 50 μ M NaSA-Lösung besprüht und anschließend 1 Stunde bei 23°C im Dunkeln gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit einer 1 mM Luziferinlösung besprüht und die Luziferaseaktivität mit der CCD Kamera bestimmt. Zur späteren Zuordnung wurden Aufnahmen der Platten gemacht bevor die Detektion der Photonen in der lichtdichten Aufnahmekammer erfolgte.

Der Vergleich der Aufnahmen in Abb. 30 zeigt deutlich, dass die regenerierten transgenen Zellen teilweise Luziferase gebildet hatten. Die durch Freisetzung von Photonen entstandenen Muster von Lichtpunkten entsprachen der Position einzelner Zellhaufen innerhalb des Kulturmediums nach künstlicher Beleuchtung (Abb. 30).

3.5 Charakterisierung der VrGL/LUC Expression ausgewählter Linien

Von 100 untersuchten Klonen zeigten nach dem Vereinzeln auf selektives Kulturmedium nur 49 signifikantes Wachstum. Lediglich 5 Klone zeigten eine Luziferaseexpression. Von allen 5 Klonen wurden Zellsuspensionskulturen angelegt und in Bezug auf ihre Induzierbarkeit durch NaSA analysiert.

In dieser Charakterisierung sollte nachgeprüft werden, ob die NaSA-abhängige Luziferaseexpression mit der endogenen VGL-Expression vergleichbar war. Zur Beurteilung wurde ausschließlich auf die NaSA-abhängige Induzierbarkeit der transgenen Linien geachtet. In Abb. 31 ist die absolute Luziferaseaktivität der Proben nach Applikation von H₂O und NaSA dargestellt, in Abb. 32 ist die auf die Kontrollwerte bezogene relative Induktion durch NaSA gezeigt.

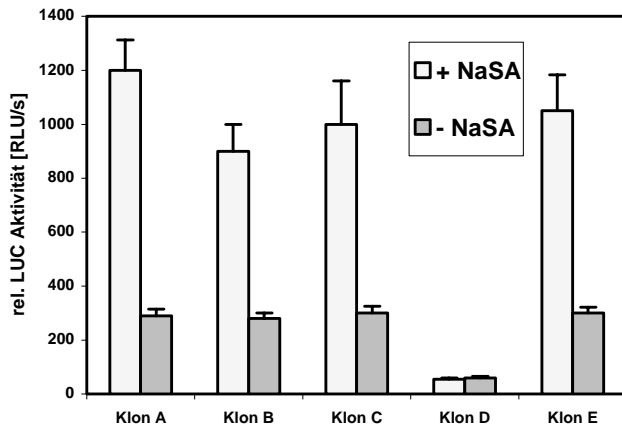


Abb. 31: Luziferaseexpression transgener Zelllinien. Zellsuspensionskulturen der verschiedenen transgenen *VrGL/LUC* Linien wurden mit 50 μ M NaSA behandelt und im Biolumat analysiert. Aufgetragen ist die Zahl emittierter Photonen pro Zeitintervall.

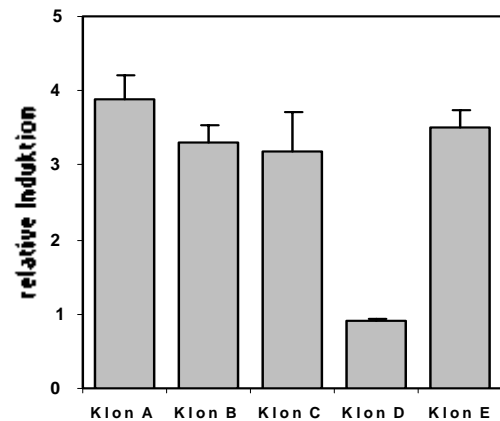


Abb. 32: Relative Induktion der Luziferase Expression der transgenen *VrGL/LUC* Linien. Die Daten aus der NaSA behandelten Proben aus **Abb. 31** wurde in Bezug auf die mit H_2O behandelten Kontrollen gesetzt.

Abb. 32 zeigt, dass in 4 von 5 analysierten Linien signifikante Luziferaseaktivität nach Stimulation messbar war. Eine der untersuchten Linie (Klon D) zeigte keine Stimulation der Luziferaseexpression nach NaSA-Applikation. Die Fähigkeit zur NaSA-vermittelten Aktivierung der Luziferase muss unterdrückt, oder verloren gegangen sein.

Die Integration des *VrGL/LUC*-Konstrukts in das Genom von *Vitis rupestris* wurde durch PCR überprüft. Es sollte insbesondere festgestellt werden, ob der Promotor in voller Länge vorlag. Hierfür wurden Primer gewählt, die zum einen an der Luziferase binden konnten, zum anderen an dem *full length* Promotor der Glukanase. Für die in Abb. 30 dargestellten 5 Linien konnte über PCR der *VrGL*-Promotor in voller Länge nachgewiesen werden. Für weitere Analysen, wurde Klon A in großem Maßstab vermehrt und für die jeweiligen Experimente bereitgestellt.

3.5.1 Vergleich zwischen endogen regulierter *VGL*- und neu integriertem Luziferase Transkript

Nach vorläufiger Charakterisierung hinsichtlich der Luziferaseexpression wurde eine unabhängige Linie (A) genauer charakterisiert. Zunächst sollte nachgeprüft werden, ob die Luziferase Expression der stabil transformierten Zelllinien mit der endogenen *VGL* Expression in der *Vitis*-Zellkultur vergleichbar war.

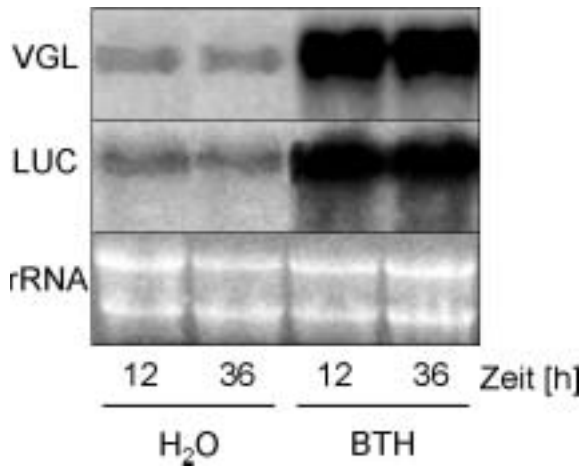


Abb. 33: Transkriptakkumulation der endogenen Glukanase und des Luziferase-Reportergens in der VrGL/LUC Linie. Zellsuspensionskulturen wurden bei 120 rpm geschüttelt und mit BTH (50 µM) oder H₂O inkubiert. Dargestellt ist die Akkumulation der Transkripte (*LUC*, Luziferase; *VGL*, Glukanase). Aufgetragen wurden 20 µg Gesamt-RNA. Zur Beladungskontrolle ist die ribosomale RNA (*rRNA*) nach Färbung durch Etbr und unter UV-Anregung dargestellt.

Zellen der *VrGL* Linie wurden mit dem SA-Analogon BTH (50µM) bzw. mit Wasser behandelt. 12 und 36 Stunden nach Behandlungsbeginn, wurde die RNA aus den Proben extrahiert und die Transkriptmenge bestimmt. Abb. 33 zeigt, dass in den H₂O behandelten Zellen nur eine geringe Akkumulation von *LUC*- bzw. *VGL*-mRNA auftrat. In den mit BTH behandelten Proben kam es 12- und 36 Stunden nach Stimulation zu einer vergleichbar starken Induktion der *VGL*- und *LUC*- Transkripte.

Insgesamt ließ sich durch diesen Nachweis ein vergleichbares Regulationsmuster des Reporter-Transkriptes und endogenem reguliertem *VGL*-Transkript zeigen. Die BTH stimulierte Luziferaseaktivität des *VrGL/LUC*-Konstruktes in der stabil transformierten *Vitis rupestris* Zelllinie spiegelte somit die Regulation der endogenen *VGL* wieder.

3.5.2 *In vivo* Analyse der Luziferaseexpression nach Stimulation der VrGL/LUC-Linie

Die mit dem *VrGL/LUC* Konstrukt stabil transformierte *Vitis rupestris* Zellkultur wurde zu kinetischen Analysen der Promotoraktivität herangezogen. Hierbei ist die einfache und schnelle Analyse von Substanzen geplant, um diese so auf eine mögliche *PR*-Gen Expression zu testen. Komponenten die in diesem System als funktionell erkannt werden, können dann auch auf Resistenzinduktion an Blattscheiben und intakten Pflanzen im Gewächshaus oder im Freiland geprüft werden.

3.5.2.1 Induktion durch Salicylsäure (SA) und dem Strukturhomologen Benzo[1,2,3]thiadiazol-7-Carbothionsäure-S-methylester (BTH)

Kleinmolekulare Substanzen wie Salicylsäure (SA,) sowie deren synthetisches Strukturanalogs BTH (Bion®, Benzo[1,2,3]thiadiazol-7-Carbothionsäure-S-methylester), können eine Resistenz bei einer Reihe von Pflanzen induzieren, ohne direkte antimikrobielle Aktivität *in vitro* aufzuweisen (CONRATH *et al.*, 2002). Dabei wird BTH unter dem Handelsnamen

Bion im Weizenanbau bereits erfolgreich eingesetzt. Deren Applikation steht in Wechselbeziehung, sowohl mit der Induktion von *PR*-Genen, als auch der einer Resistenzausprägung (RYALS *et al.*, 1996; STICHER *et al.*, 1997). Mit der stabil transformierten *VrGL/LUC* Linie besteht nun die Möglichkeit, viele Substanzen einfach und schnell auf ihre *PR*-Gen Induktion zu testen.

Dabei wurde zunächst in *Northern blot* Analysen der *VrGL/LUC* Linie die Induktion der Glukanase (*VGL*) nach Applikation von BTH (50 μ M) und NaSA (50 μ M) überprüft.

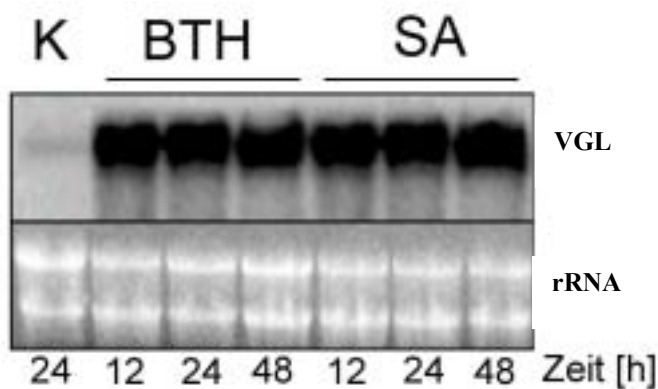


Abb. 34: *Northern blot* Analyse der *VrGL/LUC* Linie nach Applikation von BTH (50 μ M) und NaSA (50 μ M). Zell-suspensionskulturen der *VrGL/LUC* Linie wurden bei 120 rpm mit BTH bzw. NaSA induziert und zu den angegebenen Zeitpunkten der RNA Isolation überführt. Zum Zeitpunkt 24 Stunden wurde RNA der mit H₂O behandelten Kontrolle (K) isoliert. Zur Beladungskontrolle ist die ribosomale RNA (rRNA) nach Färbung durch Etbr und unter UV-Anregung dargestellt..

Abb. 34 zeigt eine Erhöhung der *VGL*-mRNA Transkripte nach Applikation von BTH und NaSA zu allen Zeitpunkten, im Vergleich zur H₂O behandelten Kontrolle. Das Maß der Transkriptakkumulation ist bei beiden Substanzen in etwa gleich. Die Applikation der Zellsuspensionskulturen von NaSA bzw. BTH erfolgte in 200 ml Erlenmeyerkolben bei 120 rpm auf dem Schüttler. Im Unterschied dazu, wurden für die folgenden *in vivo* Luziferase-Expressionskinetiken, 96 *well* Meß-Platten verwendet, die aus technischen Gründen jedoch nicht geschüttelt werden konnten.

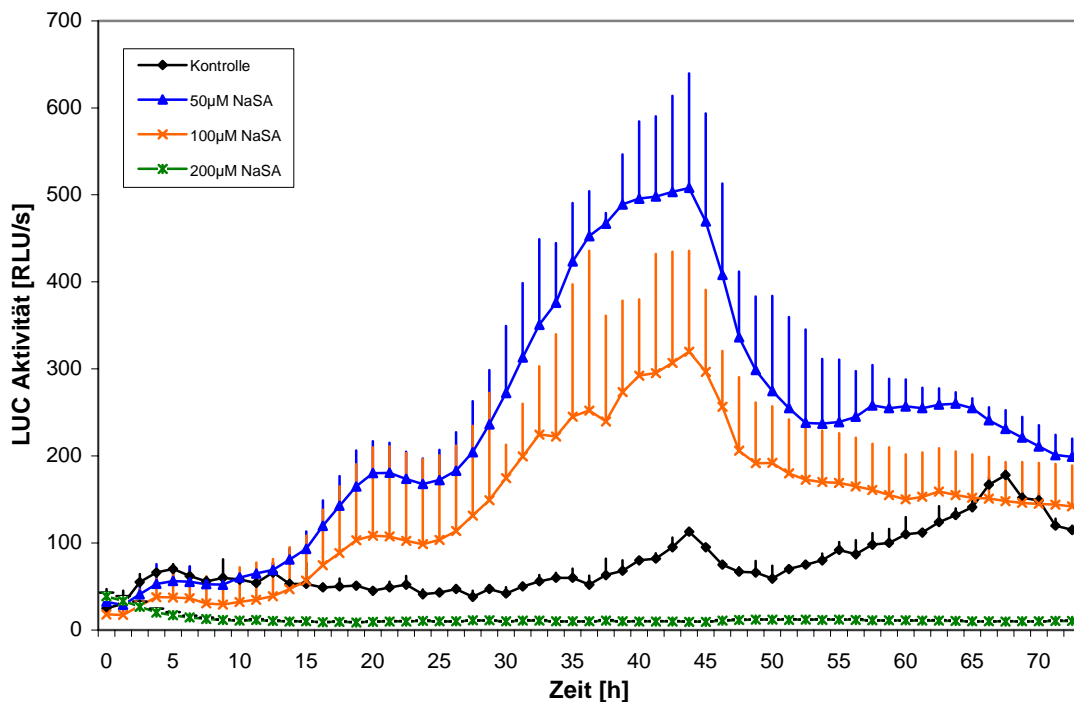


Abb. 35: Induktionskinetik der Luziferaseexpression in der VrGL/LUC Linie nach Applikation von Natriumsalicylat (NaSA). Die *in vivo* gemessene spezifische Luziferaseaktivität wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden nach Zugabe von NaSA verfolgt. Jeder Messpunkt gibt den Mittelwert von 3 Parallelen wieder.

In Abb. 35 ist die Kinetik der VrGL/LUC Expression für 3 verschiedenen Konzentrationen an NaSA beispielhaft dargestellt. Die *in vivo* Messung der VrGL/LUC Expression ergab, dass eine Induktion durch 50 µM NaSA nach ca. 20 Stunden ein erstes Maximum erreicht, welches anschließend leicht abfällt. Nach ca. 44 Stunden ist die Luziferaseexpression maximal und fällt bis zum Zeitpunkt 54 Stunden nach Stimulation erneut ab. Danach kommt es nur noch zu einer leichten Zunahme der Luziferaseaktivität, welche nach ca. 64 Stunden wieder abnimmt. Eine Stimulation durch 100 µM NaSA zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf wie eine Applikation von 50 µM NaSA, die jedoch in der Stärke des Signals schwächer verläuft. Ein erstes Maximum ist nach ca. 20 Stunden zu erkennen, welches von einem zweiten Maximum nach ca. 44 Stunden gefolgt wird. Anschließend fällt die Luziferaseexpression bis zum Zeitpunkt 48 Stunden nach NaSA-Applikation stark ab. Bis zum Ende der Messung nach 72 Stunden kommt es zu einem leichten, aber stetigen Abfall der Luziferaseaktivität. Vermutlich wirkt sich eine Applikation von 200 µM NaSA letal auf die Zellen aus, welches durch einen Abfall der Luziferaseaktivität nach 5 Stunden zu erkennen ist. Die Luziferaseaktivität der mit Wasser behandelten Kontrolle bleibt bis 38 Stunden nach Beginn der Messung auf einem vergleichbaren Niveau, bevor eine erstes kleines Maximum nach ca. 44 Stunden erkennbar wird. Anschließend fällt die Luziferaseexpression leicht ab und bildet nach ca. 68 Stunden ein zweites Maximum aus.

Bildet man das Integral der Kurven aus Abb. 35 und setzt dieses in Relation zu der nicht stimulierten Kontrolle ergibt sich die relative Induktion.

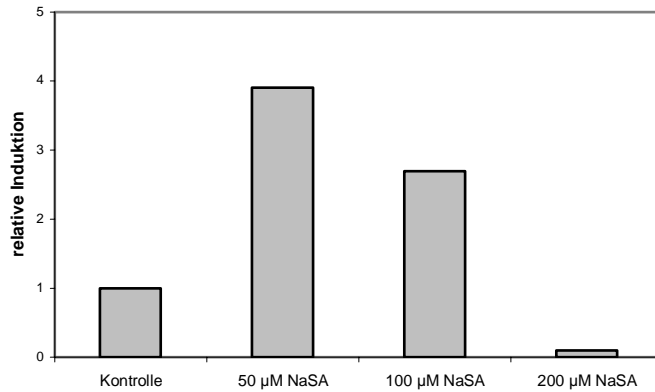


Abb. 36: Relative Induktion der Luciferase Expression in der VrGL/LUC Linie. Zellen wurden mit NaSA oder mit H₂O stimuliert. Zur Ermittlung der relativen Induktion wurde das Integral der Kurven aus Abb. 35 gebildet und mit der Grundexpression, der mit Wasser behandelten Kontrolle in Bezug gesetzt.

Abb. 36 zeigt die Induktion der Luciferaseaktivität in Bezug auf die mit Wasser behandelte Kontrolle. Die optimale, durch NaSA induzierbare, Konzentration liegt bei 50 µM und beträgt ca. das 3,9-fache. Eine NaSA Konzentration von 200 µM ist vermutlich letal für die *Vitis*-Zellkultur. Eine Stimulation durch 100 µM NaSA bewirkt eine 2,7-fache Steigerung der Luciferaseaktivität.

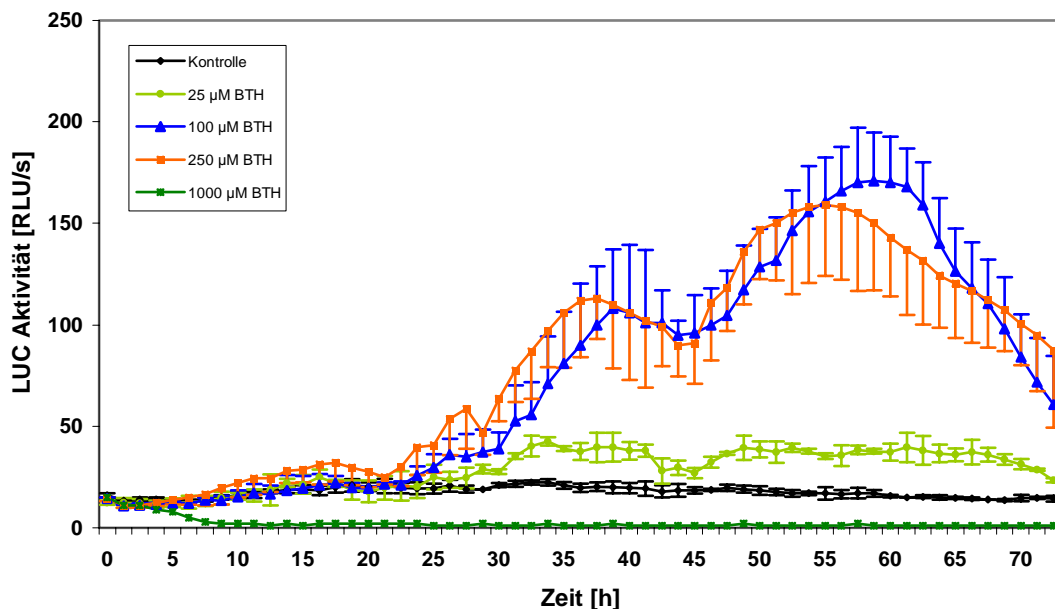


Abb. 37: Induktionskinetik der Luciferaseexpression in der VrGL/LUC Linie nach Applikation von BTH. Die *in vivo* gemessene spezifische Luciferaseaktivität wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden nach Zugabe von BTH verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von 3 parallelen Messungen.

Abb. 37 zeigt die Luziferaseexpression der *VrGL/LUC* Linie nach Applikation von BTH. Bei einer Konzentration von 25 μM BTH ist eine schwache Erhöhung der Luziferaseaktivität nach ca. 25 Stunden feststellbar und verbleibt bis zum Ende der Messung auf ähnlichem Niveau. Eine Stimulation durch 100 μM BTH führt nach 25 Stunden zu einer ersten Zunahme der Luziferaseaktivität. Nach 38 Stunden wird ein erstes Maximum erreicht, bevor die Luziferaseexpression leicht abfällt, um ein zweites Maximum nach 60 Stunden auszubilden. Danach fällt die Luziferaseaktivität stetig ab. Bei einer Konzentrationen von 250 μM kommt es bereits nach 15 Stunden zu einer ersten leichten transienten Zunahme der Luziferaseaktivität, die bei ca. 36 Stunden ein weiteres Maximum aufweist und anschließend wieder leicht abfällt. Der Zeitpunkt in dem eine Zunahme der Luziferaseaktivität erreicht wird ist im Vergleich zu den NaSA Experimenten nach hinten verschoben. Während nach Stimulierung durch NaSA bereits nach 18 Stunden eine deutliche Zunahme der Luziferaseaktivität feststellbar war und nach 44 Stunden die maximale Luziferaseexpression erreicht wurde (Abb. 35), ist die Stimulierung durch BTH erst nach ca. 55- bzw. 60 Stunden maximal. Wie schon in Abb. 37 zu sehen war zeigen die Induktionskinetiken eine biphasischen Verlauf. Die Maxima sind jeweils um 19- bzw. 22 Stunden versetzt. Eine Konzentration von BTH, die vermutlich zum Absterben der Zellen führt, wird bei 1000 μM erreicht.

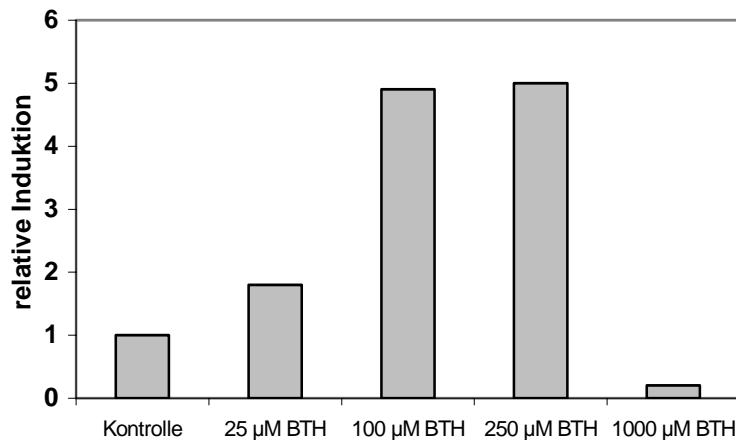


Abb. 38: Relative Induktion der Luziferase Expression in der *VrGL/LUC* Linie. Zellen wurden mit BTH oder mit H_2O stimuliert. Zur Ermittlung der relativen Induktion wurde das Integral der Kurven aus Abb. 37 gebildet und mit der Expression, der mit Wasser behandelten Kontrolle in Bezug gesetzt.

Aus Abb. 37 ergeben sich folgende Werte für die relative Induktion: Eine Applikation von 25 μM BTH führt zu einer 1,8 fachen Erhöhung der Luziferaseaktivität gegenüber der Kontrolle. Eine Stimulierung von 100 μM BTH führt zu einer 4,9-fachen-, eine Stimulierung von 250 μM zu einer 5,0-fachen Erhöhung der Luziferaseaktivität.

Diese Experimente zeigen deutlich die Funktionalität dieses Systems bezüglich der Induzierbarkeit in Abhängigkeit der Substanzen und deren Konzentration. Allerdings sind die Ergebnisse in ihrem zeitlichen Verlauf unbefriedigend, da eine Zunahme der Luziferaseaktivität, verglichen mit den transienten Transformationen (Abb. 24 und Abb. 26), zeitlich verzögert war. Alle Experimente wurden in „96 well“ Meß-Platten durchgeführt. Unter

diesen Bedingungen ist die Sauerstoffversorgung der Zellen vermutlich mangelhaft, da die Zellen nicht mehr geschüttelt werden und zu Boden sinken. Die Sauerstoffunterversorgung der Zellen kann dadurch als Stressfaktor wirken und somit zu einer Induktion der Luziferaseexpression auch in nicht stimulierten Zellen führen (GEORG FELIX, persönliche Mitteilung).

Zunächst wurde eine *in vitro* Messung durchgeführt, in dem die Zellen unter optimalen Bedingungen (40 ml Zellsuspensionkultur, 120 rpm) stimuliert wurden und anschließend nach verschiedenen Zeitpunkten Aliquots (100 µl) abgenommen und nach Zellaufschluss die Luziferaseaktivität bestimmt wurde.

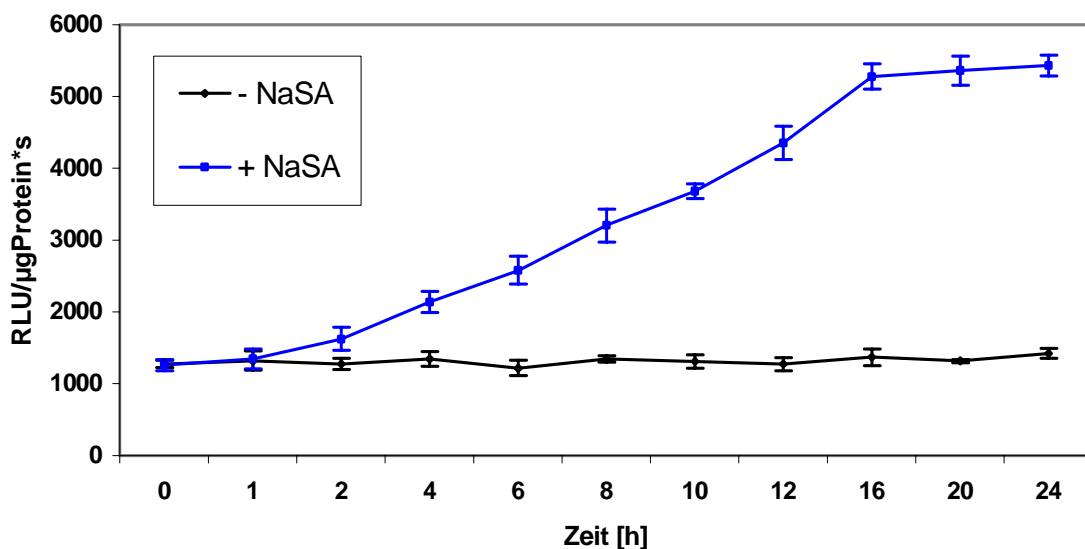


Abb. 39: *In vitro* Luziferaseexpression der VrGL/LUC Linie nach NaSA Applikation. Zellen der VrGL/LUC Linie wurden auf dem Schüttler (120 rpm) mit 50 µM NaSA oder H₂O stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Anschließend wurden die Zellen aufgeschossen und die Luziferaseaktivität *in vitro* bestimmt.

Wie in Abb. 39 zu sehen verläuft die Induktionskinetik der Luziferaseexpression unter diesen Bedingungen erheblich schneller ab. Bereits 1 Stunde nach Stimulation beginnt eine Erhöhung der Luziferaseaktivität nach NaSA-Applikation. Dies könnte auf eine optimalere Versorgung der Zellen (120 rpm, kein Absinken) und schnellere Verteilung des Induktors zurückzuführen sein. Der Nachteil dieser Methode liegt im Aufwand, die Zellen aufzuschließen, das Protein zu extrahieren und die Luziferaseaktivität zu bestimmen. Somit würden sich *in vitro* Messungen für ein *screening* vieler Substanzen auf ihre PR-Gen Induktion nur bedingt eignen. Deshalb wurde versucht die Messung der Luziferaseaktivität in den Meß-Platten zu optimieren.

3.5.2.2 Optimierung der Luziferase Expressionskinetiken der *VrGL/LUC* Linie

Die Arbeiten wurden im Rahmen einer Diplomarbeit weitergeführt. Um eine mögliche Entstehung anaerober Bedingungen während den Messungen zu minimieren, wurden 100 μ l sich verfestigendes Zellkulturmedium, in die Meß-Platten gefüllt. Anschließend wurden verschiedene Volumina der *VrGL/LUC* Linie stimuliert und in die *wells* überführt. Um eine Austrocknung der Zellen zu verhindern wurde die Platte mit einer zurechtgeschnittenen Kopierfolie abgeklebt.

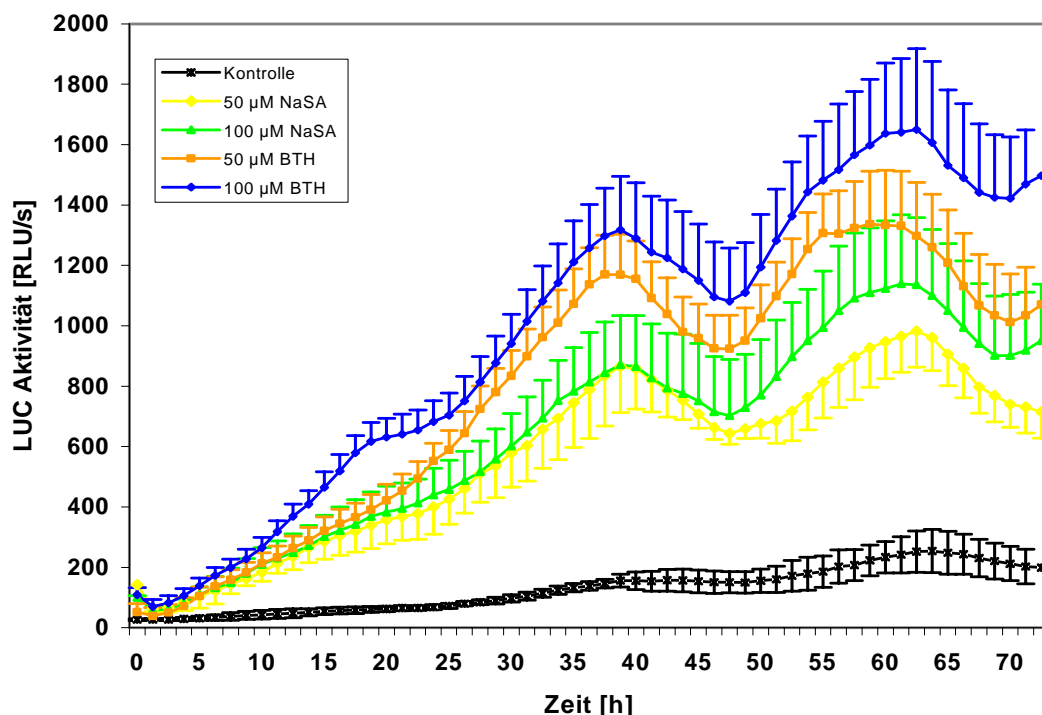


Abb. 40: Induktionskinetik der Luziferaseexpression in der *VrGL/LUC* Linie nach Applikation von BTH und NaSA. Die *in vivo* gemessene spezifische Luziferaseaktivität wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden verfolgt. Die erste Messung der Luziferaseaktivität erfolgte 3 Stunden nach Stimulierung. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung aus 3 parallelen Messungen.

Abb. 40 zeigt die Luziferaseaktivität nach Stimulierung durch NaSA und BTH unter den veränderten Bedingungen. Die Induktion der Zellkultur mit den verschiedenen Substanzen erfolgte noch auf dem Zellkultur-Schüttler bei 120 rpm, bevor die Zellen in die Meß-Platten überführt wurden und die erste Messung erfolgte. Unter diesen Bedingungen ist bereits nach 5 Stunden eine Zunahme der Luziferaseaktivität zu beobachten. Alle Kurven unterliegen einem biphasischen Verlauf. Nach Applikation von BTH (100 μ M) ist nach ca. 40 Stunden ein erstes Maximum zu erkennen, bevor die Luziferaseaktivität wieder abnimmt, um schließlich nach ca. 64 Stunden erneut ein Maximum zu bilden. Danach fällt die Luziferaseaktivität erneut ab und durchläuft ein Minimum nach ca. 70 Stunden. An-

schließlich kommt es wieder zu einer Zunahme der Luziferaseaktivität. Eine Applikation von NaSA führt zu einem nahezu identischen Kurvenverlauf, der jedoch in der Ausprägung der Amplitude schwächer abläuft.

Diese Daten zeigen ebenfalls die Schwingung, der die Luziferaseexpression unterliegt. Bei ansteigender Amplitude liegt der Phasenunterschied bei ca. 23 Stunden. Diese Frequenz, legt den Schluss nahe, dass die Regulation einer circadianen Rhythmik unterliegt. Dies wird dadurch bestärkt, dass auf dem *VrGL*-Promotor ein *cis*-regulatorisches Element lokalisiert ist, welches zunächst aus dem Promotor eines *Lhc*-Komplexes der Tomate charakterisiert (PIECHULLA *et al.*, 1998) wurde. Durch Deletionsanalysen an transgenem Tabak konnte gezeigt werden, dass allein dieses Element für die Expression nach einer circadianen Rhythmik verantwortlich ist.

Berechnet man die relative Induktion der Kurven aus Abb. 40 ergibt sich unter diesen Bedingungen eine Zunahme der Induzierbarkeit der Luziferaseaktivität. Die mit H₂O behandelten Kontrollmessungen zeigen nur noch eine vergleichsweise schwache Luziferaseexpression.

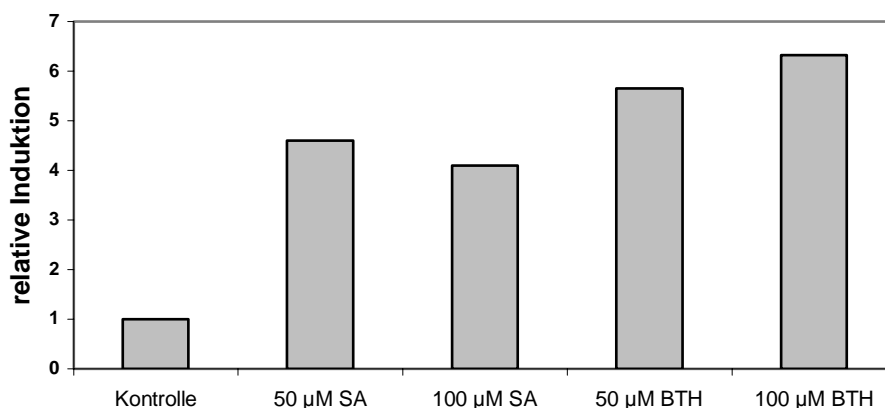


Abb. 41: Relative Induktion der Luziferase Expression in der *VrGL/LUC* Linie. Zellen wurden mit BTH, NaSA oder mit H₂O stimuliert. Zur Ermittlung der rel. Induktion wurde das Intergral der Kurven aus Abb. 40 gebildet und mit der Grundexpression, der mit Wasser behandelten Kontrolle in Bezug gesetzt.

Abb. 41 zeigt die relative Induktion, die aus den Kurven in Abb. 40 berechnet wurden. 50 µM NaSA stimuliert die *VrGL/LUC* Linie um das 4,1-fache im Vergleich zu der Kontrolle. 100 µM NaSA führt zu einer 4,6-fachen Erhöhung der Luziferaseaktivität. Zu einer weiteren Erhöhung der relativen Induktion wird durch BTH vermittelt. Nach Gabe von 50 µM BTH beträgt die Steigerung der Luziferaseaktivität das 5,7 fache und 100 µM führt zu einer 6,1 fachen Steigerung.

3.5.3 Analyse des *VrGL* Promotors

Um die Funktion von *cis acting elements* innerhalb des Glukanase Promotors näher zu charakterisieren wurden verkürzte Promotorfragmente mit dem Luziferasegen fusioniert (Abb. 42). Die Konstrukte wurden durch Elektroporation in *Vitis rupestris* Protoplasten transformiert und die Luziferaseexpression der Zellen nach Stimulierung analysiert. Auf diese Weise sollte versucht werden, spezifische Elemente einzugrenzen, die für die Induktion der Genexpression verantwortlich sind.

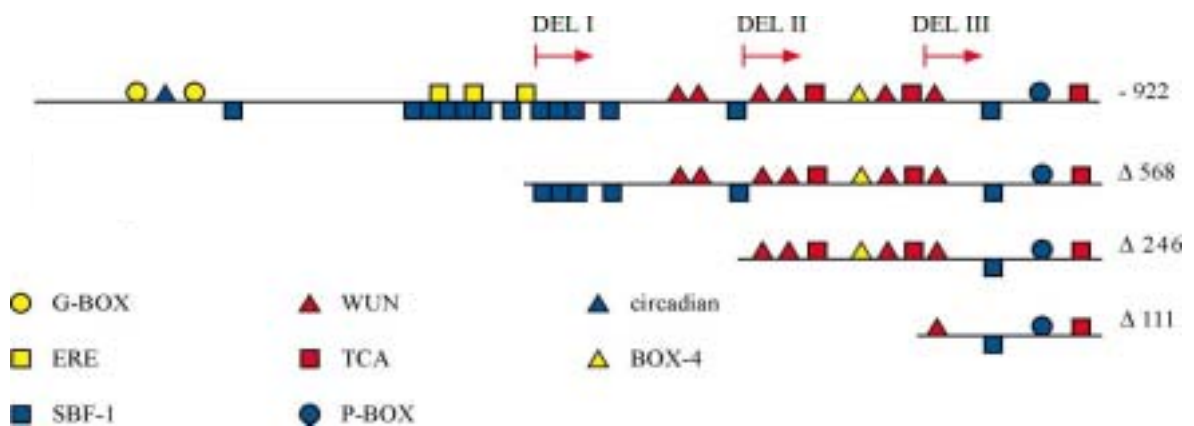


Abb. 42: Schematische Anordnung der Deletionskonstrukte des *VrGL* Promotors. Die Promotorfragmente wurden durch PCR amplifiziert und in den *luc+* Vektors inseriert.

Die verschiedenen Promotorfragmente wurden durch transiente Transformation in *Vitis rupestris* Protoplasten eingebracht und ihre Luziferaseaktivität nach Stimulierung durch NaSA, BTH und pep 13 bestimmt. Pep 13 ist ein Elicitor, der sehr gut untersucht ist und in Petersilie-Zellkultur die Produktion von Furanocumarinen auslöst (EBEL und MITHÖFER, 1998). In der *Vitis rupestris* Zellkultur löst pep 13 eine Alkalisierung des Mediums aus (Abb. 52), d. h. der Elicitor wird erkannt, führt aber nicht zur Expression der Luziferase (Abb. 53). Im folgenden sollte zusätzlich untersucht werden, ob eventuell *silencer* Regionen des *VGL* Promotors die pep 13 Induktion unterdrücken.

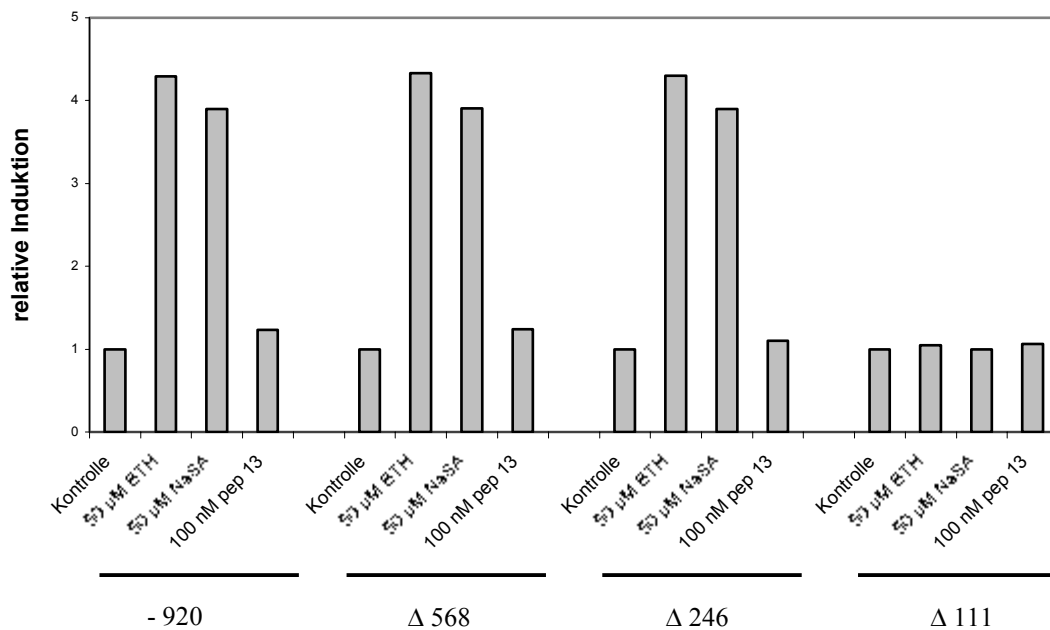


Abb. 43: Luziferaseexpression der Deletionskonstrukte nach Applikation verschiedener Induktoren in *Vitis*-Protoplasten. Die verschiedenen Ansätze wurden mit 50 μM BTH, 50 μM NaSA oder mit 100 nM pep 13 induziert. Die Kontrollzellen wurden mit Wasser behandelt. Die spez. Luziferaseaktivität der Proben ist auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Die Daten stellen die Mittelwerte von 3 Parallelen dar. Da der rel. Fehler unter 2% lag wurde auf Fehlerbalken verzichtet.

Das -920 *VrGL/LUC* Konstrukt umfasst die längste Promotorsequenz. Arbeiten an unterschiedlichen pflanzlichen Promotoren zeigten, dass oft ein Promotorbereich von max. 600 bp notwendig und hinreichend für die Regulation nachfolgender Gene ist (LEBEL *et al.*, 1998; MENKE *et al.*, 1999). Die Anordnung mutmaßlicher *cis*-regulatorischer Elemente des *VrGL* Promotors ist in Abb. 20 dargestellt. Die Messung der Luziferaseaktivität in den mit dem -920 *VrGL* Promotor-Konstrukt transformierten Protoplasten zeigte eine Luziferaseexpression nach Stimulation durch BTH von 4,3-fach und SA von 3,9-fach. Demgegenüber führte eine pep 13-Applikation, ebenso wie die H₂O Kontrolle zu keiner Zunahme der Luziferaseaktivität.

Das $\Delta 568$ *VrGL/LUC* Konstrukt wurde um einen Sequenzbereich mit mehreren möglichen Bindungsstellen für circadian, SBF1, G-BOX, ERE bzw. WUN Transkriptionsfaktoren verkürzt (Abb. 42). Dieses Konstrukt zeigte im Vergleich zu dem -920 *VrGL* Promotor-Konstrukt eine gleiche Expression der Luziferase, während eine pep 13 Behandlung der Zellen, ebenso wie H₂O keine Induktion der Luziferaseexpression bewirkte. Das $\Delta 246$ *VrGL/LUC* Konstrukt wurde gegenüber dem $\Delta 568$ *VrGL/LUC* Konstrukt um einen weiteren Bereich verkürzt, der mehrere Erkennungssequenzen für ERE- und SBF1-homologe Transkriptionsfaktoren enthält. Die Luziferaseexpression des $\Delta 246$ *VrGL Promotor/LUC* Konstruktes zeigt ebenfalls eine dem -920 - und dem $\Delta 568$ *VrGL Promotor/LUC* Konstruktes vergleichbare Induktion. Dies deutet darauf, dass in diesem Promotorbereich keine

essentiellen *cis*-regulatorischen Elemente zur NaSA vermittelten Induktion vorliegen. Die Messung der durch das Δ 111 *VrGL/LUC* Konstrukt vermittelte Luziferaseexpression ergab eine im Vergleich zu den längeren *VrGL/LUC* Konstrukten eine stark verringerte Expressionsrate. Dieses Konstrukt wurde um einen Bereich verkürzt, der mehrere Erkennungssequenzen für WUN- und TCA- homologe Transkriptionsfaktoren, sowie eine BOX-4, enthält. Eine Induktion durch NaSA bzw. BTH findet nicht mehr statt (Abb. 43). Dies deutet darauf hin, dass eine oder mehrere der deletierten Elemente eine Funktion zur NaSA bzw. BTH vermittelten Regulation des *VrGL* Promotors haben. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich innerhalb der ersten 246 bp des *VrGL* Promotors die für eine NaSA bzw. BTH Induktion des Promotors notwendigen und hinreichenden Elemente befinden.

3.5.4 Regeneration von transgenen Zellkulturen

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte transgene Zellkultur eignet sich zur Analyse der *PR*-Gen-Promotor Induktion durch Elicitoren. Interessante Fragestellungen, wie z. B. die lokale Ausbreitung von Signalen im Blatt nach Stimulationen oder Infektionen sind naturgemäß nur an intakten Pflanzen durchführbar. Um die Basis zur Analyse solcher Vorgänge zu schaffen, wurde versucht transgene Pflanzen mit dem *VGL*-Promotor Luziferase-Reporter (Abb. 21) herzustellen.

Dazu wurde zunächst sowohl der Glukanasepromotor von *Vitis vinifera* (*VvGL*), als auch der Glukanasepromotor von *Vitis rupestris* (*VrGL*) mit der Luziferase fusioniert und in einen CAMBIA-Vektor ligiert. Dieser ermöglicht mittels *Agrobacterium tumefaciens* embryogene Zellkulturen zu transformieren.

In Zusammenarbeit mit dem Zentrum für grüne Gentechnik (Neustadt a. d. W.) wurden daher embryogene Zellkulturen von *Vitis vinifera* cv. Seyval mit beiden Konstrukten transformiert. Nachdem genügend Zellmaterial zur Verfügung stand, wurde die embryogenen Zellkulturen auf ihre Luziferaseexpression hin untersucht. Die Anwesenheit des Reportergens in den stabil transformierten Zellen wurde durch Applikation der Zellen mit einer Luziferinlösung überprüft. Exprimieren die Zellen das Transgen, kommt es infolge der oxidativen Decarboxylierung des Luziferins durch die Luziferase zur Freisetzung von Photonen. Diese können mit einer CCD-Kamera (Abb. 44) detektiert werden (KOST *et al.*, 1995).

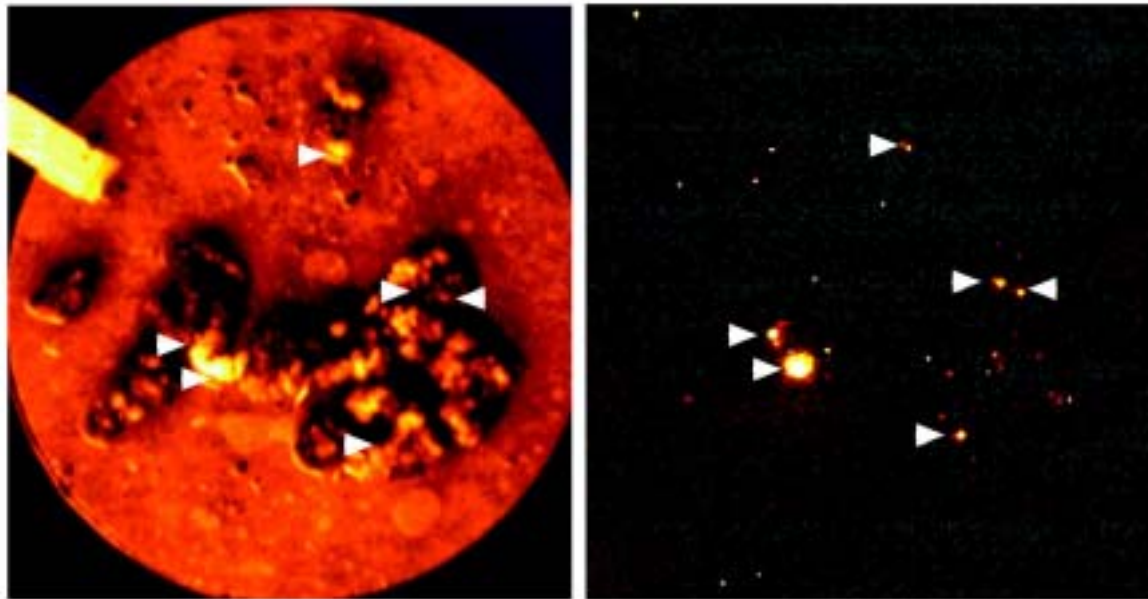


Abb. 44: Screening der embryogenen Zellkultur nach *VvGL/LUC* Linien mit der CCD Kamera. Embryogene Zellkulturen von *Vitis vinifera* cv. Seyval wurden über *Agrobacterium tumefaciens* mit dem *VvGL/LUC* Konstrukt transformiert. Die Zellen wurden mit einer 1 mM Luziferinlösung besprüht und die Luziferaseaktivität mit der CCD Kamera bestimmt. Zur späteren Zuordnung wurden Hellfeldaufnahmen (linkes Bild) der Platten gemacht, bevor die Detektion der Photonen in der lichtdichten Aufnahmekammer (rechtes Bild) erfolgte. Die Pfeile zeigen eine Luziferaseaktivität an.

In Abb. 44 sind positiv transformierte embryogene Zellkulturen von *Vitis vinifera* cv. Seyval zu sehen. Die Embryonen befinden sich in globulärem-, Herz und Torpedo Stadium. Insgesamt sind von *VvGL* 14 positive Embryos isoliert und auf neues Medium übertragen worden, während von *VrGL* 8 positiv transformierte Embryonen isoliert werden konnten.

Das Ziel dieser Experimente ist die Regeneration von transgenen Weinreben, die einen detaillierten Aufschluss über die Aktivierung von *PR*-Genen nach Pathogenbefall oder Elicitierung geben sollen. Untersuchungen, eines durch Hitze induzierbaren Promotors fusioniert mit dem Luziferase-Reporter, zeigten in Tabak die Zunahme der Luziferaseaktivität mit Erhöhung der Temperatur *in planta* (NEUMANN *et al.*, 1997). Gelingt es aus diesen Embryonen Pflanzen zu regenerieren, könnte dies die Möglichkeit bieten den zeitlichen und räumlichen Verlauf der Luziferaseaktivität und somit die Aktivierung von *PR*-Genen nach Inokkulation mit *Plasmopara viticola* oder anderen Pathogenen zu verfolgen.

3.6 Analysen zur Chitinase III

Neben der Charakterisierung der Glukanase (*VGL*) war es von Interesse ein weiteres *PR*-Gen aus *Vitis* zu untersuchen. Da zu einer Chitinase der Klasse III schon Ergebnisse vorlagen (BUSAM *et al.*, 1997), wurden vertiefende Untersuchungen durchgeführt. Insbesondere sollte die Genregulation der Chitinase nach Infektion mit *Plasmopara viticola* in allen 3 *Vitis*-Arten untersucht werden.

3.6.1 Regulation der *VCH* mRNA Akkumulation nach Infektionen durch *Plasmopara viticola*

Northern blot Analysen wurden zusätzlich mit einem weiterem *PR*-Gen (Chitinase der Klasse III, Accessionnummer: AJ291507) aus *Vitis vinifera* cv. Pinot noir durchgeführt. Das Gen wurde in voller Länge durch PCR amplifiziert und in einen Vektor ligiert.

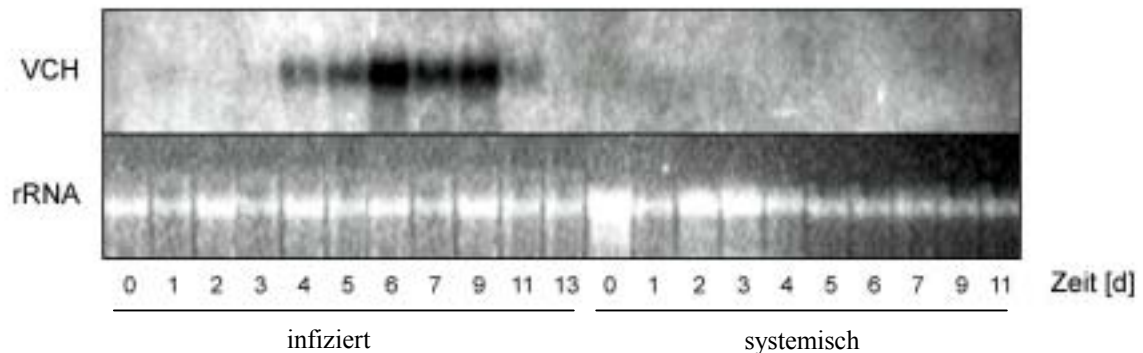


Abb. 45: *Northern blot* Analyse der *VCH* Expression in Blättern von *Vitis vinifera* nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Je ein Blatt einer gesunden *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau Pflanze wurde mit *Plasmopara viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils lokal infizierte Blatt und das erste darüberliegende Blatt wurde in Zeitintervallen nach Infektion geerntet. Je Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der *VCH* Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.

Die *Northern blot* Analysen von *VCH* wiesen in der kompatiblen Interaktion, wie bei *VGL* eine ähnliche Regulation auf. Bedingt durch die allgemein schwächere Ausprägung des *VCH*-Signals wird erst 4 dpi das erste Signal im lokal infizierten Blatt sichtbar. Das Maximum der *VCH*-Transkriptmenge wird wie bei *VGL* am 6. Tag erreicht. Der Transkriptlevel war bis zum 9. Tag erhöht. Über spätere Zeitpunkte konnte keine Aussage gemacht werden, da die Blätter durch das Pathogen stark geschädigt waren. Zu einer Erhöhung des *VCH*-Transkriptlevels in den nicht infizierten systemischen Blättern kommt es nicht, typisch bei kompatiblen Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen (VERNOOIJ *et al.*, 1994; SHULAEV *et al.*, 1995).

Wie sieht der zeitliche Verlauf der *VCH*-Transkriptakkumulation der resistenten Art nach Infektion mit *Plasmopara viticola* aus?

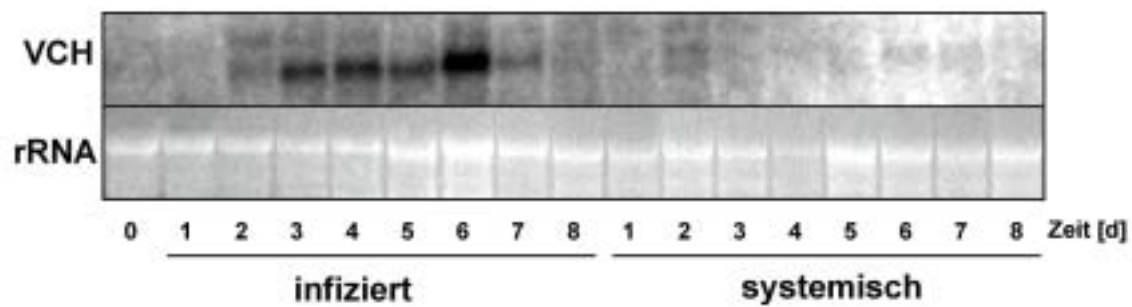


Abb. 46: Northern blot Analyse der VCH Expression in Blättern von *Vitis rupestris* nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Je ein Blatt einer gesunden *Vitis rupestris* Pflanze wurde mit *Plasmopara viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils lokal infizierte Blatt und das erste darüberliegende Blatt wurde in Zeitintervallen nach Infektion geerntet. Je Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der VCH Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.

Die Northern blot Analyse mit der VCH als Sonde zeigte in der inkompatiblen Interaktion im lokal infizierten Blatt bereits 2-3 Tage nach Infektion den Beginn einer VCH-mRNA Akkumulation (Abb. 46). Anschließend kommt es zu einer weiteren Erhöhung der VCH-Transkriptmenge und erreicht ein Maximum nach 6 Tagen. Eine Erhöhung des VCH-Transkriptlevels in den nicht infizierten systemischen Blättern war nicht signifikant.

Wie in Abb. 45 und Abb. 46 gezeigt, scheint die Regulation von PR-Genen in resistenten und anfälligen *Vitis*-Arten ähnlich zu sein. Um einen genaueren kinetischen Verlauf der VCH-mRNA Akkumulation zu erhalten wurden Blätter an Pflanzen der Arten *V. vinifera*, *V. rupestris* und *V. riparia* mit *Plasmopara viticola* infiziert und über einen Zeitraum von 3,5 Tagen in Zeitintervallen von 12 Stunden geerntet.

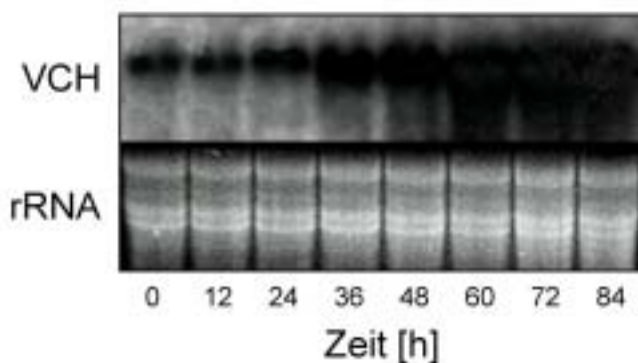


Abb. 47: Northern blot Analyse der VCH-Expression in Blättern von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Je ein Blatt einer gesunden *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau Pflanze wurde mit *Plasmopara viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Je Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der VCH Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.

Die Northern blot Analyse in Abb. 47 zeigte ähnlich wie die VGL Northern blot Analyse (Abb. 14) eine deutliche Zunahme der Transkriptmenge zum Zeitpunkt 36 hpi. Das Maximum der Transkriptakkumulation wird nach 72 Stunden erreicht.

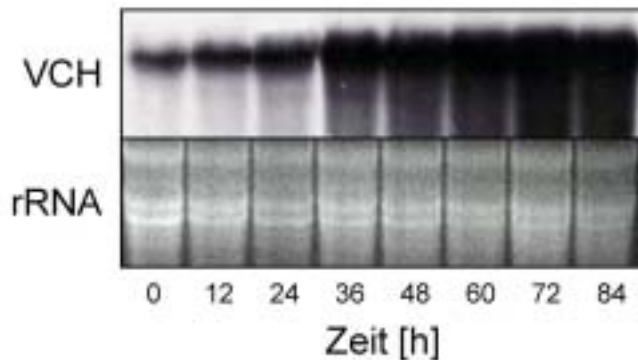


Abb. 48: *Northern blot* Analyse der *VCH* Expression in Blättern von *Vitis rupestris* nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Je ein Blatt einer gesunden *Vitis rupestris* Pflanze wurde mit *Plasmopara viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Je Spur wurden $20 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der *VCH* Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.

Wie in Abb. 48 zu sehen ist, ist die Expression des *VCH*-Transkriptes in *Vitis rupestris* Pflanzen schon 12 hpi leicht erhöht und akkumuliert stetig bis zu dem Zeitpunkt 72 hpi, wo das Maximum der *VCH* mRNA Expression erreicht wird. Die leichte Erhöhung der Transkriptmenge bereits zum Zeitpunkt 12 hpi war bei der *Northern blot* Analyse der *VGL* Transkriptakkumulation nicht zu erkennen (Abb. 15).

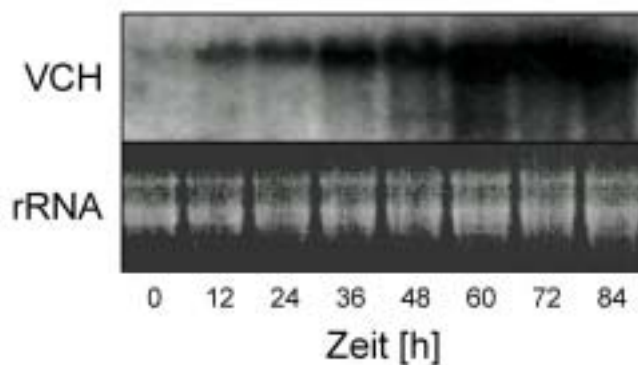


Abb. 49: *Northern blot* Analyse der *VCH* Expression in Blättern von *Vitis riparia* nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Je ein Blatt einer gesunden *Vitis riparia* Pflanze wurde mit *Plasmopara viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Je Spur wurden $20 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der *VCH* Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.

Abb. 49 zeigt die *VCH*-mRNA Akkumulation in hoch resistenten *Vitis riparia* Pflanzen nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Die Kinetik der Transkriptakkumulation bei resistenten Arten unterscheidet sich deutlich wie schon bei den *VGL Northern blot* Analysen gegenüber der anfälligen Art *V. vinifera*. Bereits 12 hpi ist eine Erhöhung der *VCH*-Transkriptmenge zu beobachten, die nach stetigem Anstieg schließlich zu einem Maximum der mRNA-Menge zum Zeitpunkt 72 hpi führt. Dies deutet auf eine frühere „Erkennung“ der *Vitis riparia* Pflanzen gegenüber *Plasmopara viticola* hin, resultierend in einer schnelleren Abwehrreaktion, verglichen mit *Vitis vinifera*.

Bei der kompatiblen Wirt-Pathogen Interaktion, wie sie zwischen *Vitis vinifera* und *Plasmopara viticola* stattfindet sind zwar Abwehrreaktionen des betroffenen Gewebes erkennbar, die jedoch in ihrem zeitlichen Verlauf verzögert sind. Die anfällige *Vitis*-Art, *Vitis*

vinifera, reagiert also erst ca. 36 hpi mit einer Erhöhung der mRNA Akkumulation, während die resistente Art, *Vitis rupestris*, bereits 12 hpi eine Akkumulation des *VCH*-Transkriptes ebenso wie die hoch resistente Art, *Vitis riparia*, zeigt. Die oben dargestellten *Northern blot* Analysen weisen darauf hin, dass der Grad der Resitenzausprägung in Zusammenhang mit dem zeitlichen Muster der *VCH*-mRNA Akkumulation steht. Dies bestätigt Arbeiten an verschiedenen Pflanzen, in denen gezeigt wurde, dass die schnelle und rechtzeitige Induktion von *PR*-Genen notwendig für eine erfolgreiche Abwehr ist (WARD *et al.*, 1991; DONG, 1998).

3.6.2 Isolierung genomischer Sequenzen

Zusätzlich zu den vollständigen cDNA Sequenzen wurden auch die genomischen Sequenzen und der Promotorbereich von *VCH* aus *Vitis vinifera* und *Vitis rupestris* isoliert und sequenziert. Die Promotorsequenzen wurde mit dem Programm *MatInspector* (QUANDT *et al.*, 1995) und *PlantCARE* (LESCOT *et al.*, 2002) analysiert. Beide Promotoren wurden in die Datenbank mit der Accessionnummer AJ430782 (*VvCH-Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau) und AJ430783 (*VrCH-Vitis rupestris*) eingegeben.

3.6.2.1 Vergleich der Sequenzen des *VCH* Promotors aus *Vitis vinifera* und *Vitis rupestris*

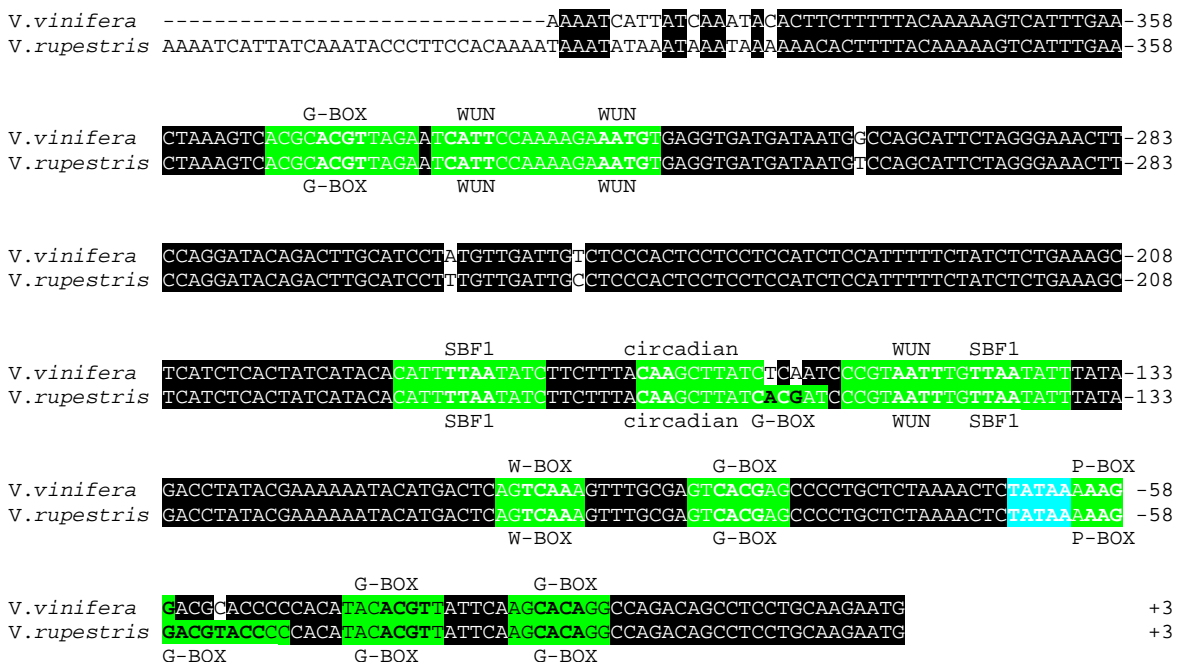


Abb. 50: Sequenzvergleich der Chitinase Promotoren. *Cis*-regulatorische Elemente, die in der Literatur durch die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren charakterisiert sind oder denen eine regulatorische Funktion nachgewiesen wurde, sind grün hervorgehoben. Die *core*-Sequenz der Matrix ist jeweils durch Fettdruck, der mögliche Transkriptionsstart blau hervorgehoben.

Vergleicht man die regulatorischen Einheiten der Chitinase (Abb. 50) mit denen der Glukanase, so finden sich ähnliche *cis*-regulatorische Elemente auf den Sequenzen. Jedoch sind diese Boxen an unterschiedlichen Stellen angeordnet. Beide Promotoren besitzen *cis*-regulatorische Elemente der Typen: SBF-1, G-BOX, circadian, Wun und P-BOX. Während der Promotor der *VrGL* zusätzlich eine BOX-4 und TCA-Boxen aufweist, besitzt der *VCH* Promotor eine W-BOX, die dem Glukanasepromotor fehlt. Die Isolierung der Promotoren gelang im Falle der Chitinasen für eine Länge von 403- bzw. 433 bp. Über das Vorkommen und die Anzahl von *cis*-regulatorischen Elementen die „stromaufwärts“ –433 bp liegen, konnte also kein Vergleich zu den *VGL*-Promotoren angestellt werden. Wie jedoch gezeigt, unterlagen beide Gene (*VGL* und *VCH*) einer sehr ähnlichen Regulation nach Pathogenbefall.

Beim Vergleich der *VCH*-Promotoren beider *Vitis*-Arten fällt zunächst die hohe Homologie ins Auge (98%ige Homologie). Bis auf die G-Box bei -155 bei *Vitis rupestris*, besitzen beide Promotoren eine identische Zusammensetzung der potentiellen *cis*-regulatorischen Elemente. In den Chitinasepromotoren befindet sich bei -95 eine W-Box, die bei den Glukanasepromotoren nicht auftrat. W-Boxen werden von Proteinen der WRKY-Familie gebunden. Analysen eines Chitinasepromotors aus Tabak zeigte, dass dieses Element ausreicht, um nach Elicitorbehandlung das Gen zu aktivieren (FUKUDA *et al.*, 1994). Das als W-Box bezeichnete Sequenzelement wurde erstmals in den Promotoren der *PRI-1* und *PRI-2* Gene aus Petersilie charakterisiert. Über die Bindung an dieses Elements konnte die Familie der WRKY Transkriptionsfaktoren isoliert werden (RUSHTON *et al.*, 1996, EULGEM *et al.*, 2000).

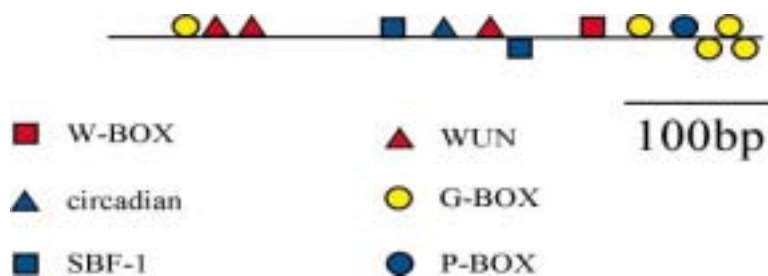


Abb. 51: Anordnung putativer *cis*-regulatorischer Elemente innerhalb des –433 *VCH* Promotors. Spezifische *cis*-regulatorische Elemente sind durch farbige Symbole repräsentiert.

3.7 Untersuchungen zu elicitorvermittelten Protonenflüsse in *Vitis*-Zellkulturen

Eine Gruppe von gram-negativen phytopathogenen Bakterien, wie *Erwinia*, *Pseudomonas* und *Xanthomonas* exprimieren und sekretieren Proteine, die Harpin (*Hrp-hypersensitive response and pathogenicity*) bezeichnet werden. Die Harpin-Genfamilie umfasst eine Viel-

zahl von Proteinen, die über den Typ III-Sekretionsapparat aus der Bakterien-Zelle transportiert werden. Nach aktuellem Wissensstand binden Harpin-Proteine an entsprechende *R*-Gene und lösen dadurch eine Signalkaskade aus (WEI *et al.*, 1992; WEI und BEER, 1996; KIM *et al.*, 1998). Desweiteren kann es Trimere bilden, welche sich als Ionophor in die Zellmembran einlagern können (LEE *et al.*, 2001). Sie sind essentiell für die Pathogenität der Bakterien auf Wirtspflanzen und ebenso für die Auslösung der HR bei Nichtwirtspflanzen bzw. resistenten Pflanzen. Um einen Elicitor der *Hrp*-Familie in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben, wurde ein Harpin-Protein aus *Pseudomonas* rekombinant exprimiert (s. Anhang 6.1).

3.7.1 pH-Wert Bestimmung in der *Vitis rupestris* Zellkultur nach Gabe von pep 13 und *HrpZ*

Am Beginn des Signaltransduktionswegs der pflanzlichen Abwehr bei inkompatiblen Wirt-Pathogen Interaktionen (Abb. 3) steht die Erkennung eines Elicitors an einem spezifischen Rezeptor. Bereits kurze Zeit nach Kontakt einer Zelle mit dem Elicitor werden Ionenkanäle in der Membran geöffnet. Dies führt unter anderem zu einem Einstrom von Protonen in die Zelle und damit bei Zellkulturen zu einer Alkalisierung des Mediums. In Vorversuchen wurde untersucht, in welcher Phase die *Vitis rupestris* Zellkultur mit der maximalen Reaktion auf den Reiz reagiert. Das Ende der logarithmischen Wachstumphase erwies sich für diese Messungen als optimal.

In Abb. 52 ist die pH-Wert Änderung im Medium der *Vitis*-Zellkultur nach Zugabe von Elicitoren beispielhaft gezeigt. Als Elicitor wurde pep 13 und Harpin (*HrpZ*), die bereits in anderen Systemen charakterisiert wurden (WEI *et al.*, 1992; NÜRNBERGER *et al.*, 1994), eingesetzt.

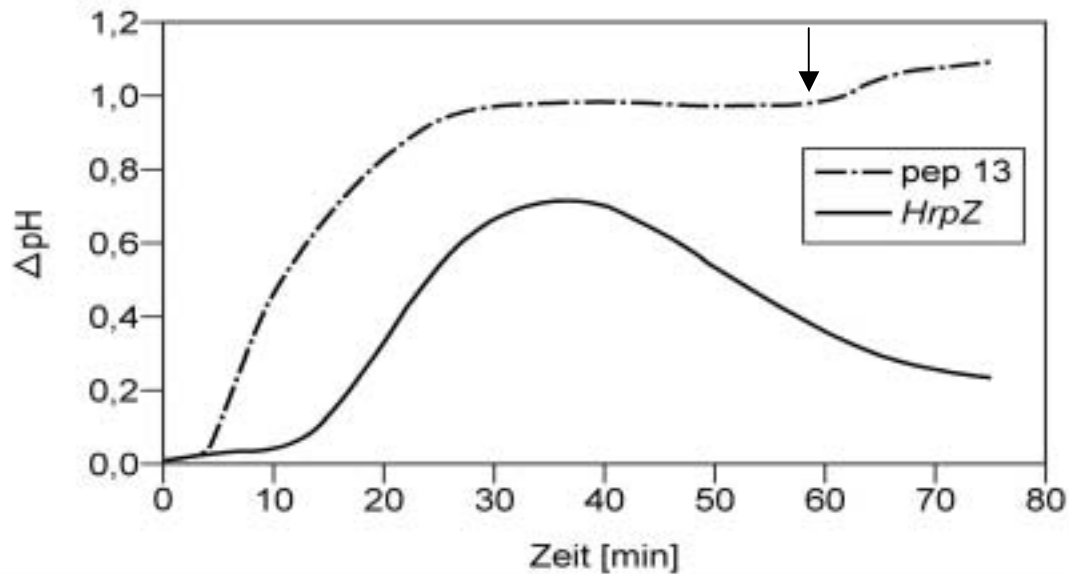


Abb. 52: *pH-Shift* im Medium von *Vitis rupestris* Zellkulturen nach Elicitierung mit einem Harpin Protein (*HrpZ*) bzw. pep 13. *HrpZ* bzw. pep 13 wurde in einer Endkonzentration von 100 nM eingesetzt und die Änderung des pH-Wertes wurde über einen Zeitraum von 75 min verfolgt.

Wie in Abb. 52 zu sehen ist, bewirken beide Elicitoren eine Alkalisierung des Mediums, jedoch sieht der Kurvenverlauf unterschiedlich aus. Bereits 3 min nach Gabe von pep 13 ist ein deutlicher pH-Anstieg zu registrieren, der nach 25 min sein Maximum erreicht. Der pH-Wert bleibt im weiteren Verlauf unverändert. Um die Theorie einer Sättigung der Elicitor-Rezeptor-Bindung zu überprüfen, wurde nach der erstmaligen Gabe von 100 nM pep 13 und nach Abwarten des Maximums der Kurve erneut pep 13 in 10-fach höher Konzentration (1 μ M) appliziert (markiert mit Pfeil). Dabei konnte eine nur noch sehr schwach ausgeprägte Reaktion festgestellt werden. Beim pep 13 verändert sich der pH-Wert des Mediums um eine ganze pH-Einheit, welches einem Protonenfluss von $2,7 \times 10^6$ Protonen in dem Volumen von 5 ml gleichkommt. Eine Alkalisierung des Mediums findet nach Gabe von *HrpZ* erst nach ca. 13 min statt. Das Maximum wird nach ca. 35 min erreicht und fällt im Unterschied zu pep 13 nach ca. 10 min wieder ab.

Bisher konnte pep 13 nur in wenigen Zellsuspensionskulturen wie bei Petersilie, Kartoffel und Soja ähnliche Reaktionen auslösen (THORSTEN NÜRNBERGER, persönliche Mitteilung). Dieses Experiment zeigt, dass der pep 13 Elicitor auch in *Vitis rupestris* Zellkulturen zu einem *pH-shift* führt. *HrpZ* führt hingegen in sehr vielen Zellkulturen zur Öffnung von Ionenkanälen und somit zu einer Alkalisierung des Mediums.

3.8 Untersuchungen von Resistenzinduktoren an Blattscheiben von *Vitis vinifera* gegen *Plasmopara viticola*

Induzierte Resistenz beruht auf einer Veränderung des Pflanzenstoffwechsels, ausgelöst durch Induktoren, die sowohl biologischer als auch chemischer Natur sein können. Im

folgenden wurden Blattscheiben von *Vitis vinifera* mit möglichen Resistenzinduktoren behandelt und 24 Stunden später mit *Plasmopara viticola* infiziert. Mit den eingesetzten Konzentrationen dieser Resistenzinduktoren wurde keine direkte pflanzenschädigende Wirkung beobachtet, so dass eine eintretende Befallsreduktion nicht auf eine direkte Folge von Pflanzenschäden zurückgeführt werden kann.

Im Vorfeld wurden die eingesetzten Substanzen zunächst auf ihr Potential hin untersucht, *PR*-Gene in *Vitis*, zu induzieren. Dieses wurde durch Luziferaseexpressionskinetiken der *VrGL/LUC* Linie durchgeführt.

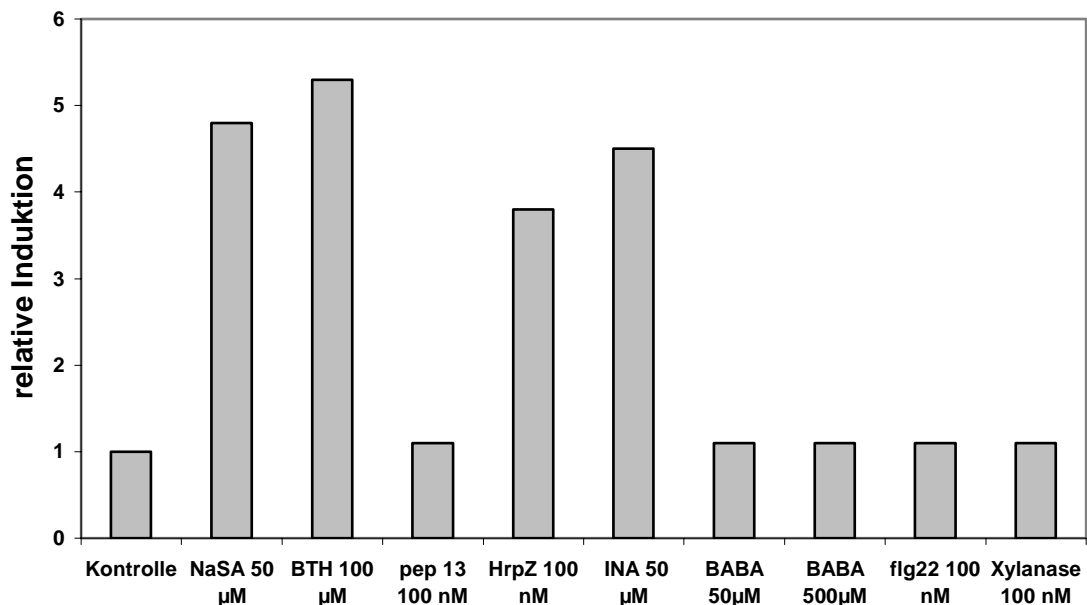


Abb. 53: Luziferaseexpression der *VrGL/LUC* Linie nach Stimulation verschiedener putativen Resistenzinduktoren. Zur Ermittlung der relativen Induktion wurde das Integral aus den Mittelwerten der Induktionskinetiken gebildet und mit der Grundexpression, der mit Wasser behandelten Kontrolle, in Bezug gesetzt.

Die Stimulation durch NaSA führte, ebenso wie BTH und INA, zu einer deutlichen Zunahme der Luziferaseaktivität. Auch *HrpZ* steigerte die Luziferaseaktivität um das 3,9-fache. BABA in unterschiedlichen Konzentrationen konnte, wie auch flg22, pep 13 und Xylanase, die Luziferaseaktivität im Vergleich zu der mit Wasser behandelten Kontrolle nicht steigern. In allen durchgeführten Luziferaseexpressionsstudien führte die Gabe von BTH immer zu der stärksten Luziferaseaktivität.

Eine Erhöhung der *VGL*-mRNA konnte weder in der *Vitis rupestris* Zellkultur noch in Gewächshauspflanzen nach BABA-Applikation durch *Northern blot* Analysen detektiert werden.

In Abb. 54 wurde die Resistenzinduktion einer Auswahl der oben eingesetzten Substanzen in Blattscheibentests überprüft. Dazu wurden Blattscheiben von *Vitis vinifera* ausgestanzt

und 24 Stunden auf den entsprechenden Lösungen inkubiert. Anschließend wurde mit *Plasmopara viticola* infiziert. Die Bonitur der Blattscheiben erfolgte 5 Tage nach der Infektion.

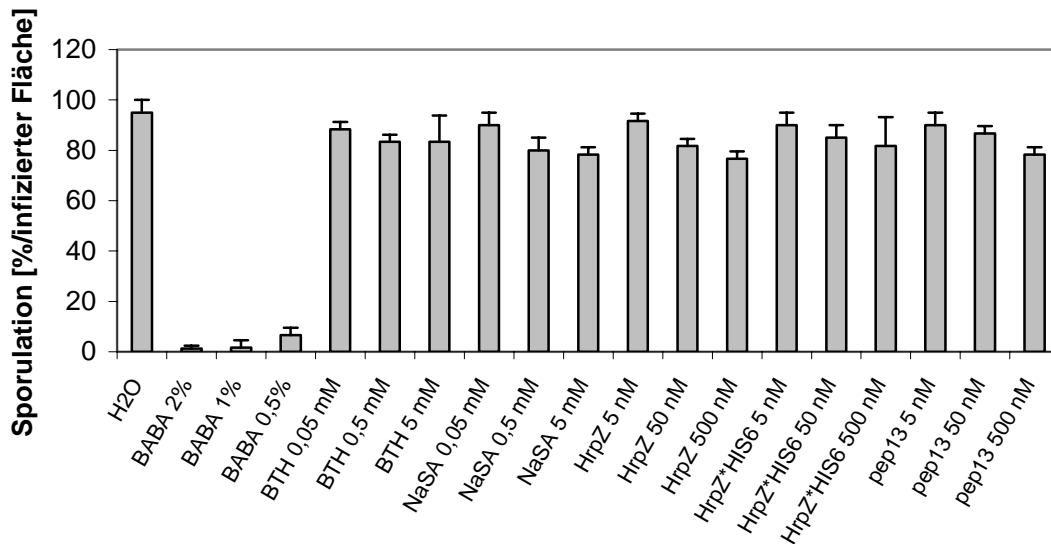


Abb. 54: Durchschnittliche prozentuale Sporulation auf Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Applikation verschiedener Substanzen und anschließender Inokulation mit *P. viticola*. Jeweils 6 Blattscheiben wurden auf Lösungen mit den unterschiedlichen Resistenzinduktoren inkubiert. 24 Stunden später wurde mit einer Sporangiensuspension von *P. viticola* (5×10^4 /ml) inokuliert. Die Bonitur erfolgte nach 5 dpi unter einem Binokular. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 Blattscheibenbonituren mit Standardabweichung.

Abb. 54 zeigt die resistenzinduzierende Wirkung von BABA. Bei allen getesteten Konzentrationen konnte eine Sporulation auf weniger als 10 % der infizierten Fläche erhalten werden. BABA-Konzentrationen von 1- bzw. 2 % führte zu einer nahezu kompletten Hemmung der Ausbildung von Sporangienträger. Alle übrigen getesteten Substanzen zeigten in diesem Versuchsansatz keine signifikante Reduktion der sporulierenden Fläche.

Um Einblicke in die Wirkungsweise von BABA bei der Ausbildung der Resistenz von *Vitis vinifera* gegenüber *Plasmopara viticola* zu gewinnen wurden zunächst Untersuchungen an Gewächshauspflanzen durchgeführt.

3.8.1 Resistenzinduktion durch β -Aminobuttersäure (BABA) an Gewächshauspflanzen von *Vitis vinifera*

Ebenso wie die SA-homologen Substanzen weist BABA keine direkte antimikrobielle Wirkung gegen verschiedene pilzliche Pathogene auf, wenn diese auf künstlichen Medien gezogen werden (COHEN *et al.*, 1999). Der BABA-induzierte Abwehrmechanismus gegenüber einer Oomyceten-Infektion ist bei *Arabidopsis* mit der Bildung von Kalloosedepositionen an Stellen der Haustorienbildung verknüpft (ZIMMERLI *et al.*, 2000).

Um die Wirksamkeit von BABA nach Blattapplikation bei *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau zu testen wurden für verschiedene Konzentrationen (0, 250, 500, 1000 mg/l) je 3 Topfpflanzen mit je 17-24 Blättern und 2-3 Geiztrieben eingesetzt. Die Spritzung erfolgte unter definierten Druck- und Mengenverhältnissen mit einer Laborapplikationsanlage (Schachtner, Ludwigsburg). 24 Stunden nach der Applikation erfolgte die Infektion durch Besprühen mit einer *Plasmopara viticola*-Sporangiensuspension (5×10^4 /ml). Die Bonitur erfolgte so, dass die befallene Fläche jedes einzelnen Blattes bestimmt wurde (Abb. 55).

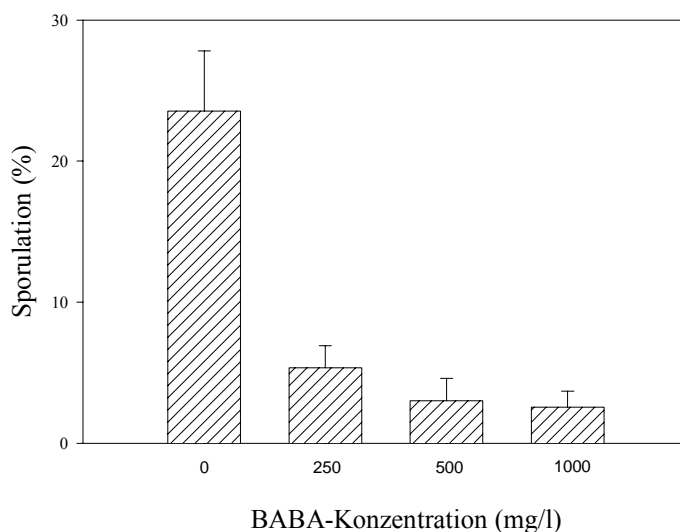


Abb. 55: Durchschnittliche prozentuale Sporulation auf der Blattgesamtfläche von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Applikation verschieden-er BABA Konzentrationen und anschließender Inokulation mit *Plasmopara viticola*. Bonitiert wurde die Sporulation auf der Blattgesamtfläche von jeweils 3 Pflanzen. Der Standardfehler aus der Bonitur von 52- (0 mg/l), 58- (250 mg/l), 54- (500 mg/l) bzw. 61 Blättern (1000 mg/l) ist angegeben

Die BABA-Behandlung erbrachte innerhalb der gewählten Konzentration eine Reduktion der Sporulation auf bis fast 1/10 des Kontrollwertes. Abb. 55 zeigt die Ausbildung einer Resistenz von *Vitis vinifera* Gewächshauspflanzen gegenüber *Plasmopara viticola*. Durch Erhöhung der BABA Konzentration auf 2 g/l kann dieser Effekt zusätzlich gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). Wird BABA gegossen und somit über die Wurzel aufgenommen, kann man die Konzentration deutlich erniedrigen. Bereits bei einer Konzentration von 50 mg/l führt dies zu einer Sporulationshemmung von über 90 % (Daten nicht gezeigt).

3.8.2 Resistenzinduktion durch β -Aminobuttersäure (BABA) an *Vitis vinifera* Freilandpflanzen

Im Rahmen einer Mittelprüfung wurde BABA (0,2 %) in einer Rebanlage im Freiland getestet. Die Firma Makteshim Chemical Works (Beer-Sheva, Israel) stellte zu Versuchszwecken 500 g D,L- BABA zur Verfügung. Dazu wurden 16 Pflanzen *Vitis vinifera* cv. *Pinot noir* zu 7 Zeitpunkten während der Vegetationsperiode behandelt. Die Applikationszeitpunkte wurden nach dem Freiburger Prognosemodell errechnet (BLEYER und HUBER, 1996). Zusätzlich wurden in der Rebanlage künstliche Infektionen gesetzt (ein Blatt an jedem 4. Rebstock). Die Bonituren erfolgten Anfang Juli und Ende August an 150 Blättern.

Zum Vergleich der Wirksamkeit wurden Parzellen mit einem organisch-chemischen Pesti- zid (Aktuan), welches im konventionellen Weinbau eingesetzt wird, sowie mit Kupfer, welches im ökologischen Weinbau Anwendung findet, behandelt. Als Kontrolle wurde eine Parzelle nicht gegen *Plasmopara viticola* behandelt.

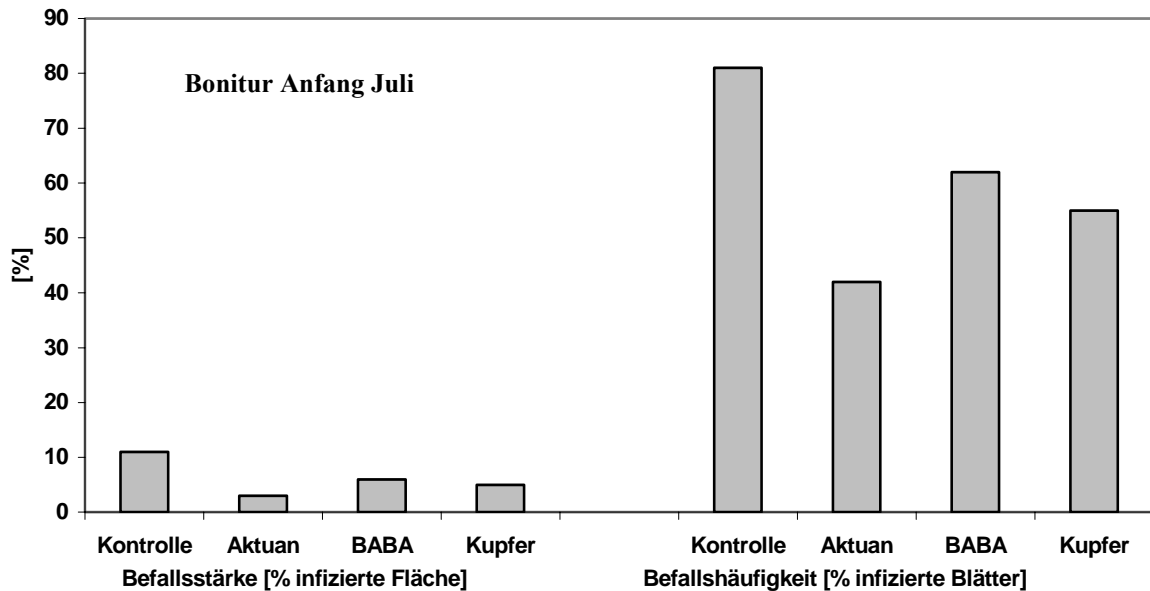


Abb. 56: Vergleich der Befallsstärke- und Befallshäufigkeit von *Plasmopara viticola* an Blättern von *Vitis vinifera* cv. *Pinot noir*. 7 Applikationen von BABA, Aktuan oder Kupfer wurden durchge- führt. Die Bonitur erfolgte Anfang Juli. Da der rel. Fehler unter 2 % lag wurde auf Fehlerbalken verzichtet. Erklärungen siehe Text.

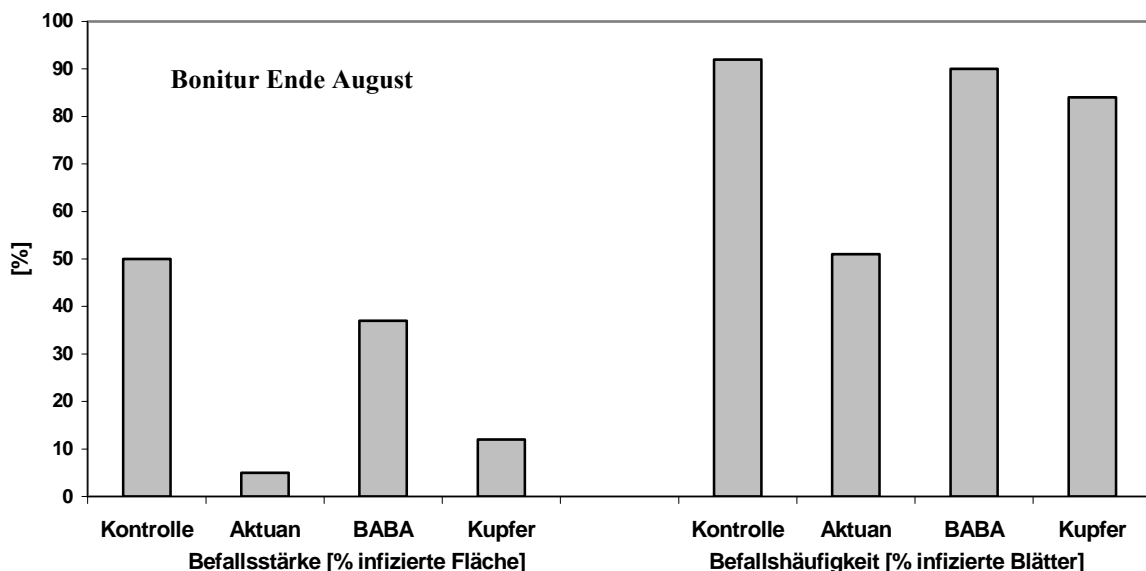


Abb. 57: Vergleich der Befallsstärke- und Befallshäufigkeit von *Plasmopara viticola* an Blättern von *Vitis vinifera* cv. *Pinot noir*. 7 Applikationen von BABA, Aktuan oder Kupfer wurden durchge- führt. Die Bonitur erfolgte Ende August. Da der rel. Fehler unter 2 % lag wurde auf Fehlerbalken verzichtet Erklärungen siehe Text.

Aus Abb. 56 ist zu erkennen, dass Anfang Juli trotz nur geringer Befallsstärke (prozentuale Anzahl befallener Blätter), die Befallshäufigkeit (% befallene Blattfläche) hohe Werte aufweist. Dies führte innerhalb zweier Monate auch zu einer starken Erhöhung der Befallsstärke. Während jedoch Aktuan-Applikationen beim Blattbefall eine weitgehende Reduktion erbrachten (Abb. 57) und auch die Kupferformulierung eine Wirkung zeigte, erbrachte die BABA-Behandlung nur vergleichsweise geringe Effekte. Im Vergleich zur Wirkung von BABA an Blattscheiben und Gewächshauspflanzen ist die Wirkung im Weinberg nur unbefriedigend.

Wie in Abb. 53 gezeigt wurde, bewirkt eine Stimulierung durch BABA keine *PR*-Gen Expression in der *VrGL/LUC*-Linie. *Northern blot* Analysen zeigten in *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau- und *Vitis rupestris* Gewächshauspflanzen keine Induktion der *VGL*-mRNA (Daten nicht gezeigt). Ebenso wenig führt eine BABA-Applikation in *Vitis* Zellsuspensionskulturen weder zu einer Alkalisierung des Mediums, noch zu einer H₂O₂ Produktion (SILKE LACHMANN, persönliche Mitteilung).

3.8.3 Einfluss von BABA auf das interzelluläre Wachstum von *Plasmopara viticola* und Zellwandveränderungen von *Vitis vinifera*

Werden hoch anfällige Sorten der Art *Vitis vinifera* durch *Plasmopara viticola* befallen, so kommt es ca. 2 Tagen der Infektion zu einer Bildung von Haustorien, durch die dieser Oomycet seine Nährstoffe bezieht (ARENS, 1927; RIEMANN, Diplomarbeit 2000). *Plasmopara viticola* wächst interzellulär und bildet ein weit verzweigtes Netzwerk von Hyphen. Stoßen diese Hyphen auf dickere Zellwände, wie etwa Zellwände von Interkostalfeldern, können diese nicht durchwachsen werden, das Mycel bleibt auf die Interkostalfelder begrenzt.

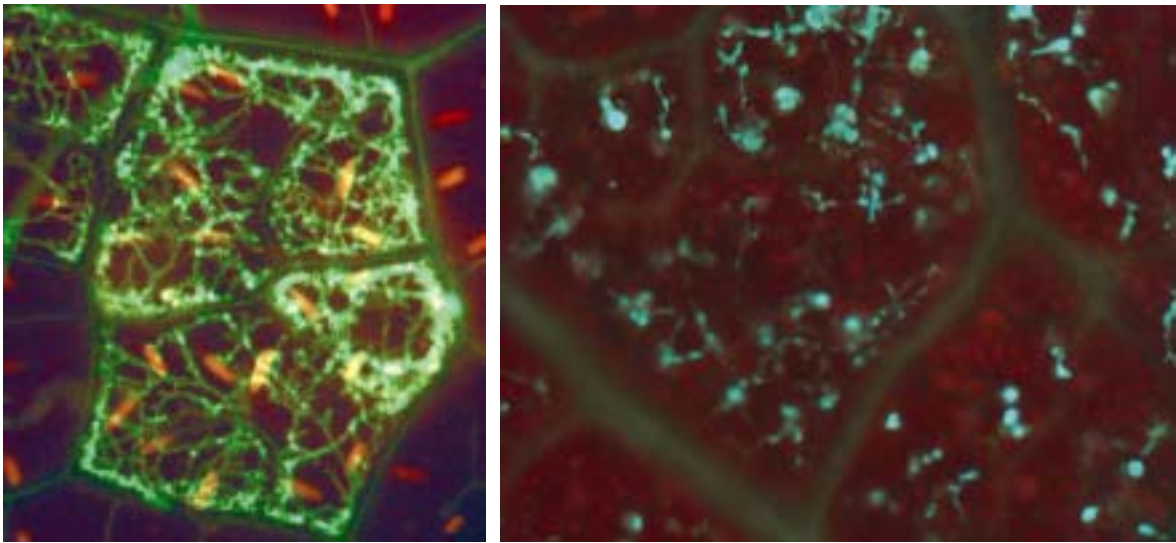


Abb. 58: Mycelentwicklung von *Plasmopara viticola* 5 dpi im Interzellularraum infizierter Blattscheiben mit- und ohne BABA Behandlung. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden auf BABA Lösungen 0,2 % und Wasser inkubiert. Nach Entfärbung des Gewebes wurde mit basischem Anilinblau gefärbt. Das linke Bild zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit Wasser behandelten Kontrolle, das rechte Bild zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der BABA behandelten Blattscheiben.

Abb. 58 zeigt im linken Bild eine völlig mit Mycel durchwachsendes Interkostalfeld von *Vitis vinifera* 5 Tage nach Infektion durch *Plasmopara viticola*. Im rechten Bild ist eine deutliche Hemmung des Mycelwachstums zu erkennen. Diese Blattscheibe wurde 24 Stunden zuvor auf einer BABA (0,2 %) Lösung inkubiert. Es scheint als ob das Wachstum der Hyphen stoppt und so eine weitere Ausbreitung des Pathogens im Blattgewebe verhindert wird.

Abb. 59 zeigt die Mycelentwicklung von *Plasmopara viticola* an Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau, die mit BABA bzw. H₂O inkubiert wurden. Während 1 dpi noch kein Unterschied zwischen BABA behandeltem- und unbehandeltem Gewebe zu erkennen ist, ist nach 2 dpi ein erster Effekt zu erkennen. Während bei den mit H₂O behandelten Blattscheiben bereits die Bildung eines lockeren Mycels stattfindet, ist nach BABA-Applikation die Pathogen Ausbreitung offenbar reduziert. Die Bereiche ohne Mycel bleiben größer und es sind lediglich einzelne Hyphen zu beobachten. Zur Bildung eines lockeren Mycels kommt es 2 dpi in den BABA-inkubierten Blattscheiben nicht. 3 dpi ist bereits 40 % der infizierten Blattfläche in den Kontrollen mit Mycel durchwachsen, während die Blattscheiben nach BABA-Applikation nur bei ca. 10 % der Fläche vereinzelt Hyphen aufweisen. Mehr als die Bildung vereinzelter Hyphen ist bei den BABA behandelten Blattscheiben auch nach 4- bzw. 5 dpi nicht zu beobachten. Die Fläche, in der Gewebe des Pathogens nachgewiesen werden konnte, liegt nach 4 dpi bei maximal 15 %. Anders in den

Kontrollen, hier beträgt der Anteil an dichtem Mycel 4 dpi bereits 70 % und steigert sich zu sehr dichtem Mycel auf 90 % am fünften Tag nach Inokulation. Die Hemmung des Mycelwachstum nach BABA-Applikation ist deutlich gezeigt.

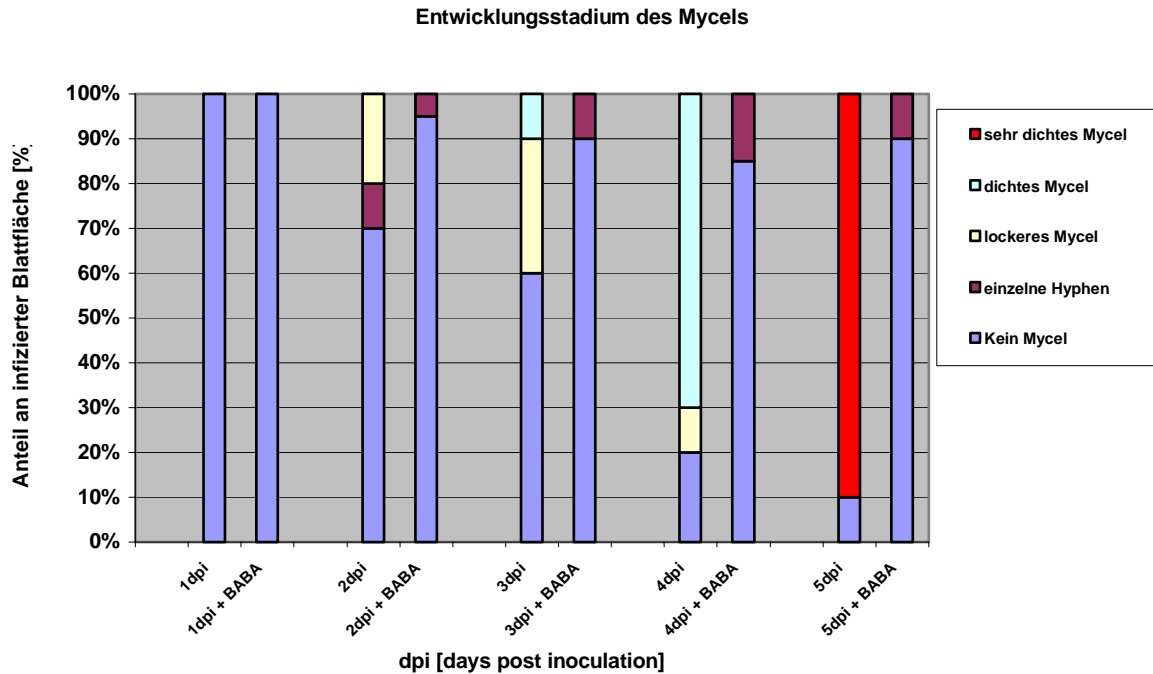


Abb. 59: Vergleich des interzellulären Mycelwachstums von *P. viticola* nach BABA-, bzw. H₂O Applikation. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden auf 0,2 %iger BABA Lösung oder H₂O inkubiert. Anschließend wurde mit *P. viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml⁻¹) infiziert, das Mycelwachstum 1-5 dpi unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Anilinblau-Färbung ausgewertet und in Bezug zu der infizierten Blattfläche gesetzt. Dargestellt sind Werte aus 3 unabhängigen Parallel-Ansätzen.

Die nachfolgenden Experimente und TEM-Analysen sollen Aufschluss über die Wirkungsweise dieser Resistenzbildung nach BABA-Applikation geben. TEM-Aufnahmen von Blattscheiben aus *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach H₂O Inkubation (Kontrolle) und nach BABA (0,2 %) Inkubation wurden in Zusammenarbeit mit Volker Speth durchgeführt.

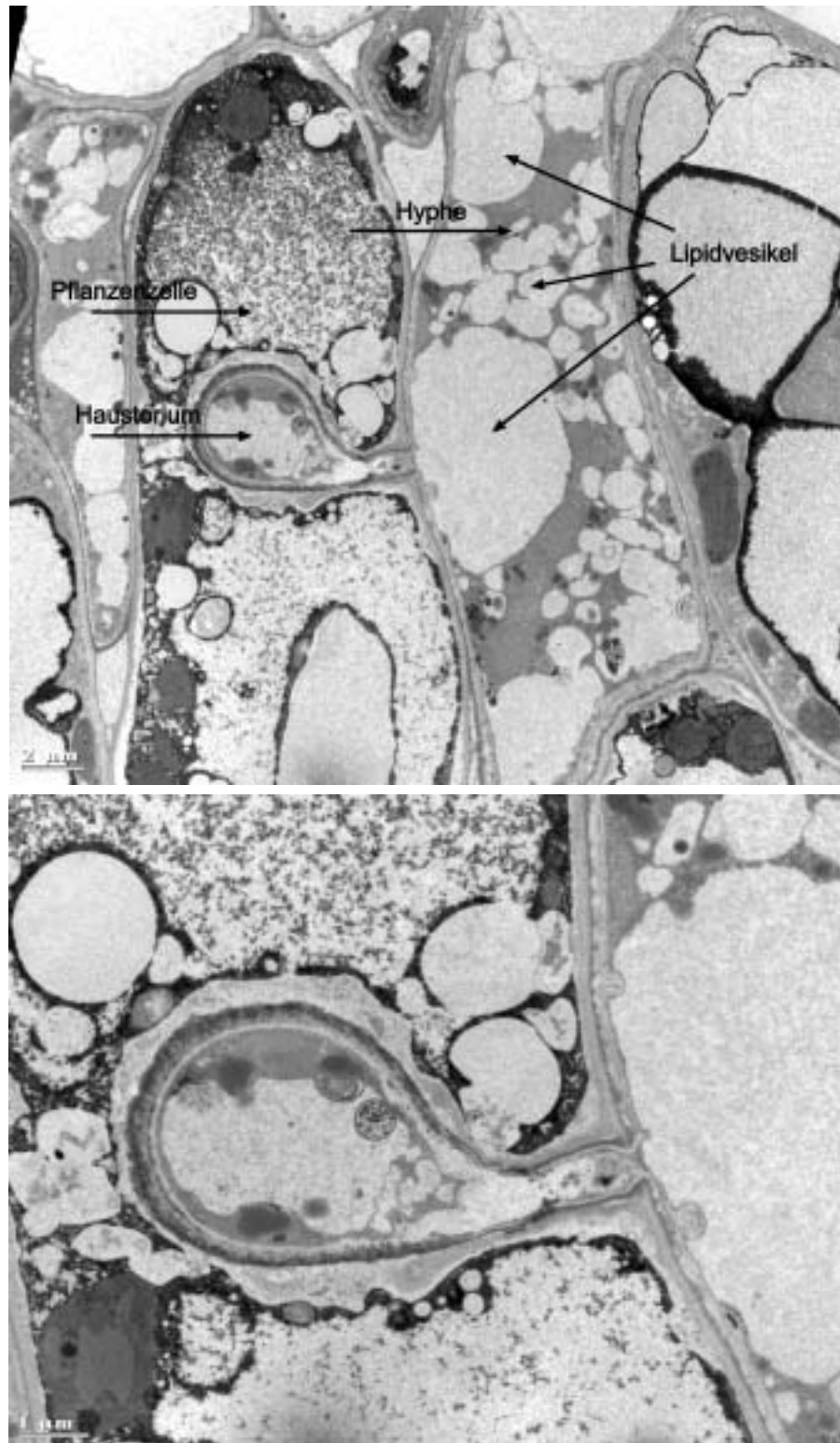


Abb. 60: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM)-Aufnahme von Blattgewebe aus *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Infektion durch *Plasmopara viticola* 5dpi. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden mit *Plasmopara viticola* (5×10^4 Sporen ml^{-1}) infiziert. Nach 5 Tagen wurden diese Proben evaporiert und in Glutaraldehyd fixiert. Das obere Bild zeigt eine Pflanzenzelle, die von einem Haustorium penetriert wurde. Das untere Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt.

Vitis vinifera besitzt keine Möglichkeit Infektionen von *Plasmopara viticola* abzuwehren. Das Pathogen dringt in das Blattgewebe ein, wächst interzellulär und penetriert die Zellen mit Haustorien. In Abb. 60 ist eine solche Penetration einer Zelle durch ein Haustorium dargestellt.

Die Behandlung der Blattscheiben mit BABA führt zu einer Resistenz gegenüber *Plasmopara viticola*. Um eine Auswirkung der BABA-Applikation auf eine möglicherweise veränderte Haustorienbildung nachzuweisen, wurden Blattscheiben zunächst auf einer 0,2 %igen BABA-Lösung inkubiert und 24 Stunden später mit *Plasmopara viticola* infiziert. 5 dpi wurden die Proben zu TEM-Analysen aufgearbeitet.

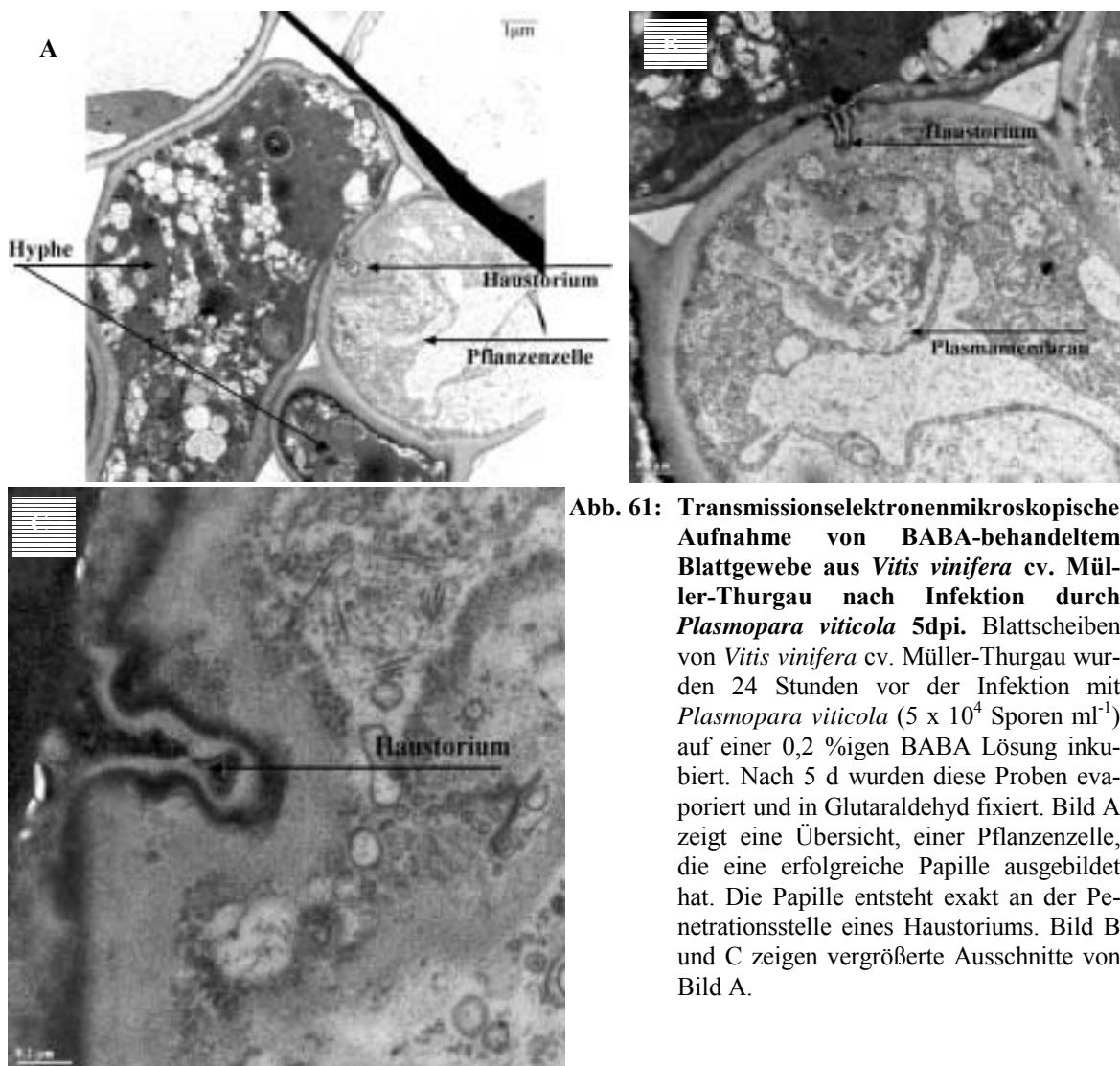


Abb. 61: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von BABA-behandeltem Blattgewebe aus *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Infektion durch *Plasmopara viticola* 5dpi. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden 24 Stunden vor der Infektion mit *Plasmopara viticola* (5×10^4 Sporen ml^{-1}) auf einer 0,2 %igen BABA Lösung inkubiert. Nach 5 d wurden diese Proben evaporiert und in Glutaraldehyd fixiert. Bild A zeigt eine Übersicht, einer Pflanzenzelle, die eine erfolgreiche Papille ausgebildet hat. Die Papille entsteht exakt an der Penetrationsstelle eines Haustoriums. Bild B und C zeigen vergrößerte Ausschnitte von Bild A.

Abb. 61 zeigt die erfolgreiche Abwehr der Penetration eines Haustoriums von *Plasmopara viticola* nach einer 24-stündigen Vorbehandlung der Blattscheiben mit BABA (0,2 %). Genau an der Stelle, an der das Haustorium versucht die pflanzliche Zelle zu penetrieren, bildet sich eine Papille aus. Die Plasmamembran ist weit in das Zellinnere verlagert. Es kommt zur Anlagerung von Zellwandbestandteilen, eventuell Kallose und Lignin. Das obligat biotrophe Pathogen kann die Zelle nicht erfolgreich penetrieren und verliert so seine Nahrungsgrundlage. Vergleicht man die Kontrastierung der Hyphen von *Plasmopara viticola* aus Abb. 60 und Abb. 61, so wird deutlich, dass die Pigmentierung von *Plasmopara viticola* sich äußerst unterschiedlich darstellt. Die Hyphen sind bei einer normalen Entwicklung, vermutlich durch Lipidvesikel, stark weiß gefärbt, während sie unter einer Mangelernährung lediglich kleine Lipidvesikel aufweisen. Bei Tomatenpflanzen wurden ähnliche morphologische Veränderungen des Mycel bzw. der Haustorien von *Phytophthora infestans* nach BABA-Applikation beobachtet (JEUN und BUCHENNAUER, 2001).

Die erfolgreiche Papillenbildung ist jedoch nicht der einzige Abwehrmechanismus der BABA behandelten Pflanzen gegen Infektionen durch *Plasmopara viticola*. Vielen Zoosporen werden durch die Ausbildung einer HR (hypersensitiven Reaktion) schon frühzeitig ihrer Nahrungsgrundlage entzogen. Es scheint, als ob eine BABA-Applikation eine kompatible Wirt-Pathogen Interaktion in eine inkompatible Interaktion wandelt. Abb. 62 zeigt eine mit BABA behandelte Pflanze von *Vitis vinifera* 10 dpi durch *Plasmopara viticola*. An den Infektionsstellen sind deutlich lokale Nekrosen erkennbar. Eine ähnliche Reaktion wurde auch nach einer BABA-Applikation von *Arabidopsis thaliana* festgestellt, die mit virulenten Pseudomonaden infiziert wurden (ZIMMERLI *et al.*, 2000).



Abb. 62: Blatt von *Vitis vinifera* nach BABA Applikation 10 dpi durch *Plasmopara viticola*. Eine *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau Pflanze wurde mit einer BABA Lösung (50 mg/l) gegossen und 2 Tage später mit *Plasmopara viticola* (5×10^4 Sporen ml^{-1}) infiziert. Nekrosen sind an den braunen Stellen des Blattes deutlich zu erkennen.

Die Bildung von Nekrosen, kann man makroskopisch frühestens nach ca. 5 Tagen klar erkennen. Um Einblicke in frühere Stadien dieser Abwehrreaktion zu erhalten, wurden Blattscheiben auf einer 0,2 % igen BABA Lösung inkubiert, mit *Plasmopara viticola* infiziert und unter dem Mikroskop analysiert.

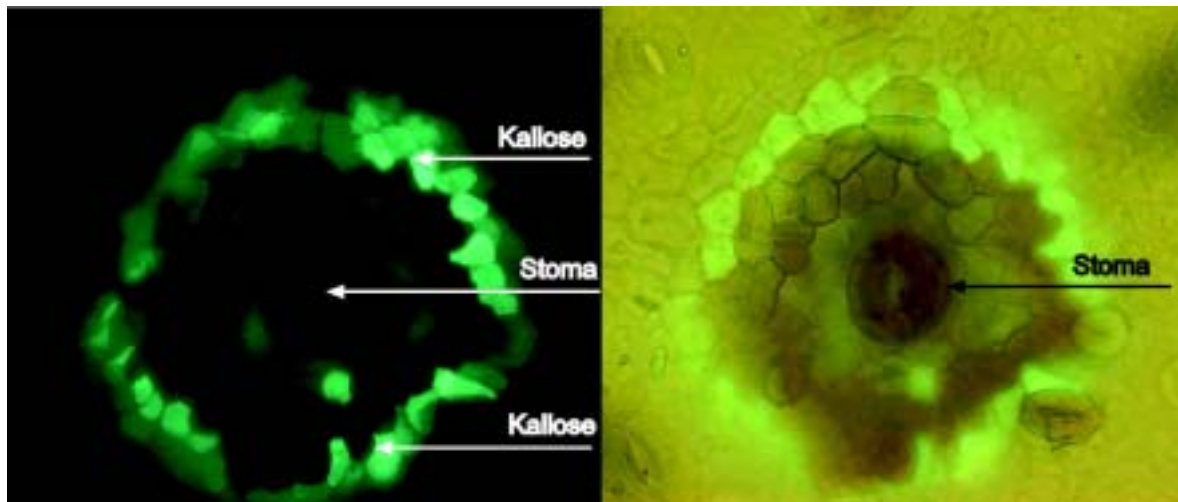


Abb. 63: Mikroskopische Aufnahme von BABA behandelten *Vitis vinifera* Blattscheiben nach Infektion durch *Plasmopara viticola*. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden 24 Stunden vor der Infektion mit *Plasmopara viticola* (5×10^4 Sporen ml^{-1}) auf einer 0,2 %igen BABA Lösung inkubiert. Die Bilder zeigen einen identischen Bildausschnitt. Das linke Bild zeigt eine Aufnahme unter UV-Anregung, während das rechte Bild eine Überlagerung der Hellfeld Aufnahme mit der Fluoreszenz-Aufnahme darstellt. Die Proben wurden mit basischem Anilinblau gefärbt.

Abb. 63 zeigt die mikroskopische Auswertung von Blattscheiben 5 Tage nach Infektion mit *Plasmopara viticola*. Die toten Zellen sind kreisförmig von Zellen umgeben, die eine starke Kallosebildung aufweisen, erkennbar an einer starken Fluoreszenz unter UV-Anregung und basischer Anilinblaufärbung. Solche Reaktionen wurden ausschließlich bei anfälligen Reben beobachtet, bei denen eine BABA-Applikation der Infektion vorausging. Die Bildung von Kallose und die damit zusammenhängende Verstärkung von Zellwänden, sollte weiter untersucht werden, dabei stand der mögliche Einfluss von BABA auf die Regulation einer Kallozesynthese im Vordergrund.

3.8.4 Identifizierung eines Kallozesynthese- cDNA-Fragmentes aus *Vitis vinifera*

Bei der Resistenzausbildung verschiedener Pflanzen nach BABA-Applikation ist die Bildung sogenannter Papillen ein möglicher Abwehrmechanismus (COHEN, 1999; ZIMMERLI *et al.*, 2000). Sie werden exakt unterhalb der Angriffstelle abgelagert (CONRATH und KAUSS, 2000). Die Zusammensetzung von Papillen ist komplex. Als Bestandteil von Papillen sind Kallose und polymere Phenole fast immer nachzuweisen. Weiterhin können Papil-

len hydroxyprolinreiche Glycoproteine enthalten. Die exakte Zusammensetzung der Papillen schwankt dabei von Pflanzenart zu Pflanzenart und es können bei Kartoffelpflanzen auch fibrilläre Materialien (mögliche Zellulose) vorkommen (CONRATH und KAUSS, 2000). Die Papillenbildung erfordert die Zusammenarbeit verschiedener Enzyme, die sowohl in der Zellmembran, im Golgi-Apparat und auch im Cytoplasma lokalisiert sind. Zudem muss durch Umbau des Cytoskeletts erreicht werden, dass die Sekretion der Vorstufen von Komponenten der Papillen zum Ort des Angriffs kanalisiert werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass in Zellen mit erworbener Resistenz eine oder mehrere dieser Reaktionen in verstärktem Umfang ablaufen.

Betrachtet man die in Abb. 61 dargestellten TEM-Bilder von Papillen an BABA behandelten Blattscheiben, die das Eindringen der Haustorien verhindern, so stellt sich die Frage, ob BABA evtl. Enzyme der Papillenbildung induziert. Arbeiten über Kallosesynthesen wurden im wesentlichen Mitte der 80er Jahren von KAUSS durchgeführt (KAUSS, 1985; KAUSS, 1987). KAUSS beschrieb die konstitutive Expression dieses Enzyms, das allosterisch aktiviert wird. Untersuchungen zur Regulation nach Applikation von Resistenzinduktoren wie BABA fehlen.

1	cttccgggattatgtatttacaggaaagctcttatgcttcagagttat	20
	L P G L C I Y R K A L M L Q S Y L E R N	
61	gctcctggagatggtgaagctgcgatttctagtgttgcaactgatactcaaggttat	40
	A P G D V E A A I S S D V A T D T Q G Y	
121	gagttttctcctgcggcacgagctctggcagatctgaagtttacatagttgttacatgt	60
	E F S P A A R A L A D L K F T Y V V T C	
181	caaataatggaatacaaaagagaagagcaaaaacctgaggctgtggatattgcattgcta	80
	Q I Y G I Q R E E Q K P E A V D I A L L	
241	atgcaacgaaaatgaagctcttcgagttgcttacattgattccggtgagactctgaaggat	100
	M Q R N E A L R V A Y I D S V E T L K D	
301	ggatagtgacagacagagttctattctaaacttgtaaagctgatcaatgggaaagat	120
	G I V Q T E F Y S K L V K A D I N G K D	
361	caggaaatatactctatcaaaattaccagaaatcctaaacttggtgaaggaaaacctgaaa	140
	Q E I Y S I K L P E I L N L V K E N L K	
421	atcaaaacctgacagttttactcgtggaaatgcaattcaaacgatttacatgaatca	160
	I K T M Q F I Y S W K C N S N D L H E S	
481	ggattattttttagaagccctgaagatgagaaatcttcttgaagagttccatacagac	180
	G L L F L E A L K M R N L L E E F H T D	
541	atggcattcgtcctcctaccattcttggtgttcgggaacatgtcttcaccggaagtgtct	200
	M A F V L L P F L V F G N M S S P E V S	
601	cttcttagccttatatgtccaatcaagaaactagctttgttactctatgccagcgtgttc	220
	L L S L I C P I K K L A L L L Y A S V F	
661	tggcaaaaccttaaaggttcgtatgcattatggccatccagatgttttgatcagagtttt	240
	W Q N L K G S Y A L W P S R C F D Q S F	
721	ccatatacacgaggtggatcagcaaggcctctcgagttatcaacattagtggaagatatt	260
	P Y T R G G I S K A S R V I N I S E D I	
781	atgctggattcaattcaacattgcgccaggggaatgttactcatcacgaatcatccaggt	280
	M L D S I Q H C A R G M L L I T N H P G	
841	aagcc	281
	K	

Abb. 64: Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA Klons Vv-KS (*Vitis vinifera* Kallosesynthase). Die degenerierten Primer wurden anhand konservierter Bereiche bekannter Kallosesynthesen ausgewählt.

Durch *Northern blot* Analysen mit einer Kalloso-synthase-Sonde sollte eine mögliche Induktion der mRNA dieses Enzyms nach BABA Applikation überprüft werden. Hierzu musste eine Teilsequenz der *Vitis*-Kalloso-synthase identifiziert und kloniert werden. Mit Hilfe degenerierter Oligosequenzen in konservierten Bereichen von bekannten Kalloso-synthasen wurde ein 845 bp langes Fragment amplifiziert. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde kloniert; sequenziert und in die Datenbank mit der Accessionnummer AJ430780 eingegeben. Datenbankrecherchen (*BLAST search*, NCBI) ergaben hohe Homologien zu Kalloso-synthasen anderer höherer Pflanzen. Im folgenden ist der Aminosäure-Sequenzvergleich zu Kalloso-synthasen aus *Arabidopsis thaliana* (At) und *Gossypium hirsutum* (Gh) gezeigt.

	*	20	*	40	*						
Vv-KS :	LPGLCTYRKALMLQSYLERNAPGDV	EAATSSDVA	TDTQGYEF	SFAARALA	:	50					
At-KS :	VRGMMYYRKALMLQSYLERKAGNDA	-----	TDAEGFELS	PEARAAQA	:	41					
Gh-KS :	VRGMMYYRKALMLQTYLERENARDT	EAALSRL	ETTD	TQGYEL	SPEARARA	50					
	60	*	80	*	100						
Vv-KS :	DLKFTYVVVTCQIYGIQRE	FQKPEAV	DIALLMQRNEALRVAY	IDS	VETLKD	100					
At-KS :	DLKFTYVVVTCQIYGRQKED	QKPEAV	DIALLMQRNEALRIAY	IDV	VVDSPK	91					
Gh-KS :	DL---YVVVTCQIYGRQKE	FQKPEAA	DIALLMQRNEALRVAF	IDV	VVETLKD	97					
	*	120	*	140	*						
Vv-KS :	GI	VQTEFYSKLVKAD	INGKDEI	YYSIKLP	--EILN	LVKENLKIKTMOFIY	148				
At-KS :	GKSHTEYYSKLVKADIS	GKD	EIYSIKLP	GDPKLG	EGKPE	QNHAI	VFTR	140			
Gh-KS :	GK	VHTEYYSKLVK	DINGKDEI	YAIKLP	GDPKLG	EGKPE	QNHAI	VFTR	146		
	160	*	180	*	200						
Vv-KS :	SWKCNSNDIHESGLL	FLEALKMRN	LLEEFHTD	MAFVLL	PFVFCN	---M	194				
At-KS :	GNAIQITIDMNQDNY	FEAL	KMRN	LLEEFDR	DHG--	IRPPTIL	GVREHVF	187			
Gh-KS :	GNAVQITIDMNQD	---FEAL	KVRN	LLEEFDR	DHG--	IRPPTIL	GVREHVF	191			
	*	220	*	240	*						
Vv-KS :	SSPEVSLISL	ICPIKKL	ALLLYASV	FWQNL	KGSYAL	WPSRC	FDQSE	FPYTR	244		
At-KS :	TGSVSSLAS	FMSNQETS	FTLGQR	VLA	KPLK	IRMHY	GHPD	VFDR	VFHITR	237	
Gh-KS :	TGSVSSLAS	FMSNQESS	FVTLGQR	VLAT	PLK	VRMHY	GHPD	VFDR	VFHITR	241	
	260	*	280	*							
Vv-KS :	GGISKASRVINISED	I	MLDSIQHC	ARC	MLLI	TNHP	---	GK---	281		
At-KS :	GGISKASRVINISED	I	FAGFN	TTLRQ	GN--	VTH	HEYI	QV	GKGRD	279	
Gh-KS :	GGISKASRIINISED	I	YAGFN	STLRQ	GN--	I	TH	HEYI	QV	GKGRD	283

Abb. 65: Vergleich der Aminosäuresequenz des cDNA Klon *Vv-KS* mit Kalloso-synthase aus *Gossypium hirsutum* (Gh-AF085717) und *Arabidopsis thaliana* (At-NM111596). Identische, sowie homologe Aminosäuren zu beiden Arten sind schwarz, identische bzw. homologe Aminosäuren zu nur einer Art sind grau unterlegt.

Die Übereinstimmung der *Vv-KS* beträgt mit der Aminosäuresequenz aus *Gossypium hirsutum* 55 % Identität und 63 % Homologie. Die Kalloso-synthase aus *Arabidopsis thaliana* zeigte 52 % Identität und 61 % Homologie. Weiterhin waren hohe Homologien zu Kalloso-synthasen aus Reis (*Oryza sativa*) AP001389 mit 47 % Identität und 60 % Homologie und Tabak (*Nicotiana tabacum*) AF304373 mit 46 % Homologie und 59% Identität zu verzeichnen.

3.8.4.1 Regulation der Kallosose synthase mRNA-Akkumulation

Der *Vv-KS* Transkriptpegel wurde nach BABA-Applikation in Zellkulturen von *Vitis rupestris* durch *Northern blot* Analysen untersucht. Hierzu wurden Zellen mit BABA inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Gesamt-RNA isoliert. Die Transkriptmenge der Kallosose synthase war niedrig, so dass bei diesen *Northern blot* Analysen nicht wie üblicherweise 20 µg Gesamt-RNA pro Spur-, sondern 40 µg Gesamt-RNA aufgetragen wurde.

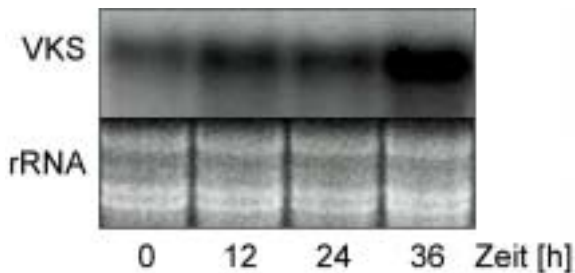


Abb. 66: *Northern blot* Analyse der *Vv-KS* Transkription in Zellkulturen von *Vitis rupestris*. Zellkulturen wurden mit 200 µM BABA inkubiert und in Zeitintervallen von 12 Stunden nach Applikation zur RNA Extraktion überführt. Je Spur wurden 40 µg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der *Vv-KS* Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet

Abb. 66 zeigt eine Erhöhung der *Vv-KS*-mRNA in *Vitis rupestris* Zellkulturen nach BABA-Applikation (200 µM). Bereits 12 Stunden nach Inkubation der Zellen mit BABA ist eine Zunahme der Transkriptmenge zu beobachten, welche bis 24 Stunden auf ähnlichen Niveau verbleibt. 36 Stunden nach BABA-Applikation kommt es zu einer weiteren Erhöhung der *Vv-KS* mRNA. Diese *Northern blot* Analyse wurden nur zweimal mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt. Jedoch war die Signalstärke im Vergleich zu den *VGL*- und *VCH* *Northern blot* Analysen schwach, was auf eine allgemein niedrigere mRNA-Akkumulation schließen lässt. Untersuchungen an Kallosose synthasen und deren Regulation sind bisher an vielen Pflanzen und Zellkulturen durchgeführt worden (KAUSS, 1987; HIM *et al.*, 2001). Dabei wurde bei allen Untersuchungen die Enzymaktivität der Kallosose synthase biochemisch bestimmt. Bei keinen der Experimenten wurde die Regulation auf der Ebene der Transkription untersucht. Eine Aktivierung der Enzymaktivität durch Ca^{2+} konnte nachgewiesen werden (KAUSS, 1987). KAUSS (1987) berichtet von einer konstitutiv exprimierten Kallosose synthase, die allosterisch durch Ca^{2+} aktiviert wird. Die *Northern blot* Analyse in Abb. 66 deutet jedoch auf eine zusätzliche Regulation der Kallosose synthase in *Vitis rupestris* auf Transkriptionsebene hin. Eine *PR*-Gen Induktion der Zellkultur nach BABA-Applikation findet nicht statt (Abb. 53) und macht dadurch eine spezifische Reaktion der Zellen wahrscheinlich (kein Stress).

4 DISKUSSION

Arbeiten zur induzierten Resistenz wurden im wesentlichen an Pflanzen, wie Gurke, Tomate, Tabak und *Arabidopsis* durchgeführt, die molekularbiologisch und genetisch gut untersucht sind. Im Vergleich zur ökonomischen Bedeutung der Weinrebe ist die Kenntnis über deren molekularbiologischen Grundlagen erstaunlich gering.

Die induzierte Resistenz von Pflanzen gegenüber Pathogenen hat in den letzten Jahren an großer Bedeutung gewonnen. Dabei ist es ein Ziel, Pflanzen durch Vorbehandlung mit Elicitoren oder Pflanzenaktivatoren zu „immunisieren“, d. h. ihre Abwehrmechanismen zu aktivieren, um sie gegen spätere Infektionen zu schützen. Kommt es zu einer Resistenzausbildung von Pflanzen, ist diese oft gegen eine Vielzahl von Pathogenen gerichtet. Wird beispielsweise eine Gurkenpflanze durch den Pilz *Colletotrichum lagenarium* befallen, kommt es zu starken Schädigungen des Blattgewebes. Wird jedoch an einer jungen Pflanze frühzeitig ein Keimblatt mit Pilzsporen infiziert, dann sind die nachwachsenden Blätter gegen erneute Infektionen völlig resistent. Diese Resistenz kann auch durch Erstinfektion der Folgeblätter hervorgerufen werden, hält mehrere Wochen an und ist gegen Pilze, Bakterien und Viren gerichtet (CONRATH und KAUSS, 2000). Inzwischen weiß man, dass diese Resistenzausbildung durch Elicitoren hervorgerufen wird, die entweder direkt von dem angreifenden Pathogen stammen oder durch biochemische Prozesse in der Pflanze nach Infektionen freigesetzt werden. Diese Elicitoren werden von der Pflanze perzipiert (ENYEDI *et al.*, 1992) und aktivieren Abwehrgene (*PR*-Gene, *pathogenesis related*). Ihre Genprodukte besitzen oft hydrolytische Eigenschaften, wie im Falle der Glukanasen und Chitinasen, um Zellwandbestandteile des Pathogens abzubauen,.

Mittlerweile ist eine gewisse Anzahl von Resistenzinduktoren isoliert und in der Literatur beschrieben worden (EBEL und COSIO, 1994; STICHER *et al.*, 1997). Jedoch sind die meisten bezüglich ihrer Wirksamkeit nur bei wenigen Pflanzenarten getestet worden. Diese Substanzen können unter Umständen spezifisch nur in bestimmten Pflanzenarten wirken, wie z. B. pep 13, das in Petersilie-Zellkultur eine Abwehrantwort auslöst, nicht aber in Tabak- oder *Arabidopsis*-Zellkulturen.

In dieser Arbeit wurde ein *screening* System entwickelt, um putative Resistenzinduktoren auf ihr Potential zu testen, *PR*-Gene in *Vitis*-Zellkulturen zu induzieren, zu testen. Dazu wurde zunächst eine Glukanase-Gen (*VGL*) als typisches *PR*-Gen isoliert und charakterisiert. Anschließend wurde der Promotor dieses Gens mit einem Luziferasereporter (*VrGL/LUC*) fusioniert und stabil in eine *Vitis rupestris* Zellkultur integriert. Die Etablierung dieser *VrGL/LUC* Zelllinie, deren Reporterexpression die Regulation der endogenen *VGL* widerspiegelt, stellte einen zentralen Ausgangspunkt dieser Arbeit dar.

4.1 Etablierung von *Vitis* Zellkulturen

Für die Untersuchungen war es von Beginn an notwendig, Zellkulturen verschiedener *Vitis*-Arten anzulegen. Dabei wurden Arten gewählt, die sich in ihrem Resistenzgrad gegenüber *Plasmopara viticola* stark unterscheiden. Als äußerst anfällig erwies sich *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau, wohingegen sich *Vitis rupestris* resistent zeigte. Aus diesen zwei Arten wurden zunächst Kalluskulturen angelegt.

Die Kalluskulturen wurden aus Stengelgewebe und Nodien der verschiedenen *Vitis*-Arten gewonnen. Anschließend wurden die Kalluskulturen in flüssiges Medium überführt, deren Zellen in kleinen, fein dispersen Zellaggregaten wuchsen (Abb. 7). In der Regel wurden alle 2 Wochen ca. 10 ml in 40 ml neues Kulturmedium überimpft. Obwohl die Zellkulturen nicht photoautotroph wuchsen, waren sie aus technischen Gründen einem Licht-/Dunkelwechsel von 16/8 Stunden unterworfen. Die Zellkulturen waren durch Salicylsäure (NaSA) induzierbar (s. Abb. 34) und erwiesen sich zusätzlich molekularbiologisch als leichter handhabbar als vergleichsweise zu Gewächshaus- oder Freilandpflanzen.

4.2 PR-Gene in *Vitis spec.*

Bei einer Reihe von Kulturpflanzen kommt es in Blättern mit induzierter Resistenz noch vor einer Zweitinfektion zur Anhäufung verschiedener PR-Proteine, denen eine direkte Abwehrfunktion zugesprochen wird. Die Aktivierung einer induzierten Resistenz in Tabak-, Gurken- und Tomatenpflanzen korreliert mit der Akkumulation von PR-Proteinen (BINDER *et al.*, 1989), zu denen Chitinasen und Glukanasen zählen. Der Hauptschaderreger der Weinrebe, *Plasmopara viticola*, gehört zu den Oomyceten, deren Zellwände als Hauptbestandteil β -1,3 vernetzte Polyglukanen beinhalten. Bei den Analysen zur Wirt-Pathogenbeziehung zwischen der Weinrebe *Vitis vinifera* und *Plasmopara viticola*, wurde experimentell das Hauptaugenmerk auf β -1,3 Glukanasen, die eher als Chitinasen bei der Abwehr gegen Oomyceten eine Rolle spielen (EGON MÖSSINGER, persönliche Mitteilung).

Ein Gen, codierend für eine extrazelluläre β -1,3 Glukanase aus *Vitis vinifera*, konnte mittels PCR in voller Länge (Abb. 9) isoliert werden, dessen Produkt hohe Homologien zu Glukanasen aus anderen Pflanzen besaß. In der Aminosäuresequenz konnte am C-Terminus das für Glykosylhydroxylasen typische Sequenzmotiv identifiziert werden (XU und FINCHER, 1992). Am N-Terminus befand sich ein Signalpeptid, welches für einen Transport in den Apoplasten verantwortlich ist. Die subzelluläre Lokalisation dieser Glukanase wurde mittels GFP-Fusions untersucht. Zunächst wurden Protoplasten von Petersilie-Zellkultur (s. Abb. 10) und *Vitis rupestris*-Zellkultur transient mit dem VGL/GFP Plasmid transformiert. In beiden Organismen kam es ausschließlich zu einer cytoplasmatischen Fluoreszenz und nie zu einer vakuolären Lokalisation des Fusionsproteins. Da die Proto-

plasten in dünnflüssigem Medium flottieren, wird nach einem Transport in den Extrazellulärraum das *VGL/GFP* Protein durch Diffusion vermutlich stark verdünnt und somit mikroskopisch im Kulturmedium nicht nachweisbar. Ein Signalpeptid am N-Terminus und ein Ausschluss einer vakuolären Lokalisation, lassen aber einen Transport dieser Glukanase in den Extrazellulärraum vermuten.

4.3 Vergleich der *PR*-Gen Aktivierung unterschiedlich resistenter *Vitis*-Arten

PR-Gene sind durch ihre Transkriptakkumulation nach Pathogenbefall charakterisiert (STICHER *et al.*, 1997). Zunächst wurden *Northern blot* Analysen der Glukanase mRNA durchgeführt, um diese als *PR*-Gen einordnen zu können.

4.3.1 Die Regulation der Glukanase (*VGL*) nach Pathogenbefall in *Vitis spec.*

Bereits in nicht infizierten Blättern von *Vitis vinifera* kann mRNA der Glukanase (*VGL*) in *Northern blot* Analysen detektiert werden (Abb. 14), was auf eine geringe konstitutive Transkriptmenge hindeutet. Nach Pathogenbefall einzelner Blätter von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau durch *Plasmopara viticola* kam es dort zu einer starken Akkumulation der *VGL*-Transkriptmenge, während die nicht infizierten Blätter keine signifikante Zunahme der mRNA-Transkripte aufwiesen. Diese Daten korrelieren mit Untersuchungen auch an anderen von Pflanzen, die bei einer kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktion nach Pathogenbefall keine systemische Akkumulation von *PR*-Genen zeigten (STICHER *et al.*, 1997). Um *PR*-Gene systemisch zu aktivieren ist es notwendig, dass die lokale Infektion eine HR (Hypersensitive Reaktion) auslöst. Erst dann kann dies zu einer systemischen Induktion von *PR*-Genen führen (DONG, 1998; GOVRIN und LEVINE, 2002; CONRATH *et al.*, 2002).

Vitis rupestris Pflanzen lösen nach Befall mit *Plasmopara viticola* eine hypersensitive Reaktion (HR) aus (Abb. 6). Sie sind weitestgehend resistent. Man spricht von einer inkompatiblen Wirt-Pathogen Interaktion. *Northern blot* Analysen ergaben eine starke *VGL*-Transkriptakkumulation in infizierten Blättern, aber, wie auch bei *Vitis vinifera*, keine signifikante Zunahme der *VGL*-mRNA in nicht infizierten Blättern. Damit liegt in dieser Wirt-Pathogen-Interaktion keine *SAR* (*systemic acquired resistance*) Aktivierung vor, wie man sie von vielen einjährigen, krautigen Pflanzen her kennt, nicht vor. Darum wurde neben der Glukanase als weiteres *PR*-Gen eine Chitinase (*VCH*) nach Pathogenbefall durch *Plasmopara viticola* untersucht.

Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der *VGL*-mRNA in infizierten Blättern genauer bestimmt. Zu diesen Untersuchungen wurde zusätzlich eine hochresistente Art, *Vitis riparia*, hinzugezogen. Diese Experimente sollten Aufschluss darüber geben, ob die resistenten

amerikanische *Vitis*-Arten, im Rahmen einer Coevolution Perzeptionssysteme entwickelt haben, die *Plasmopara viticola* erkennen, was sich in einer schnelleren Aktivierung dieser *PR*-Gene niederschlagen könnte. Arbeiten an *Arabidopsis* zeigten, dass eine Infektion mit *Pseudomonas syringae*, die ein *Avr*-Gen exprimieren, welches von der Wirtspflanze erkannt wird, zu einer schnellen *PR*-Gen Expression führt und dadurch zu einer erfolgreichen Abwehr. Während es Dagegen beim Pathogen mit mutiertem *Avr*-Gen zu einer zeitlichen Verzögerung der *PR*-Gen Expression kommt und auch zur Krankheitsausprägung führt (ZIMMERLI *et al.*, 2000). Bei der anfälligen europäischen Rebsorte, *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau, ist 36 Stunden nach einer Infektion mit *Plasmopara viticola* eine Erhöhung der *VGL*-mRNA Transkriptmenge zu detektieren. Bei den resistenten amerikanischen Arten ist diese *PR*-Gen Induktion früher zu beobachten. Bei *Vitis rupestris* kann eine Zunahme der *VGL*-mRNA bereits 24 Stunden nach Infektion beobachtet werden und bei der hoch resistenten *Vitis riparia* ist diese Zunahme bereits nach 12 Stunden eindeutig nachweisbar. Die in Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16 gezeigten *Northern blot* Analysen lassen zwar keine Aussage über die absolute Transkriptmenge des untersuchten *PR*-Gens bei den jeweiligen *Vitis*-Arten zu, jedoch über den zeitlichen Verlauf der *PR*-Gen Induktion.

Es scheint, dass der Resistenzgrad der Pflanzen mit dem zeitlichen Muster der *PR*-Gen Aktivierung einhergeht. Dieses lässt zwar nicht den Schluss zu, dass die amerikanischen Arten über spezielle Rezeptoren verfügen, die *Plasmopara viticola* perzeptieren und so anschließende Abwehrreaktionen früher induzieren können, jedoch sind dies wichtige Indizien für einen solchen Mechanismus. Die rechtzeitige und schnelle Aktivierung von *PR*-Genen könnte demnach mit der Resistenzprägung einhergehen.

Auch der Erreger des Echten Mehltaus *Uncinula necator*, ein Ascomycet, führt zur Akkumulation der *VGL*-mRNA in infizierten Blättern von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau. Zu dieser Wirt-Pathogen-Interaktion wurden aber keine weiteren Analysen durchgeführt.

Die Induktion dieser Glukanase konnte somit nach Befall dieser beiden bedeutenden Pathogene der Weinrebe nachgewiesen werden und zeigt somit die Eigenschaften eines typischen *PR*-Gens.

4.3.1.1 Untersuchungen zum freien Salicylsäure-Gehalts in *Vitis vinifera* nach Infektionen mit *Plasmopara viticola*

Eine Erhöhung der freien Salicylsäure (SA) in Blättern und die anschließende Aktivierung von *PR*-Genen konnte bei einer Vielzahl von Pflanzen nach Pathogenbefall nachgewiesen werden (CAMERON *et al.*, 1999, 2000). Ausnahmen dieser Reaktionen konnten bei Kartoffel-Pflanzen (COQUOZ *et al.*, 1995, 1998) und Reis (SILVERMAN *et al.*, 1995) festgestellt. Beide Pflanzen weisen einen erhöhten Gehalt an freier SA auf, der auch nach Infektionen

durch Pathogene unverändert bleibt. Vielmehr scheint eine Sensibilisierung des Systems auf die bereits vorhandene SA einzutreten (COQUOZ *et al.*, 1998).

Untersuchungen zum SA-Gehalt bei *Vitis*-Arten lagen bis heute nicht vor. Deshalb war es von Interesse, wie *Vitis vinifera* nach Pathogenbefall durch *Plasmopara viticola* ihren SA-Pegel reguliert. In Abb. 17 ist der Gehalt an freier SA in Blättern der Weinrebe nach Infektion mit *Plasmopara viticola* gezeigt. Bereits 42 Stunden nach einer Infektion kommt es zu einer Verdoppelung des freien SA-Gehaltes. Nach 60 Stunden fällt der SA-Pegel leicht ab und zeigt nach 132 Stunden eine vervierfachung des freien SA-Gehalts im Vergleich zum Zeitpunkt 0 hpi. Die *VGL-Northern blot* Analysen zeigten bei der anfälligen Art *Vitis vinifera* 36 hpi eine Zunahme der Genaktivität. Einen Zusammenhang zwischen der Erhöhung an freier SA und *PR*-Gen Induktion liegt also nahe.

4.3.2 Die Regulation der basischen Chitinase III (*VCH*) nach Pathogenbefall in *Vitis spec.*

Die Regulation der *VCH*-mRNA weist ebenso wie die *Vitis*-Glukanase einige Besonderheiten auf, die von denen der gut untersuchten Pflanzen wie Tabak, Gurke und *Arabidopsis* abweichen. So führt eine Infektion durch *Plasmopara viticola* bei der resistenten Art *Vitis rupestris* nicht zu einer systemischen Akkumulation der *VCH*-Transkriptmenge und damit nicht zur Aktivierung einer *SAR*. Dies wird in Arbeiten von BUSAM bestätigt, der keine Zunahme der *VCH*-Transkriptmenge in *Vitis rupestris* nach Infektion mit *Plasmopara viticola* beschreibt (BUSAM *et al.*, 1997). Jedoch beschreibt BUSAM eine systemische Akkumulation dieser Chitinase der Klasse III (*VCH*) in der kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktion zwischen *Vitis vinifera* cv. *Pinot noir* und *Plasmopara viticola*, was eine Überprüfung der *VCH* Transkriptregulation in resistenten- und anfälligen *Vitis*-Arten notwendig machte.

Zunächst weicht die mRNA-Akkumulation der *VCH* in infizierten Blättern von *Vitis vinifera* im Vergleich zu den Ergebnissen von BUSAM ab. BUSAM findet ausschließlich am 2.- und am 6. Tag eine Erhöhung der *VCH*-mRNA Transkriptmenge. *Northern blot* Analysen in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es 36 Stunden nach Infektion durch *Plasmopara viticola* zu einer ersten messbaren Steigerung der *VCH*-Transkriptmenge kommt, die kontinuierlich zunimmt und ein Maximum nach 6 Tagen aufweist. Weiter findet BUSAM in seinen Untersuchungen eine alternierende signifikante systemische Akkumulation der *VCH*-mRNA am 2.-, 6.- und 8. Tag nach Infektion. Solch eine Genregulation wurde noch bei keiner Wirt-Pathogen Interaktionen gezeigt. Dieses Ergebniss muss jedoch nicht zuletzt aufgrund dessen, dass es bisher keine Berichte über eine *SAR* Aktivierung in kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktionen gibt (STICHER *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1997) mit Skepsis betrachtet werden. Um *PR*-Gene systemisch zu aktivieren ist es notwendig, dass die lokale

Infektion eine HR (Hypersensitive Reaktion) auslöst. Erst dann kann es zu einer systemischen Induktion von *PR*-Genen kommen (YANG *et al.*, 1997; MURPHY *et al.*, 1999; CONRATH *et al.*, 2002; JOE KUC, persönliche Mitteilung). BUSAM spricht von einer konstitutiven *VCH*-Transkriptmenge, die nach Infektion durch *Plasmopara viticola* stark erhöht wird. Eine mögliche Erklärung dieser Unterschiede in der *VCH* Regulation ist, dass in den *Northern blot* Analysen von BUSAM die mit RNA gebundenen Membranen der lokalen und systemischen Blättern getrennt auf einem Röntgenfilm exponiert wurden. Eine Erhöhung der Expositionszeit des Röntgenfilms kann somit zu fehlerhaften Interpretationen führen. Auch wurden bei keinem Experiment Beladungskontrollen der jeweiligen Gesamt-RNA in den *Northern blot* Analysen gezeigt.

Die Regulation der *VCH*-mRNA infizierter Blätter von anfälligen und resistenten *Vitis*-Arten gleicht der Regulation der *VGL*. Bei der anfälligen europäischen Rebsorte, *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau führt eine Infektion mit *Plasmopara viticola* 36 Stunden nach Infektion zu einer Zunahme der *VCH*-mRNA Transkriptmenge. Bei den resistenten amerikanischen Rebsorten ist diese *PR*-Gen Induktion früher zu beobachten. Bei *Vitis rupestris* kann eine leichte Zunahme der *VCH*-mRNA bereits nach 12 Stunden beobachtet werden. Dies ist der einzige Unterschied im Vergleich zur *VGL*-Transkriptakkumulation. Bei der hoch resistenten *Vitis riparia* ist diese Zunahme der *VCH*-mRNA ebenfalls nach 12 Stunden gut nachweisbar. Es wurde gezeigt, dass die Transkription der beiden *PR*-Gene *VGL* und *VCH* in *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau und *Vitis riparia* einer identischen Regulation nach *Plasmopara viticola* Infektion unterliegen.

Eine systemische Aktivierung dieser Gene und somit die Aktivierung einer *SAR* konnte weder in der kompatiblen- noch in der inkompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktion nachgewiesen werden. Es scheint, als ob weder resistente noch anfällige *Vitis*-Arten über den typischen Abwehrmechanismus einer *SAR* verfügen, der bei vielen einjährigen Pflanzen nachgewiesen wurde und zu einer systemischen Akkumulation von *PR*-Genen nach einer lokalen Infektion führt (STICHER *et al.*, 1997). Der Nachweis einer *SAR* an mehrjährigen, verholzenden Pflanzen nach Pathogenbefall konnte bis heute nicht gezeigt werden.

Eventuell unterliegt die erfolgreiche Abwehr eines Pathogens an perennierenden Pflanzen, die trotz Jahren ohne Fortpflanzungserfolg weiterbestehen können einem anderen Mechanismus, wie einjährigen Pflanzen, die jedes Jahr auf einen Fortpflanzungserfolg angewiesen sind. Hinweise darauf zeigten viele Untersuchungen an *Vitis vinifera*, bei denen keine Zunahme der Resistenz in anfälligen *Vitis*-Arten nach lokalen Infektionen mit unterschiedlichen Pathogenen auftrat. Auch in interspezifisch-resistenten *Vitis*-Sorten, die inzwischen im Weinbau eingesetzt werden, führt eine lokale Infektion eines Pathogens nicht zu einer Erhöhung der Pathogenabwehr (BERNHARD HUBER, persönliche Mitteilung).

Dies zeigt, dass eine Übertragung von Abwehrmechanismen, wie sie von Modellpflanzen her bekannt und untersucht sind, nur bedingt auf andere Pflanzen möglich ist. Jede Pflanze verfügt über ihr eigenes aktivierbares Potential an Abwehrmechanismen, wie man sie z. B. bei der Produktion von Phytoalexinen kennt. Dies erfordert eine spezifische Untersuchung der Resistenzausbildung in den jeweiligen Organismen bzw. den entsprechenden Pathogenen.

4.4 Die Etablierung eines *in vivo* VrGL/LUC Reportersystems in *Vitis rupestris* Zellsuspensionskulturen

Die Perzeption und Transduktion eines Elicitors oder eines Pflanzenaktivators und die sich anschließenden Änderungen im Muster der Genexpression sind in einer intakten Pflanze dem komplexem Zusammenspiel entwicklungs- und gewebespezifischen Faktoren unterworfen (STICHER *et al.*, 1997; DOLORES *et al.*, 2001). Die Verwendung von Zellkulturen, die eine homogene Zellpopulation repräsentieren, erleichtert die Analyse von Signaltransduktionsvorgängen.

Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Transformationen eines *PR*-Gen Promotor-Reporter-Konstruktes in *Vitis*-Arten durchgeführt wurden, lagen den bisherigen Studien die Expressionsanalyse endogener Gene zugrunde.

4.4.1 Transiente Transformation des VrGL/LUC-Plasmids in Protoplasten

Zunächst wurden Petersilie-Protoplasten mit dem VrGL/LUC-Plasmid mittels Elektroporation transient transformiert (Abb. 22). Eine von Salicylsäure abhängige Induktion des Glukanasepromotors der Weinrebe konnte in dem heterologen System von Petersiliezellen gezeigt werden. Dies lässt vermuten, dass eine von Salicylsäure abhängige Aktivierung von *PR*-Genen ein konserviertes Element bei der Pathogenabwehr bei Pflanzen darstellt. Vermutlich sind dieselben Promotorbereiche, bei *Vitis*-Arten und in Petersilie für eine SA abhängige Induktion der Gene verantwortlich.

Transiente Transformationen der *Vitis rupestris* Zellsuspensionskultur mit dem VrGL/LUC- und dem VvGL/LUC Plasmid zeigten einen nahezu identischen Verlauf der Luziferaseexpression (Abb. 24 und Abb. 26). Die Northern blot Analysen des Glukanasegens zeigten jedoch eine verzögerte Akkumulation nach Infektion mit *Plasmopara viticola* bei *Vitis vinifera* im Vergleich zu *Vitis rupestris* (Abb. 14 und Abb. 15). Vermutlich sind die Unterschiede in der Regulation dieser Gene nicht auf unterschiedliche Promotorstrukturen zurückzuführen, sondern liegt an der Geschwindigkeit mit der das Pathogen erkannt und Transkriptionsfaktoren aktiviert werden.

Die Herstellung von Protoplasten und die transiente Transformation vor jedem neu durchzuführenden Experiment sind methodisch aufwendig. Weiterhin ist die Möglichkeit gegeben, dass unspezifische Induktionen durch Stress, der durch diese Arbeitsschritte hervorgerufen werden kann, auftreten. Deshalb war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, eine Methode zur stabilen Transformation der Zellkultur mit einem Reporterkonstrukt zu etablieren. Die Verwendung des Luziferase-Reportergens unter Kontrolle des endogenen *VGL*-Promotors sollte auch den quantitativen Vergleich der Expressionsrate zwischen unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten erleichtern.

4.4.2 Stabile Transformation der *Vitis rupestris* Zellsuspensionskultur

Neben der Etablierung eines transienten Transformationsprotokolls für *Vitis*-Zellkulturen, wurde in dieser Arbeit ein Protokoll zur stabilen Transformation der heterotrophen *Vitis*-Zellkultur unter Verwendung einer *Particle Inflow Gun* (PIG) erfolgreich etabliert.

Die Optimierung der experimentellen Parameter wurde über transiente Transformationsexperimenten mit β -Glucuronidase durchgeführt. Dabei korrelierte die Transformationsrate bei konstanten Heliumdruck mit der optimalen Streuung der beschleunigten DNA/Trägerpartikel über die immobilisierten Zellen. Dies zeigen auch Daten, wo die Autoren eine starke Zunahme der Transformationseffizienz bei *Vigna* Blattzellen durch Optimierung der Partikelstreuung erfolgte (FINER *et al.*, 1992).

Unter optimalen Bedingungen konnte für die *Vitis*-Zellkultur verlässlich eine Transformationsrate von ≥ 30 Transformanten/Transformationsereignis erreicht werden. Unter Berücksichtigung des zur Transformation verwendeten Ausgangsmaterials entsprach diese Rate Werten, die unter der Transformation einer Petersilie-Zellkultur bzw. einer embryogenen Mais Gewebekultur lagen (LOYALL, Dissertation 2000). Dennoch konnten durch Erhöhung der Transformationsereignisse stabil transformierte *Vitis*-Zellen isoliert werden. Kalli aus diesen Zellen konnten innerhalb von 6 – 8 Wochen auf selektivem Medium regeneriert und zur Subkultivierung abgenommen werden. Das PIG Verfahren eignet sich also als Standardmethode zur Herstellung stabiler transgener Linien von *Vitis*-Zellkulturen an.

4.5 Charakterisierung der *VrGL/LUC* Expression der transgenen Linien

Untersuchungen der Luziferaseexpression der stabil transformierten *VrGL/LUC* Linien ergaben, dass von ca. 100 subkultivierten Zelllinien auf selektivem Medium, nur 5 Linien das Reportergen exprimierten (Abb. 30) Vorläufige Analysen zeigten eine Luziferaseaktivität nach Stimulation der Reportergenexpression durch Natriumsalicylat (NaSA) in 4 der 5 untersuchten Linien. Im folgendem wurde eine dieser 4 Linien (Klon A, Abb. 32) ausge-

wählt und für die weiteren Experimenten herangezogen. Eine dieser Linien zeigte keine Induktion der Luziferaseexpression nach NaSA-Applikation. Dieses beruht möglicherweise auf einer unterschiedlichen Integration des Transgens, z.B. in der Nähe regulatorischer Bereiche, die die Expression des Reportergens reprimieren.

Zunächst wurde überprüft, ob die Regulation des Luziferasereporters, durch den *VrGL* Promotor, die Steuerung der endogenen *VGL* widerspiegelt. Transkriptanalysen der *VGL*-mRNA 12- bzw. 36 Stunden nach BTH-Applikation in *Vitis*-Zellkultur zeigten eine deutliche Zunahme der *VGL*-Transkriptmenge (Abb. 33). Eine *Northern blot* Analyse der Luziferasegen-Aktivität zeigte eine vergleichbare Regulation (Abb. 33). Die Luziferasegen-Expression der transgenen Linien spiegelt also nach einer BTH-Applikation den zeitlichen Verlauf der endogenen *VGL*-mRNA Akkumulation wieder. *Northern blot* Analysen der *VrGL/LUC* Linie zeigten nach Stimulation durch das SA-Strukturhomologe BTH und NaSA eine identische Akkumulation der *VGL*-mRNA (Abb. 34).

Die Luziferaseexpression zeigt nach NaSA-Applikation bei einer Endkonzentration von 50 μM NaSA die maximale Luziferaseaktivität in der *VrGL/LUC* Linie (Abb. 35). Eine NaSA-Applikation mit einer Endkonzentration von 100 μM zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf, verglichen mit 50 μM , der jedoch in der Signalstärke schwächer verläuft. Alle Kurven (einschließlich der nicht stimulierten Kontrolle) zeigen einen biphasischen Verlauf. Die leichte, aber stetige Zunahme, der mit Wasser behandelten Kontrolle könnte auf eine Stressinduktion, die durch ein Absinken der Zellen in den Meß-Platten zurückzuführen sein. Die Zellen werden nicht mehr optimal mit Sauerstoff versorgt. Die für die Zellen letale NaSA-Konzentration liegt vermutlich bei 200 μM was sich in einem Verlust der Luziferaseaktivität nach ca. 7 Stunden niederschlägt.

Im Vergleich zu den, mit NaSA durchgeführten Experimenten, zeigt sich mit BTH als Induktor ein verändertes Bild. Die letale Konzentration von BTH ist erst bei 1000 μM zu verzeichnen. Vermutlich ist die Toxizität von BTH gegenüber den *Vitis*-Zellen herabgesetzt. Die Zunahme der Luziferaseaktivität setzt nach BTH Applikation später ein, als nach NaSA Applikation. Dies könnte auf eine unterschiedlich schnelle Aufnahme der Substanzen in die Zellen zurückzuführen sein. Die maximale Stimulation der Zellen liegt bei einer Konzentration von 250 μM (5,0-fach). Eine Konzentration von 100 μM führt jedoch auch schon zu einer 4,9-fachen Steigerung der Luziferaseaktivität. 25 μM BTH hingegen führten lediglich zu einer 1,8-fachen Erhöhung der Luziferaseexpression (Abb. 38).

Ein leichter, aber stetiger Anstieg der Luziferaseexpression konnte auch hier in den nicht stimulierten Kontrollen beobachtet werden. Dies ist vermutlich auf die eine mangelhafte Sauerstoffversorgung, das durch ein Absinken der Zellen verursacht wird, zurückzuführen (TOM BOLLER, persönliche Mitteilung). Die in Abb. 40 dargestellten Luziferaseexpressionskinetiken unter den veränderten Bedingungen, zeigten eine schnellere Zunahme der

Luziferaseexpression nach NaSA- bzw. BTH Stimulation. Die *VrGL/LUC* Linie wurde auf einem Zellkulturschüttler stimuliert, bevor sie in die Meß-Platten überführt wurden. Unter diesen Bedingungen konnte eine Zunahme der Luziferaseexpression schon nach 3 Stunden beobachtet werden. Eine schnellere Verteilung bzw. eine bessere Aufnahme der Substanzen wären plausible Gründe hierfür. Experimente mit einem Luminometer, welches die Möglichkeit bietet, die Zellen während den Messungen zu schütteln, konnten aus technischen Gründen leider nicht durchgeführt werden.

Das *in vivo* Detektionssystem erlaubt eine schnelle Analyse von Testsubstanzen hinsichtlich dem Potential *PR*-Gene in *Vitis*-Zellkulturen zu induzieren. Die *in vivo* Messung der Luziferaseexpression konnte somit dazu verwendet werden, Elicitor vermittelte *PR*-Gen Expression sowohl quantitativ als auch in ihrem zeitlichen Verlauf mit hoher Genauigkeit zu detektieren. Da die Messung von bis zu 96 Parallelen möglich war, konnten die *in vivo* Expressionskinetiken verschiedener Substanzen direkt verglichen werden. Damit ist dieses Verfahren *Northern blot* Analysen von Expressionskinetiken in Bezug auf Quantifizierung der aktuellen Transkriptionsrate, zeitlicher Auflösung und Reproduzierbarkeit deutlich überlegen.

4.6 Promotoranalysen

Die Regulation von *PR*-Genen stellt einen wesentlichen Anteil bei der Ausbildung einer Resistenz gegenüber Pathogenen dar (STICHER *et al.*, 1997). Wie in Kap. 3.3.3 gezeigt wurde führt eine Infektion von *Plasmopara viticola* in resistenten *Vitis*-Arten zu einer deutlich schnelleren Akkumulation der *VGL*- und *VCH*-Transkriptmenge. Die könnte sich in unterschiedlichen Promotorstrukturen der jeweiligen Arten widerspiegeln. Dazu wurden zunächst die *VGL* Promotoren aus *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau (*VvGL*) und *Vitis rupestris* (*VrGL*) mittels *genome walking* isoliert. Die Promotoren der Glukanase weisen zahlreiche putative Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren auf, denen eine Rolle bei der Genaktivierung nach Pathogenbefall zugesprochen wird. Leider lagen über Promotoren von *PR*-Genen in *Vitis spec.* bis zu dieser Arbeit keinerlei Informationen vor. So wurden in dieser Arbeit zum ersten mal Promotoren von *PR*-Genen aus resistenten- und anfälligen *Vitis*-Arten isoliert und charakterisiert.

4.6.1 Die *VGL*-Promotoren

Vergleicht man die DNA Sequenzen der *VGL*-Promotoren zwischen *Vitis vinifera* und *Vitis rupestris* fällt zunächst die hohe Homologie auf, obwohl beide Arten ihr Habitat auf unterschiedlichen Kontinenten haben. Beide Promotoren enthalten die gleichen *cis*-regulatorischen Elemente, die lediglich in ihrer Anzahl, bzw. ihrer Position geringe Unterschiede aufweisen (s. Abb. 19). Die einzige Ausnahme ist eine BOX-4, die an Position -

182 ausschließlich der *VrGL*-Promotor aus *Vitis rupestris* besitzt. Aus den in Kap. 3.4 gezeigten Daten, ist zu schließen, dass die Steuerung der *VGL* beider Organismen nicht auf eine unterschiedliche Promotorstruktur zurückzuführen ist, sondern vermutlich auf die schnellere Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren, die diese Promotoren aktivieren können. Dies belegen die Ergebnisse der transienten Transformationen von *Vitis*-Protoplasten mit beiden Promotoren, bei denen eine Applikation von NaSA jeweils zum gleichen kinetischen Verlauf der Luziferaseexpression führt (Abb. 24, Abb. 26).

Eine BOX (circadian), die an der Steuerung einer circadianen Rhythmik beteiligt sein könnte, befindet sich auf dem *VrGL*-Promotor aus *Vitis rupestris*. Dieses Element hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der Gene nach Pathogenbefall oder Elicitor Applikation. Charakteristische Expressionsmuster, wie sie Genen unterliegen, die durch einen circadianen Rhythmus beeinflusst werden, können durch dieses System betrachtet werden. Der Nachweis einer circadianen Steuerung der *VrGL/LUC*-Expression stand nicht im Vordergrund dieser Arbeit, jedoch konnte in allen Luziferaseexpressionsstudien eine mehrphasische Genaktivierung beobachtet werden. Die Zellsuspensionskulturen unterlagen aus technischen Gründen einem Licht/Dunkel-Wechsel (16h/8h), wobei die Luziferasebestimmung im Dauerdunkel erfolgte. Die Frequenz dieser Schwingung lag zwischen 20- und 25 Stunden und deutet somit auf einen Einfluss einer circadianen Steuerung hin. Eine Steuerung von *PR*-Genen nach einem circadianen Rhythmus wurde bisher noch bei keiner Pflanzenart gezeigt. Eine Anpassung an den allgemeinen Energiestatus von Pflanzen kann ebenso diskutiert werden, wie eine Anpassung an die Infektionszeitpunkte von *Plasmopara viticola*, die bevorzugt am frühen Morgen stattfinden. (ARENS, 1927).

Aus Tabak konnte ein *cis*-regulatorisches Element aus einer β -1,3 Glukanase isoliert werden, welches für die Aktivierung durch NaSA hinreichend und notwendig ist (SHAH und KLESSIG, 1996). Sequenzvergleiche zeigten, dass dieses Element sehr ähnlich wie die TCA-Boxen aufgebaut ist. Vermutlich ist die Sequenz CCATCTTTT für die SA-vermittelte Genaktivierung verantwortlich (SHAH und KLESSIG, 1996). Dieses Element findet sich jedoch nicht auf den *VGL*-Promotoren von *Vitis vinifera* oder *Vitis rupestris*.

4.6.1.1 Deletionsanalysen des *VrGL*-Promotors

Um *cis*-regulatorische Elemente einzugrenzen, die an der SA-vermittelten Regulation beteiligt sind, wurden der *VrGL* Promotor verkürzt (s. Abb. 42) und mit dem Luziferasereportergen fusioniert. Die verschiedenen Deletionskonstrukte wurden um Bereiche verkürzt, auf denen sich *cis*-regulatorische Elemente, wie TCA- und SBF-1 Motive, befinden, denen in anderen Pflanzen eine Rolle bei der Genaktivierung nach Pathogenbefall zugesprochen wird. Für die Luziferaseexpressionsstudien wurden Protoplasten aus *Vitis vinifera* mit den

entsprechenden Promotor Fragmenten transient transformiert und mit verschiedenen Induktoren stimuliert.

Die Induzierbarkeit der Luziferaseexpression durch NaSA und BTH entspricht für das Δ 246- und dem Δ 568 Promotorfragment denen des -920 bp langen Promotors. Dies bedeutet, dass in diesen Bereichen keine *cis*-regulatorischen Elemente lokalisiert sind, die für eine NaSA- bzw. BTH vermittelte Aktivierung des Glukanase Promotors relevant sind. Bei dem Δ 111 Promotorfragment hingegen ist die Induzierbarkeit durch NaSA und BTH nicht vorhanden. Folglich muss ein *cis*-regulatorisches Element, welches die NaSA Induktion vermittelt in einem Bereich zwischen -246 und -111 liegen. Dafür würden verschiedene putative Boxen in Frage kommen, nämlich eine bei -182 lokalisierte BOX-4 oder Motive vom TCA-Typ, die bei -163 und -248 lokalisiert sind. Zusätzlich befinden sich 3 *cis*-regulatorische Elemente, die nach Verwundung eine Genaktivierung auslösen können in diesem Bereich, die aber für eine SA vermittelte Aktivierung weniger in Frage kommen. Nicht auszuschließen ist auch eine regulatorische Rolle von Domänen, welche durch die Datenbankrecherchen gar nicht erkannt werden. Um ein SA-responsive Element des *VrGL* Promotors isolieren zu können, müssen Punktmutationen der einzelnen *cis*-regulatorischen Elemente hergestellt werden und anschließende Luziferaseexpressionsstudien durchgeführt werden. In dieser Arbeit konnte lediglich der Bereich auf 135 bp eingeengt werden, auf dem ein putatives SA-responsive Element lokalisiert ist.

Eine *PR*-Gen Induktion durch den pep 13 Elicitor konnte in der stabil transformierten *VrGL/LUC* Linie jedoch nie beobachtet werden, wurde aber in das Experiment mit eingeschlossen, um zu Prüfen, ob eventuell *silencer* Regionen der verkürzten *VrGL* Promotoren für eine fehlende Induzierbarkeit verantwortlich sind. Die verkürzten Promotorbereiche zeigten jedoch nach pep 13 Applikationen ebenfalls keine Zunahme der Luziferaseaktivität. Eventuell ist die Einwirkdauer dieses Elicitors auf die Zellen im Hinblick auf eine *PR*-Gen Aktivierung von entscheidender Bedeutung, da pep 13 sehr empfindlich gegenüber proteolytischem Abbau ist (THORSTEN NÜRNBERGER, persönliche Mitteilung). Untersuchungen zu Protonenflüsse und der H_2O_2 Produktion geben darauf Hinweise, da für die früheste Reaktion, die Öffnung der Ionenkanäle eine deutlich geringere pep 13 Konzentration notwendig ist, als für die zeitlich verzögert einsetzende Produktion von H_2O_2 . Eine direkte Bildung von H_2O_2 als Folge des veränderten Ionenmilieus ist also nur bedingt gegeben. In Petersilie Zellsuspensionkulturen liegt der EC_{50} Wert für pep 13, der zu einer Alkalisierung des Mediums verantwortlich ist bei $1,9$ nM, für die H_2O_2 Produktion bei $6,9$ nM und für die Phytoalexinbiosynthese bei 31 nM (NÜRNBERGER *et al.*, 1994).

4.6.2 Die *VCH*-Promotoren

Vergleicht man die Promotoren der Chitinase mit denen der Glukanase in der Gesamtsequenz, findet man keine signifikanten Homologien. Betrachtet man jedoch die einzelnen *cis*-regulatorischen Elemente findet man gleiche putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wenn auch in unterschiedlicher Reihenfolge. Dazu gehören das SBF-1 Motiv und die G-Boxen. Eine W-Box ist ausschließlich an den *VCH*-Promotoren lokalisiert, ein BOX-4 hingegen Element konnte bei den *VCH*-Promotoren nicht gefunden werden. Der Vergleich beider Promotoren kann nur übereinen Bereich von 403 bp bzw. 433 bp durchgeführt werden, da die *VCH*-Promotoren nur über diesen Bereich isoliert wurden. Die *Northern blot* Analysen erbrachten eine nahezu identische Regulation beider *PR*-Gene, was eventuell auf funktionell konservierte Bereiche beider Promotoren zurückzuführen ist. G-Boxen und SBF-1 Motive kommen bei beiden Promotoren mehrfach vor und sind somit Kandidaten denen eine wichtige Rolle bei der Genaktivierung nach Pathogenbefall zugesprochen werden kann.

Detaillierte Aussagen über die Steuerung von Promotoren können aber nur dann gemacht werden, wenn einzelne *cis*-regulatorische Elemente mutiert werden und eine dadurch hervorgerufene Veränderung der Genexpression beobachtet wird.

4.7 Regeneration von transgener Weinrebe

Wie in Kap 3.3.3 gezeigt, ist eine systemische Induktion von *PR*-Genen nach Pathogenbefall weder in anfälligen- noch in resistenten *Vitis*-Arten zu beobachten. Ist die *PR*-Gen Aktivierung nur auf infizierte- oder benachbarte Zellen beschränkt, oder werden *PR*-Gene nach einer punktuellen Infektion eines Blattes im ganzen Blatt aktiviert? Um diese Fragen beantworten zu können wurden embryogene Zellkulturen mit dem *VrGL/LUC* Konstrukt transformiert. Das Luziferase-Reporter-System ermöglicht eine Detektion der Luziferasaktivität *in planta* (NEUMANN *et al.*, 1997).

Verfügte man über transgene Reben, hätte man die Möglichkeit die Aktivierung von *PR*-Genen in räumlicher und zeitlicher Auflösung mit hoher Genauigkeit zu betrachten. Die Transformation embryogener *Vitis vinifera* cv. Seyval wurde mittels *Agrobacterium tumefaciens* durchgeführt. In Abb. 44 sind positiv transformierte Zellkulturen abgebildet. Die Entwicklungsstadien der dort gezeigtenttransformierten Zellen umfassten das Oktaeder- bis Torpedostadium. Positiv transformierte Zellaggregate wurden auf neues Medium überführt um die Organogenese zu beschleunigen. Da diese Transformation erst gegen Ende deiser Arbeit durchgeführt wurden, konnten noch keine weiteren Ergebnisse dazu präsentiert werden. Denkbar wären dabei Untersuchungen mit Elicitoren, die zu einer systemischen *PR*-Gen Aktivierung führen. Arbeiten an stabil transformierten Pflanzen, die einen *PR*-Gen

Promotor mit einem Luziferasereporter exprimieren wurden bisher noch bei keinen mehrjährigen Pflanzen durchgeführt.

4.8 Untersuchungen zu elicitorvermittelten Protonenflüssen der Zellsuspensionskultur

Bei den Experimenten zur Öffnung von Ionenkanälen in der Plasmamembran der pflanzlichen Zellen, konnte eine Veränderung des pH-Werts nach Stimulierung verfolgt werden. Die daraus entstehende Alkalisierung des Mediums war nach Stimulation durch pep 13 stärker als nach Stimulation durch *HrpZ* in gleicher molarer Konzentration (Abb. 52). Die Geschwindigkeit mit der die Zellen auf die Elicitierung reagierten war ebenfalls unterschiedlich. Pep 13 bewirkte bereits nach 3 min den Beginn einer Alkalisierung und erreichte die maximale pH-Wertsänderung nach ca. 25 min. Im Unterschied dazu bewirkte die Stimulierung durch *HrpZ* erst nach ca. 13 min den Beginn einer Alkalisierung des Mediums und erreichte ein transientes Maximum nach 35 min. Die schnellere Reaktion der Zellkultur auf pep 13 könnte mit einer schnelleren Aufnahme des Elicitors zusammenhängen. Diese Experimente wurden mit der *Vitis rupestris* Zellkultur, deren Pflanzen resistent gegen Infektionen von *P. viticola* sind, durchgeführt. Die gleichen Untersuchungen mit *Vitis vinifera* Zellkulturen zeigten eine Alkalisierung des Mediums nur durch *HrpZ*, während pep 13 keine Reaktion auslöst (SILKE LACHMANN, persönliche Mitteilung).

Unterschiedliche Reaktionen der verschiedenen Elicitoren könnten zu einer Beurteilung von Resistenzinduktoren herangezogen werden. Während pep 13 eine schnelle Reaktion der Zellkultur auslöst, aber keine *PR*-Gen Induktion bewirkt, führt die Applikation von *HrpZ* auch zu einer Aktivierung von *PR*-Genen (Abb. 53). Eine Einteilung in verschiedene Elicitor Klassen bei resistenten- und anfälligen *Vitis*-Arten wäre vorstellbar.

4.9 Resistenzausbildung der Weinrebe gegenüber *Plasmopara viticola* nach Applikation verschiedener Resistenzinduktoren

Gelingt es Weinreben sich durch eine Aktivierung der eigenen Abwehrmechanismen gegen Pathogenbefall zu schützen, wäre dies eine wesentliche Ergänzung zum konventionellen Pflanzenschutz. Klassische Resistenzinduktoren wie SA und BTH (Bion), zeigten eine deutliche Aktivierung der *PR*-Genexpression, führten jedoch in Blattscheibentests nur zu einem unzureichendem Ergebnis (Abb. 54). Die Reduktion der Sporulation von *Plasmopara viticola* war in den unterschiedlichen NaSA- bzw. BTH Konzentrationen zwar feststellbar aber nicht signifikant. Auch *HrpZ*, welches zu einer Alkalisierung des Zellkulturmediums (Abb. 52) und zu einer *PR*-Genexpression führte, konnte die sporulierende Blattfläche

nicht reduzieren. Es scheint, dass die Aktivierung von *PR*-Genen in *Vitis vinifera* gegen Infektionen durch *Plasmopara viticola* nur eine untergeordnete Rolle spielt. Hinweise dazu findet man auch bei der Resistenzausbildung von mit BABA behandelten Pflanzen, an denen keine Aktivierung von *PR*-Genen beteiligt ist (ZIMMERLI *et al.*, 2000).

4.9.1 Die Resistenzinduktion durch β -Aminobuttersäure (BABA)

Der einzige bisher bekannte Resistenzinduktor der Weinrebe gegen Infektionen von *Plasmopara viticola* ist β -Aminobuttersäure (COHEN *et al.*, 1999). BABA induziert nicht nur Resistenzen gegen Oomyceten, sondern auch gegen Viren in Tabak (SIEGRIST *et al.*, 2000) und Bakterien in *Arabidopsis* (ZIMMERLI *et al.*, 2000). Untersuchungen in *Arabidopsis NahG*-Pflanzen, die nicht in der Lage sind SA zu akkumulieren, zeigten, dass die Resistenzausbildung gegen Oomyceten ohne Induktion von *PR*-Genen abläuft, nicht jedoch die Resistenzausbildung gegen Bakterien (ZIMMERLI *et al.*, 2000). Das breite Spektrum von Resistenzen BABA behandelter Pflanzen gegenüber verschiedenen Pathogenen, lässt auf einen komplexen Mechanismus schließen.

In allen Experimenten mit Blattscheiben und Gewächshauspflanzen an *Vitis vinifera* erzielte eine BABA (0,2%) Applikation eine starke Reduktion der Sporulation von *Plasmopara viticola*. Demgegenüber zeigte das Freilandexperiment (Abb. 56, Abb. 57) nur eine schwache Reduktion des Befalls durch *Plasmopara viticola* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Vegetationsperiode des Jahres 2001 in Freiburg zeichnete sich durch teilweise heftige Niederschläge und milde Temperaturen aus. Die Entwicklungsbedingungen für *Plasmopara viticola* waren optimal, so dass ein überdurchschnittlich starker Epidemieverlauf zu beobachten war. Unter diesen klimatischen Bedingungen und dem dadurch resultierenden hohen Infektionsdruck zeigte die Behandlung mit BABA keine signifikante Wirkung im Vergleich zur Kontrolle. Das zum Vergleich eingesetzte organisch-chemische Fungizid (Aktuan) zeigte eine deutliche Wirkung, die im biologischen Weinbau eingesetzte Kupferformulierung hingegen zeigte ähnlich wie BABA, eine deutlich geringere Wirksamkeit.

Eine Ursache, dass BABA in diesem Freilandexperiment nur eine geringe Wirksamkeit aufweist könnten die Applikationszeitpunkte sein. BABA wurde aufgrund der Witterungsbedingungen 2-3 Tage nach Infektionen durch *Plasmopara viticola* eingesetzt. Dies ist vermutlich zu spät um eine ausreichende Resistenz der Pflanzen zu induzieren und eine Schädigungen der Blätter und Infloreszenzen zu verhindern. Weiterhin stellten die beschriebenen Vegetationsbedingungen eine optimale Entwicklung für *Plasmopara viticola* dar. Bei vergleichsweise geringem Infektionsdruck könnte die durch BABA induzierte Resistenz ausreichen, um den Ausbruch einer Epidemie zu verhindern. COHEN zeigte, dass der Einsatz von BABA im Weinbau die Befallsstärke und -häufigkeit deutlich herabsetzen

kann (COHEN *et al.*, 2001). Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Experimente in Weinbergen auf den Golanhöhen durchgeführt wurden, die natürlich über ein wesentlich trockeneres Klima als der Oberrheingraben aufweisen. Auch muss betont werden, dass BABA als Lösung in Wasser ohne weitere Formulierung eingesetzt wurde. Eine geeignete Formulierung könnte die Aufnahme durch die Blattoberfläche und damit die Wirksamkeit der Substanz deutlich verbessern (YIGAL COHEN, persönliche Mitteilung).

Der Wirkmechanismus der Resistenzausbildung nach BABA-Behandlung an Pflanzen ist vielfältig. Eine BABA-Applikation an Gurke führt zum Beispiel zu einer Ausbildung von Papillen, exakt unterhalb möglicher Penetrationsstellen der Appressorien von *Colletotrichum laginarium* (CONRATH und KAUSS, 2000). Die Formation von Papillen wurde auch an *Arabidopsis* Pflanzen nach Infektion von *Plasmopara parasitica* gezeigt (ZIMMERLI *et al.*, 2000). Die Zusammensetzung der Papillen ist komplex, jedoch scheint die Einlagerung von Lignin und Kallose immer beteiligt zu sein (CONRATH und KAUSS, 2000). Eine Färbung von infizierten Blattscheiben nach BABA-Applikation durch Anillinblau ließ keinen endgültigen Schluss auf die Beteiligung von Kallose zu. Jedoch wird die Ausbreitung des Mycels im Blattgewebe stark gehemmt (

Abb. 58). TEM-Aufnahmen zeigten, dass die Haustorien von *Plasmopara viticola* nicht mehr in der Lage waren die pflanzlichen Zellen zu penetrieren. Es kam zu einer Papillenbildung, deren Zusammensetzung jedoch nicht endgültig geklärt werden konnten. Die Elektronendichte der Papillen zeigt eine ähnliche Struktur wie die der Zellwände, was auf Lignin und Polyglukane zurückzuführen ist (SPETH, persönliche Mitteilung). Hiermit konnte zunächst gezeigt werden, dass eine BABA Applikation der Weinrebe zu einer erfolgreichen gegen *Plasmopara viticola* führt, die auf eine Bildung von Papillen zurückzuführen ist.

Arbeiten zur Bildung von Kallose wurde im wesentlichen von KAUSS durchgeführt (KAUSS *et al.*, 1989; KAUSS *et al.*, 1991). Die Autoren berichten in ihren Arbeiten von einer konstitutiv exprimierten Kallosesynthase, die allosterisch durch Calcium aktiviert wird. Eine Calcium unabhängige Aktivierung von Kallosesynthasen konnte jedoch von LI und MESSIAN nachgewiesen werden (MESSIAN *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1997). Um eine mögliche transkriptionelle Regulation von Kallosesynthase nach BABA-Applikation zu untersuchen, wurden zunächst degenerierte Primer aus konservierten Bereichen bekannter Kallosesynthasen aus anderen Pflanzen hergestellt. Mittels PCR konnte ein 845 bp langes Fragment isoliert werden, welches hohe Homologien zu bekannten Kallosesynthasen aufweist. *Nothern blot* Analysen mit diesem Fragment als Sonde zeigten sich als äußerst schwierig. Eine Gesamt-RNA-Menge von 20 µg je Spur reichten nicht aus um ein Signal detektieren

zu können. Die RNA-Menge wurde auf 40 µg Gesamt RNA je Spur erhöht. Dies ermöglichte eine Detektion der radioaktiv markierten Sonde (Abb. 66). *Northern blot* Analysen zeigten, dass eine BABA-Behandlung in *Vitis*-Zellkulturen direkt zu einer Erhöhung der mRNA führt, was darauf hinweist, dass neben einer allosterischen Aktivierung der Kallo-synthese auch eine transkriptionelle Regulation stattfinden kann.

Die erfolgreiche Ausbildung von Papillen ist aber nicht der einzige Abwehrmechanismus, den Pflanzen nach BABA-Behandlung induzieren. Beobachtungen an Blattscheiben und Gewächshauspflanzen von *Vitis vinifera* zeigten nach einer Infektion von *Plasmopara viticola* die Bildung einer HR (hypersensitiven Reaktion). Dies konnte zunächst nur in resistenten Arten wie *Vitis rupestris* und *Vitis riparia* beobachtet werden (s. Abb. 6). Dieser Arbeit lag die Hypothese zu Grunde, dass resistente Arten (inkompatible Interaktion) im Rahmen einer Coevolution Rezeptoren entwickelt haben, die einen Befall durch *Plasmopara viticola* erkennen können und so Abwehrmechanismen wie eine Ausbildung einer HR oder schnelle Synthese von PR-Proteinen aktivieren. Das Auftreten einer HR in anfälligen *Vitis vinifera* Sorten nach BABA-Applikation und Infektion durch *Plasmopara viticola* gleicht einer Reaktion der resistenten Arten (Abb. 62). Es scheint, als ob BABA eine kompatible Wirt-Pathogen Interaktion in eine inkompatible verändert. Eine plausible Erklärung dieser Veränderung gibt es zunächst nicht. Eventuell verändert BABA die Spezifität von R-Genen, so dass diese sensibler gegenüber Pathogen werden. Diskutiert wird auch, dass BABA direkt in eine Signalkaskade eingreift und ihre Wirkungsweise verändert. Detailliertere Hinweise wird es wohl erst durch einen *Mutantenscreen* geben aus dem BABA insensitive Pflanzen isoliert werden können.

Ein weiteres Phänomen in diesem Zusammenhang ist, dass in Tabakpflanzen nach Besprühen der Pflanzen mit BABA-Lösung PR-Gene direkt aktiviert werden, während das Gießen von Pflanzen oder Stengelinjektion einer BABA-Lösung zu keiner PR-Gen Aktivierung führt (COHEN, persönliche Mitteilung). Die direkte Aktivierung von PR-Genen in Tabakpflanzen scheint eine Ausnahme zu sein, da in keiner bisher untersuchten Pflanze eine ähnliche Reaktion nachgewiesen werden konnte. In der Weinrebe führte sowohl ein Besprühen der Pflanzen genau wie ein Gießen zu einer Resistenzausbildung ohne direkte Aktivierung von PR-Genen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzen sind in der Lage, sich durch Aktivierung spezifischer Abwehrprogramme vor Pathogenen zu schützen. Die Mechanismen dieser Pathogenabwehr können bei verschiedenen Pflanzenarten unterschiedlich ausgeprägt sein. Oft führen lokale Infektionen durch ein Pathogen zur Resistenzausbildung gegen Sekundärinfektionen anderer Pathogene. Diese „Immunisierung“ beruht auf der Erkennung von Elicitoren. Solche Elicitoren sind in der Literatur oft beschrieben worden und können eine Resistenz induzieren. Zu den am besten untersuchten Elicitoren gehören pep 13, flg 22 (aus Flagellin) und Harpin-Proteine (*Hrp*). Die Resistenzinduktion dieser Elicitoren ist bei einer Reihe krautiger Pflanzen gut untersucht, nicht jedoch bei der mehrjährigen, verholzenden Rebe *Vitis vinifera*.

Um Elicitoren schnell und einfach auf ihre Induktionsfähigkeit von *PR*-Genen zu testen, wurden in der vorliegenden Arbeit eine Glukanase und eine Chitinase als exemplarische *PR*-Gene isoliert und deren Aktivierung nach Pathogenbefall durch *Northern blot* analysiert. Dabei zeigte sich, dass der zeitliche Verlauf dieser *PR*-Genexpression mit der Ausprägung der Resistenz unterschiedlicher *Vitis*-Arten korreliert. Dabei kommt es weder in anfälligen noch in resistenten *Vitis*-Arten zu einer systemischen Akkumulation der Transkripte. Zusätzlich wurden die Promotoren dieser *PR*-Gene aus *Vitis vinifera* und *Vitis rupestris* isoliert und mit einem Luziferasereporter gen fusioniert. Durch *particle bombardment* einer *Vitis rupestris* Zellkultur konnte dieses Promotor-Reporterkonstrukt stabil in das Genom integriert werden. Dieses *screening*-System bietet die Möglichkeit Substanzen, die potentielle Elicitoren darstellen, auf deren Wirksamkeit zur Aktivierung von *PR*-Genen in *Vitis* zu testen. Es konnte gezeigt werden, dass Salicylsäure (SA) und strukturanaloge Verbindungen die Glukanase-Promotor-Aktivität stark beeinflussen. Durch Promotoranalysen konnte ein Bereich, der für die Aktivierung durch Salicylsäure verantwortlich ist auf einen Bereich von 135 bp eingeschränkt werden.

Weiterhin wurde der Wirkmechanismus des Resistenzinduktors β -Aminobuttersäure (BABA) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass BABA zu keiner direkten Aktivierung von *PR*-Genen in *Vitis* führt. Vielmehr führt eine BABA-Applikation in *Vitis*-Zellkulturen zur Induktion von Kallosesynthase-Transkript und zur Ausbildung verkümmelter Haustorien von *Plasmopara viticola* durch die Bildung von Papillen.

Eine der frühesten Reaktionen von Zellkulturen nach Elicitorgabe ist die Öffnung von Ionenkanälen und damit verbundener Alkalisierung des Mediums. In der vorliegenden Arbeit, wurde die Messung dieses wesentlichen Parameters der Elicitorerkennung in *Vitis rupestris* Zellsuspensionkulturen angewendet. Dabei wurde zum ersten mal gezeigt, dass pep 13 in der Lage ist, die *Vitis rupestris* Zellen zu stimulieren.

6 ANHANG

6.1 Klonierung und Expression eines Harpins (*HrpZ*) aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Zunächst wurden Primer für ein *HrpZ* aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* entworfen, die zur Klonierung in einen Expressionsvektor pET 24a mit His-Tag dienen. Das *HrpZ*-Protein ist leicht sauer, hitzestabil und reich an Glycin. Es besitzt eine Größe von etwa 35 kDa.

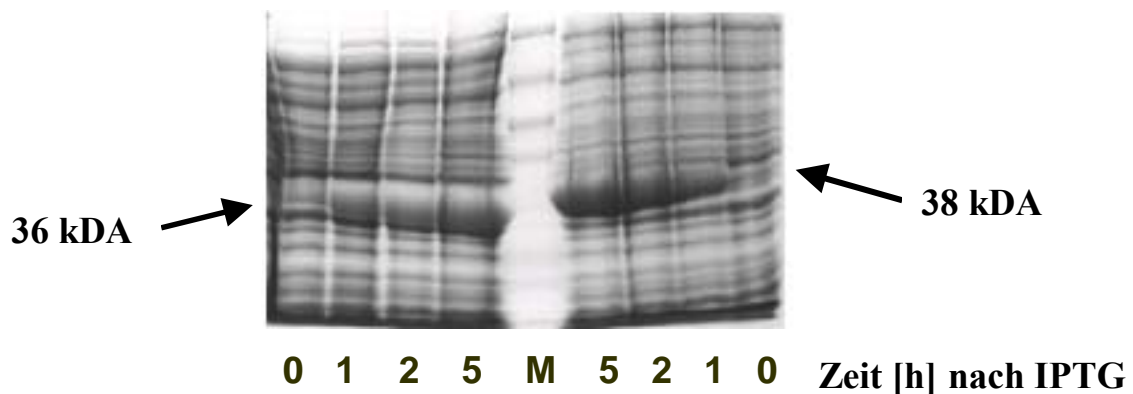


Abb. 67: Überexpression des *HrpZ* aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bakterien. Das *HrpZ*-Gen wurde in einen Expressionsvektor ohne His-Tag (links) und mit His-Tag (rechts) zur Überexpression in Bakterien (BL21) transformiert. Je 10 µl der Gesamtproteinextrakte aus denaturierend aufgeschlossenen Bakterien wurden elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Die verschiedenen Spuren zeigen die Proteinextrakte aus Zellen in denen die Expression durch IPTG induziert wurde. Als Marker M wurde 7B verwendet.

In Abb. 52 ist die Zunahme der Proteinexpression nach IPTG-Gabe deutlich zu erkennen. Die Größenzunahme um ca. 2 kDa durch die Klonierung in den His-Tag Vektor ist ebenfalls gut sichtbar.

6.2 Untersuchungen zum Infektionsvorgang von *Plasmopara viticola*

Um ein besseres Verständnis von Wirt-Pathogen-Interaktionen zu erhalten, ist es unumgänglich, Einblicke in die Biologie des Pathogens zu erhalten. Zu Beginn der Infektion der Weinrebe durch *Plasmopara viticola* steht das Anheften der Zoosporen an den Spaltöffnungen (s. Abb. 4). Zunächst wurden Untersuchungen an Pflanzen verschiedener *Vitis* Arten, aber auch aus der Familie der Vitaceae gemacht. Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang war das Auffinden bzw. die Anheftung der Zoosporen an die Spaltöffnun-

gen. Arbeiten zu diesem Thema wurden im wesentlichen von KARL ARENS durchgeführt (ARENS, 1927). ARENS geht von einem chemischen Signal aus, welches durch die Spaltöffnungen diffundiert und *Plasmopara viticola* anlockt. Der Nachweis einer chemotaktischen Beteiligung konnte trotz zahlreicher Bemühungen nicht gezeigt werden. Zudem beschreibt Arens, dass sich Zoosporen auf Querwänden von *Phyllitis Scolopendriume* (Hirschezungenfarne) festsetzten, welches im klaren Widerspruch eines chemotaktischen Reizes steht. Vielmehr deutet dieses Verhalten auf Oberflächenstrukturen hin, die eine Anheftung der Zoosporen bewirken.

Werden die Zoosporen von Substanzen der Pflanze zu den Spaltöffnungen gelockt (Chemotaxis), oder finden die Zoosporen ihr Ziel ohne Lockstoffe oder kann die Auskeimen der Zoosporen durch oberflächliche Reize der Pflanze beeinflusst werden? Um diese Fragen zu klären wurde ein Versuchsansatz entwickelt, in dem Blattscheiben von *Vitis vinifera* auf verschiedene Arten entfärbt wurden. Darunter 1M KOH mit anschließendem Autoklavieren (20 min 120°C; 1,1 bar), 90 % Ethanol und TCA-Chloroform. Diese Blattscheiben wurden nach diesen Behandlungen über Nacht in einem 5 l Gefäß unter ständiger Frischwasserzufuhr gewässert. Anschließend wurden diese Blattscheiben mit einer Zoosporensuspension von *Plasmopara viticola* inkubiert, mit Anilinblau gefärbt und unter dem Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

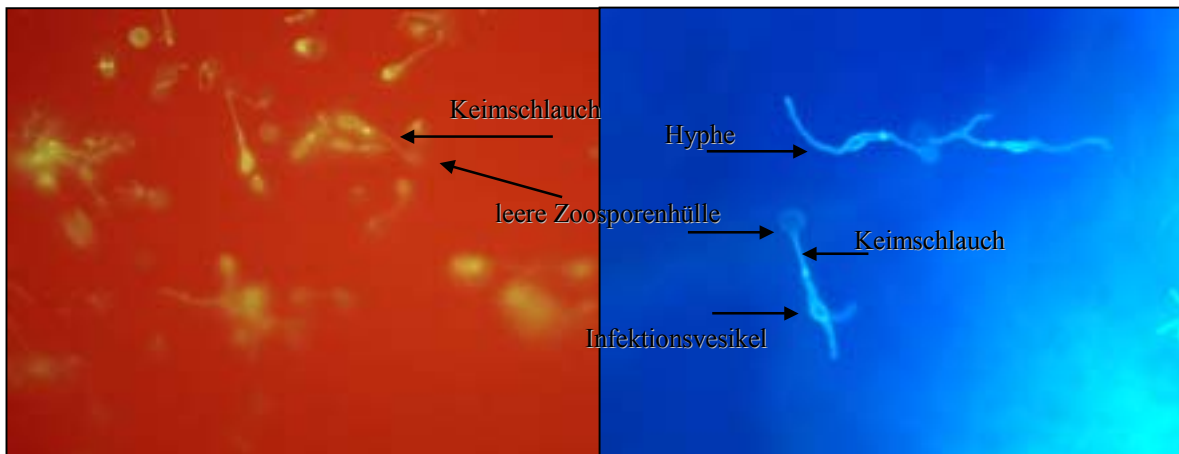


Abb. 68: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von gekeimten Zoosporen von *P. viticola* nach Inkubation mit entfärbten Blattscheiben von *Vitis vinifera*. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden durch 1 M KOH (linkes Bild) oder TCA Chloroform (rechtes Bild) entfärbt und anschließend mit Zoosporen von *P. viticola* inkubiert. Die Aufnahmen entstanden 6 Stunden nach Applikation. Die Ausbildung eines Keimschlauches und des Infektionsvesikels ist deutlich zu erkennen. Die Färbung erfolgte durch Anilinblau.

Abb. 68 zeigt, dass die Zoosporen unter den oben aufgeführten Bedingungen einen Keimschlauch und ein Infektionsvesikel ausbilden, sich jedoch anders als bei lebendem Gewebe

nicht Anheften. Unter natürlichen Infektionsverlauf findet die Ausbildung dieser Strukturen bereits im Blattgewebe statt (Abb. 4). Die in Abb. 68 dargestellten Bilder wurden nicht unmittelbar auf der Blattoberfläche aufgenommen, sondern direkt unterhalb des Deckglases, d. h. die gekeimten Zoosporen flottieren, verfügen also über eine geringere Dichte als Wasser. Es scheint, dass die Induktion der Keimschlauchbildung und die Ausbildung eines Primärvesikels nicht auf Stoffwechselprodukte von lebendem Gewebe zurückzuführen ist, sondern auf Signale, die an der Blattoberfläche zu finden sind. Diese Signalsubstanzen sind weder durch 1 M KOH mit anschließendem Autoklavieren, 90 %iger Ethanolbehandlung oder TCA-Chloroform Inkubation zu entfernen. Eine mögliche Beteiligung von in Wasser löslichen Substanzen kann ausgeschlossen werden, da als Kontrolle die Zoosporen im Wasch-Wasser der entfärbten Blattscheiben nie einen Keimschlauch bildeten. Dies deutet darauf hin, dass bei der Anheftung der Zoosporen an die Spaltöffnungen entweder chemische Signale des lebenden Gewebes, oder Oberflächenstrukturen, die durch die Entfärbung verändert wurden, beteiligt sind. Die frühen Stadien dieser Wirt-Pathogen Interaktion sind komplex. Unter den oben aufgeführten Bedingungen geht die Anheftung der Zoosporen völlig verloren, jedoch wird die Ausbildung eines Keimschlauches induziert.

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	PR-Proteine	9
Tab. 2:	Einfluss der Antibiotikakonzentrationen auf das Wachstum der <i>Vitis rupestris</i> Zellkultur. Es wurde sowohl Kanamycin (Kan), als auch G-418 getestet. Das Wachstum der Zellen auf kanamycinhaltigem Medium wurde durch eine Konzentration von 50 mg/l deutlich gehemmt, während das Wachstum auf G-418 haltigem Medium schon ab einer Konzentration von 25 mg/l stark reduziert wurde. + bedeutet gutes Wachstum, - bedeutet deutliche Wachstumshemmung.....	66
Tab. 3:	Relative Transformationsrate bei Variation verschiedener <i>PIG</i> Parameter. Parameter, die variiert wurden sind jeweils grau unterlegt.....	68

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Flor's Gen für Gen Modell. Für eine Ausbildung der Resistenz (Inkompatibilität) müssen komplementäre Paare dominanter Gene, eines beim Wirt und eines beim Pathogen zusammenkommen. Eine Veränderung, ein Fehlen eines Resistenzgens der Pflanze (R wird zu <i>r</i>) oder eines Avr Genes des Pathogens (Avr wird zu <i>avr</i>) führt zu Krankheit (kompatibel). (Nach BUCHANAN <i>et al.</i> , 2001, verändert).....	4
Abb. 2:	Strukturformel von β -Aminobuttersäure (BABA).....	7
Abb. 3:	Übersicht der Signaltransduktionkaskaden, die die Abwehrantwort von Pflanzen gegenüber Pathogenen aktivieren und koordinieren. Pflanzenrezeptoren (Rp) werden nach Pathogenbefall durch Avr Gene, physikalischen Kontakt oder generellen Komponenten der beteiligten Organismen, wie Chitin, Enzymen oder Zellwandfragmenten der Pflanze, aktiviert. Die genauen Komponenten der Signaltransduktion sind nicht bekannt, aber es sind Kinasen, Phosphatasen, G-Proteine und Ionenflüsse beteiligt. Reaktionen wie der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxyd (NO), sowie die Induktion von Abwehrgenen oder möglichen Genen, die an der Apoptosis beteiligt sind. Eine Verstärkung der initialen Antwort erfolgt über Signalmoleküle wie Lipidperoxide, Benzoessäure (BA), Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen (C ₂ H ₄). Diese induzieren wiederum andere „defense related genes“ und modifizieren Abwehrproteine und Enzyme. Begleitende Veränderungen des zellulären Redoxstatus oder Zellverwundungen aktivieren präformierte Mechanismen zum Zellschutz (z. B. der Halliwell-Asada Zyklus, plastidäre Superoxiddismutase [SOD] und Katalasen). Ebenso koordiniert ein sogenannter „cross-talk“ zwischen den einzelnen aktivierten Signalkaskaden die Abwehrantwort. Ein grüner Pfeil deutet eine positive-, einer roter Block eine negative Interaktion an. ACC, Aminocyclopropan-1-carboxysäure; BAG, Benzoessäure; BA-2H, Benzoessäure-2-hydroxylase; CA, Zimtsäure; cGMP, zyklisches Guanosin-5'-monophosphat; CHS, Chalkonsynthase; EFE, Ethylen bildendes Enzym; GP, Glutathionperoxidase; GST, Glutathion-S-transferase; HMGR, 3'-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktase; HO ₂ [°] , Hydroperoxy Radikal; HPDase, Hydroxyperoxiddehydrase; MAP, mitogen-aktivierendes Protein, NO, Stickstoffmonoxid; OH [°] , Hydroxylradikal; OGA und OGA-R, Oligogalakturonid-Fragmente und Rezeptor; PAL, Phenylalaninammoniumlyase; PGases, Polygalakturonidase; PM, Plasmamembran; SA [°] , Salicylsäureradikal; SAG Salicylsäureglukoside; SIPK, Salicylsäure induzierte Proteinkinase; WIPK, Verwundung induzierte Proteinkinase. (Nach BUCHANAN <i>et al.</i> , 2001, verändert).....	11
Abb. 4:	Entwicklungszyklus von <i>Plasmopara viticola</i> . Der sexuelle Zyklus ist mit roten, der asexuelle mit grünen Pfeilen hervorgehoben. Braun sind Stadien gekennzeichnet, die in beiden Zyklen vorkommen (nach Schöpe).....	16
Abb. 5:	Infektionen von <i>Plasmopara viticola</i> an <i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau. Bild A zeigt die Sporangienträger von <i>P. viticola</i> an einer Blattunterseite. Bild B zeigt den Befall an Gescheinen, welches in einem späteren Stadium zu den sogenannten Lederbeeren führt (Bild C).....	44
Abb. 6:	Infektionen von <i>Plasmopara viticola</i> an einem Blatt von <i>Vitis rupestris</i> . 5 dpi mit <i>P. viticola</i> ist die Bildung von Lokalnekrosen erkennbar. Die Bildung solcher Nekrosen ist die typische	

	Abwehrreaktion einer HR und an den bräunlichen Verfärbungen der Zellen um eine Infektionsstelle erkennbar.....	45
Abb. 7:	Mikroskopische Aufnahme von Zellsuspensionkulturen. Das linke Bild zeigt Zellen der Zellsuspensionskultur von <i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau, das rechte Bild von <i>Vitis rupestris</i>	46
Abb. 8:	Wachstum der verwendeten <i>Vitis rupestris</i> Zellsuspensionskultur. 10 ml einer zwei Wochen alte <i>Vitis rupestris</i> Zellkultur wurden in 40 ml frisches MS-Medium steril überimpft und zu den angegebenen Zeitpunkten das Frischgewicht bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Parallelen.....	47
Abb. 9:	Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenz der Glukanase-cDNA (<i>VGL-AJ277900</i>). Startcodon, Stopcodon und Signalpeptid sind durch Fettdruck hervorgehoben. Das für Glykosylhydroxylasen typische Sequenzmotiv ist fettgedruckt und unterstrichen dargestellt.....	48
Abb. 10:	<i>In vivo</i> Lokalisation des Glukanase- <i>GFP</i> Fusionsproteins in Petersilie Protoplasten. Die im Durchlicht (links) und unter UV-Anregung (rechts) im Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder repräsentieren einen identischen Bildausschnitt. Die untere Zelle ist nicht transformiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Zellkern und die Vacuole nicht leuchten, während das Cytoplasma eine starke Fluoreszenz aufweist. Vc Vacuole, Ct Cytoplasma, Nc Nucleolus.....	49
Abb. 11:	Infektion eines Blattes der Pflanze <i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau nach Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> 9 dpi. Eine ca. 8 Wochen alte Pflanze wurde an einem Blatt mit einer Sporensuspension ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) von <i>P. viticola</i> infiziert (lokal). 9 dpi sind deutlich die Schädigungen des Blattgewebes zu erkennen. Das direkt darüber liegende (systemische) Blatt wurde nicht infiziert und zeigt keine Schädigungen. Die RNA beider Blätter wurden für <i>Northern blot</i> Analysen herangezogen.....	50
Abb. 12:	<i>Northern blot</i> Analyse der <i>VGL</i> Expression in Blättern von <i>Vitis vinifera</i> nach Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> . Je ein Blatt einer gesunden <i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau Pflanze wurde mit <i>Plasmopara viticola</i> ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils lokal infizierte Blatt und das erste darüberliegende Blatt (systemisch) wurde in den angegebenen Zeitintervallen nach der Infektion geerntet. Pro Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der <i>VGL</i> -Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA-Etbr gefärbt) abgebildet.....	51
Abb. 13:	<i>Northern blot</i> Analyse der <i>VGL</i> Expression in Blättern von <i>Vitis rupestris</i> nach Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> . Je ein Blatt einer gesunden <i>Vitis rupestris</i> Pflanze wurde mit <i>Plasmopara viticola</i> ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils lokal infizierte Blatt und das erste darüberliegende Blatt (systemisch) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion geerntet. Je Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der <i>VGL</i> -Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA-Etbr gefärbt) abgebildet.....	51
Abb. 14:	<i>Northern blot</i> Analyse der <i>VGL</i> Expression in Blättern von <i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau nach Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> . Je ein Blatt einer <i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau Pflanze wurde mit <i>Plasmopara viticola</i> ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils infizierte Blatt wurde in Zeitintervallen von 12 Stunden nach Infektion geerntet. Pro Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit <i>VGL</i> hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.....	52
Abb. 15:	<i>Northern blot</i> Analyse der <i>VGL</i> Expression in Blättern von <i>Vitis rupestris</i> nach Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> . Je ein Blatt einer <i>Vitis rupestris</i> Pflanze wurde mit <i>Plasmopara viticola</i> ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils infizierte Blatt wurde in Zeitintervallen von 12 Stunden nach Infektion geerntet. Pro Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit <i>VGL</i> hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.....	53
Abb. 16:	<i>Northern blot</i> Analyse der <i>VGL</i> Expression in Blättern von <i>Vitis riparia</i> nach Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> . Je ein Blatt einer <i>Vitis riparia</i> Pflanze wurde mit <i>Plasmopara viticola</i> ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils infizierte Blatt wurde in Zeitintervallen von 12 Stunden nach Infektion geerntet. Pro Spur wurden 20 μg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit <i>VGL</i> hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.....	53

Abb. 17: Gehalt an freier Salicylsäure (SA) in Blättern von <i>Vitis vinifera</i> nach Infektion durch <i>P. viticola</i>. 7 Pflanzen wurden mit einer Sporangienlösung von <i>P. viticola</i> ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml ⁻¹) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine SA Extraktion durchgeführt. Der Gehalt an freier SA wurde in Bezug zum Frischgewicht (FG) der Blätter gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen.....	54
Abb. 18: Northern blot Analyse der VGL Expression in Blättern von <i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau nach Infektion mit <i>Uncinula necator</i> . Je ein Blatt einer gesunden <i>Vitis vinifera</i> Pflanze wurde mit <i>Uncinula necator</i> infiziert. Das jeweils infizierte Blatt wurde 5 d bzw. 8 d nach Infektion geerntet. Pro Spur wurden 20 µg Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit VGL hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.....	55
Abb. 19: Sequenzvergleich der Glukanase Promotoren aus <i>Vitis rupestris</i> (<i>VrGL</i>) und <i>Vitis vinifera</i> (<i>VvGL</i>). Cis-regulatorische Elemente, die in der Literatur durch die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren charakterisiert sind oder denen eine regulatorische Funktion nachgewiesen wurde, sind grün hervorgehoben. Die core-Sequenz der Matrix ist jeweils durch Fettdruck, der mögliche Transkriptionsstart blau hervorgehoben. Die roten Pfeile bzw. Buchstaben zeigen das 5' Ende der Deletionskonstrukte (DEL-I,II,III) an.....	57
Abb. 20: Anordnung putativer cis-regulatorischer Elemente innerhalb des -920 <i>VrGL</i> Promotors. Spezifische cis-regulatorische Elemente sind durch farbige Symbole repräsentiert. Die roten Pfeile geben die Positionen von 3 unterschiedlich verkürzten Promotorkonstrukten an.....	60
Abb. 21: Ausschnitt einer linearen Vektorkarte des <i>VrGL/LUC</i> Plasmids. Als Ausgangsvektor wurde der luc ⁺ Vektor (Promega) verwendet. Die Größe des vollständigen Plasmids umfasst ca. 5.7 kb.....	61
Abb. 22: Luziferaseexpression von Petersilie-Protoplasten nach transients Transformation mit <i>VrGL/LUC</i> . Protoplasten wurden mit 75µg DNA des <i>VrGL/LUC</i> -Plasmid transformiert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Salicylsäure (NaSA-50µM) oder mit H ₂ O behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Luziferaseaktivität gegen die Zeit aus drei parallelen Messungen.....	62
Abb. 23: Luziferase Expression des <i>VrGL/LUC</i> Plasmids in Petersilieprotoplasten. Protoplasten wurden mit 75µg DNA des <i>VrGL/LUC</i> -Plasmid transformiert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde mit Salicylsäure (NaSA-50µM) oder mit H ₂ O behandelt. Zur Ermittlung der relativen Induktion wurde das Integral der Kurven aus Abb. 22 gebildet und zur Expression der Kontrolle in Bezug gesetzt.....	62
Abb. 24: Luziferaseexpression von <i>Vitis rupestris</i> Protoplasten nach transients Transformation mit <i>VrGL/LUC</i> . Protoplasten wurden mit 75µg DNA des <i>VrGL/LUC</i> -Plasmid transformiert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Salicylsäure (NaSA-50µM) oder mit H ₂ O behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Luziferaseaktivität gegen die Zeit aus drei parallelen Messungen.....	63
Abb. 25: Luziferase Expression des <i>VrGL/LUC</i> Konstruktes in <i>Vitis rupestris</i> Protoplasten. Protoplasten wurden mit 75µg DNA des <i>VrGL/LUC</i> -Plasmid transformiert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde mit Salicylsäure (NaSA-50µM) oder mit H ₂ O behandelt. Zur Ermittlung der relativen Induktion wurde das Integral der Kurven aus Abb. 24 gebildet und zur Expression der Kontrolle in Bezug gesetzt.....	64
Abb. 26: Luziferaseexpression von <i>Vitis rupestris</i> Protoplasten nach transients Transformation mit <i>VvGL/LUC</i> . Protoplasten wurden mit 75µg DNA des <i>VvGL/LUC</i> -Plasmid transformiert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Salicylsäure (NaSA-50µM) oder mit H ₂ O behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Luziferaseaktivität gegen die Zeit aus drei parallelen Messungen.....	64
Abb. 27: Ausschnitt einer linearen Vektorkarte des <i>VrGL/LUC</i> Plasmids mit Kanamycinresistenz. Als Ausgangsvektor wurde das <i>VrGL/LUC</i> Plasmid (Abb. 21) verwendet. Die Resistenzkassette umfasst die codierende Sequenz des <i>NTP-II</i> Gens, welches unter der Kontrolle eines 35S-Promotors konstitutiv exprimiert wird. Die Größe des vollständigen Plasmids umfasst ca. 8,6 kb. 65	65
Abb. 28: Positiv transformierte <i>Vitis rupestris</i> Zelle.....	67
Abb. 29: Wachstum von Wildtyp- und stabil transformierten <i>Vitis rupestris</i> Zellen auf G-418-haltigem Medium. Die rechte Bildhälfte zeigt Zellen von <i>Vitis rupestris</i> , die mit dem <i>VrGL/LUC</i> -Konstrukt beschossen wurden und auf selektivem ½ MS-Festmedium (25 mg/l G-418) 8 Wochen bei 23°C inkubiert wurden. Zum Vergleich ist links eine Kontrollplatte mit nicht	

	transformierten Wildtypzellen abgebildet, die nach 8 Wochen keinerlei Wachstum auf dem selektiven Medium zeigen.	69
Abb. 30:	<i>Screening</i> der <i>VrGL/LUC</i> Linien mit der CCD Kamera. Von separat kultivierten Einzellinien wurde Zellen abgenommen und auf die nummerierten Felder einer Platte mit ½ MS-Festmedium überführt. Die Zellen wurden mit einer 50 µM NaSA-Lösung besprüht und anschließend 1 Stunde bei 23°C im Dunkeln gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit einer 1 mM Luziferinlösung besprüht und die Luziferaseaktivität mit der CCD Kamera bestimmt. Zur späteren Zuordnung wurden Aufnahmen der Platten gemacht bevor die Detektion der Photonen in der lichtdichten Aufnahmekammer erfolgte.	70
Abb. 31:	Luziferaseexpression transgener Zelllinien. Zellsuspensionskulturen der verschiedenen transgenen <i>VrGL/LUC</i> Linien wurden mit 50 µM NaSA behandelt und im Biolumat analysiert. Aufgetragen ist die Zahl emittierter Photonen pro Zeitintervall.	71
Abb. 32:	Relative Induktion der Luziferase Expression der transgenen <i>VrGL/LUC</i> Linien. Die Daten aus der NaSA behandelten Proben aus Abb. 31 wurde in Bezug auf die mit H ₂ O behandelten Kontrollen gesetzt.	71
Abb. 33:	Transkriptakkumulation der endo-genen Glukanase und des Luziferase- Reportergens in der <i>VrGL/LUC</i> Linie. Zellsuspensionskulturen wurden bei 120 rpm geschüttelt und mit BTH (50 µM) oder H ₂ O inkubiert. Dargestellt ist die Akkumulation der Transkripte (<i>LUC</i> , Luziferase; <i>VGL</i> , Glukanase). Aufgetragen wurden 20 µg Gesamt-RNA. Zur Beladungskontrolle ist die ribosomale RNA (rRNA) nach Färbung durch Etbr und unter UV-Anregung dargestellt.	72
Abb. 34:	<i>Northern blot</i> Analyse der <i>VrGL/LUC</i> Linie nach Applikation von BTH (50 µM) und NaSA (50 µM). Zell-suspensionskulturen der <i>VrGL/LUC</i> Linie wurden bei 120 rpm mit BTH bzw. NaSA induziert und zu den angegeben Zeitpunkten der RNA Isolation überführt. Zum Zeitpunkt 24 Stunden wurde RNA der mit H ₂ O behandelten Kontrolle (K) isoliert. Zur Beladungskontrolle ist die ribosomale RNA (rRNA) nach Färbung durch Etbr und unter UV-Anregung dargestellt.	73
Abb. 35:	Induktionskinetik der Luziferaseexpression in der <i>VrGL/LUC</i> Linie nach Applikation von Natriumsalicylat (NaSA). Die <i>in vivo</i> gemessene spezifische Luziferaseaktivität wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden nach Zugabe von NaSA verfolgt. Jeder Messpunkt gibt den Mittelwert von 3 Parallelen wieder.	74
Abb. 36:	Relative Induktion der Luziferase Expression in der <i>VrGL/LUC</i> Linie. Zellen wurden mit NaSA oder mit H ₂ O stimuliert. Zur Ermittlung der relativen Induktion wurde das Intergral der Kurven aus Abb. 35 gebildet und mit der Grundexpression, der mit Wasser behandelten Kontrolle in Bezug gesetzt.	75
Abb. 37:	Induktionskinetik der Luziferaseexpression in der <i>VrGL/LUC</i> Linie nach Applikation von BTH. Die <i>in vivo</i> gemessene spezifische Luziferaseaktivität wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden nach Zugabe von BTH verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von 3 parallelen Messungen.	75
Abb. 38:	Relative Induktion der Luziferase Expression in der <i>VrGL/LUC</i> Linie. Zellen wurden mit BTH oder mit H ₂ O stimuliert. Zur Ermittlung der relativen Induktion wurde das Intergral der Kurven aus Abb. 37 gebildet und mit der Expression, der mit Wasser behandelten Kontrolle in Bezug gesetzt.	76
Abb. 39:	<i>In vitro</i> Luziferaseexpression der <i>VrGL/LUC</i> Linie nach NaSA Applikation. Zellen der <i>VrGL/LUC</i> Linie wurden auf dem Schüttler (120 rpm) mit 50 µM NaSA oder H ₂ O stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Luziferaseaktivität <i>in vitro</i> bestimmt.	77
Abb. 40:	Induktionskinetik der Luziferaseexpression in der <i>VrGL/LUC</i> Linie nach Applikation von BTH und NaSA. Die <i>in vivo</i> gemessene spezifische Luziferaseaktivität wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden verfolgt. Die erste Messung der Luziferaseaktivität erfolgte 3 Stunden nach Stimulierung. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung aus 3 parallelen Messungen.	78
Abb. 41:	Relative Induktion der Luziferase Expression in der <i>VrGL/LUC</i> Linie. Zellen wurden mit BTH, NaSA oder mit H ₂ O stimuliert. Zur Ermittlung der rel. Induktion wurde das Intergral der Kurven aus Abb. 40 gebildet und mit der Grundexpression, der mit Wasser behandelten Kontrolle in Bezug gesetzt.	79
Abb. 42:	Schematische Anordnung der Deletionskonstrukte des <i>VrGL</i> Promotors. Die Promotorfragmente wurden durch PCR amplifiziert und in den <i>luc+</i> Vektors inseriert.	80

Abb. 43:	Luziferaseexpression der Deletionskonstrukte nach Applikation verschiedener Induktoren in <i>Vitis</i> -Protoplasten. Die verschiedenen Ansätze wurden mit 50 μ M BTH, 50 μ M NaSA oder mit 100 nM pep 13 induziert. Die Kontrollzellen wurden mit Wasser behandelt. Die spez. Luziferaseaktivität der Proben ist auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Die Daten stellen die Mittelwerte von 3 Parallelen dar. Da der rel. Fehler unter 2% lag wurde auf Fehlerbalken verzichtet.	82
Abb. 44:	<i>Screening</i> der embryogenen Zellkultur nach <i>VvGL/LUC</i> Linien mit der CCD Kamera. Embryogene Zellkulturen von <i>Vitis vinifera</i> cv. Seyval wurden über <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mit dem <i>VvGL/LUC</i> Konstrukt transformiert. Die Zellen wurden mit einer 1 mM Luziferinlösung besprüht und die Luziferaseaktivität mit der CCD Kamera bestimmt. Zur späteren Zuordnung wurden Hellfeldaufnahmen (linkes Bild) der Platten gemacht, bevor die Detektion der Photonen in der lichtdichten Aufnahmekammer (rechtes Bild) erfolgte. Die Pfeile zeigen eine Luziferaseaktivität an.....	83
Abb. 45:	<i>Northern blot</i> Analyse der <i>VCH</i> Expression in Blättern von <i>Vitis vinifera</i> nach Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> . Je ein Blatt einer gesunden <i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau Pflanze wurde mit <i>Plasmopara viticola</i> ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils lokal infizierte Blatt und das erste darüberliegende Blatt wurde in Zeitintervallen nach Infektion geerntet. Je Spur wurden 20 μ g Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der <i>VCH</i> Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.	84
Abb. 46:	<i>Northern blot</i> Analyse der <i>VCH</i> Expression in Blättern von <i>Vitis rupestris</i> nach Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> . Je ein Blatt einer gesunden <i>Vitis rupestris</i> Pflanze wurde mit <i>Plasmopara viticola</i> ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Das jeweils lokal infizierte Blatt und das erste darüberliegende Blatt wurde in Zeitintervallen nach Infektion geerntet. Je Spur wurden 20 μ g Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der <i>VCH</i> Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.	85
Abb. 47:	<i>Northern blot</i> Analyse der <i>VCH</i> -Expression in Blättern von <i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau nach Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> . Je ein Blatt einer gesunden <i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau Pflanze wurde mit <i>Plasmopara viticola</i> ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Je Spur wurden 20 μ g Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der <i>VCH</i> Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.	85
Abb. 48:	<i>Northern blot</i> Analyse der <i>VCH</i> Expression in Blättern von <i>Vitis rupestris</i> nach Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> . Je ein Blatt einer gesunden <i>Vitis rupestris</i> Pflanze wurde mit <i>Plasmopara viticola</i> ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Je Spur wurden 20 μ g Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der <i>VCH</i> Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.	86
Abb. 49:	<i>Northern blot</i> Analyse der <i>VCH</i> Expression in Blättern von <i>Vitis riparia</i> nach Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> . Je ein Blatt einer gesunden <i>Vitis riparia</i> Pflanze wurde mit <i>Plasmopara viticola</i> ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml^{-1}) infiziert. Je Spur wurden 20 μ g Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der <i>VCH</i> Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.	86
Abb. 50:	Sequenzvergleich der Chitinase Promotoren. <i>Cis</i> -regulatorische Elemente, die in der Literatur durch die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren charakterisiert sind oder denen eine regulatorische Funktion nachgewiesen wurde, sind grün hervorgehoben. Die <i>core</i> -Sequenz der Matrix ist jeweils durch Fettdruck, der mögliche Transkriptionsstart blau hervorgehoben.	87
Abb. 51:	Anordnung putativer <i>cis</i> -regulatorischer Elemente innerhalb des -433 <i>VCH</i> Promotors. Spezifische <i>cis</i> -regulatorische Elemente sind durch farbige Symbole repräsentiert.	88
Abb. 52:	<i>pH-Shift</i> im Medium von <i>Vitis rupestris</i> Zellkulturen nach Elicitierung mit einem Harpin Protein (<i>HrpZ</i>) bzw. pep 13. <i>HrpZ</i> bzw. pep 13 wurde in einer Endkonzentration von 100 nM eingesetzt und die Änderung des pH-Wertes wurde über einen Zeitraum von 75 min verfolgt.	90
Abb. 53:	Luziferaseexpression der <i>VrGL/LUC</i> Linie nach Stimulation verschiedener putativen Resistenzinduktoren. Zur Ermittlung der relativen Induktion wurde das Integral aus den Mittelwerten der Induktionskinetiken gebildet und mit der Grundexpression, der mit Wasser behandelten Kontrolle, in Bezug gesetzt.	91
Abb. 54:	Durchschnittliche prozentuale Sporulation auf Blattscheiben von <i>Vitis vinifera</i> cv. Müller-Thurgau nach Applikation verschiedener Substanzen und anschließender Inokulation mit <i>P. viticola</i> . Jeweils 6 Blattscheiben wurden auf Lösungen mit den unterschiedlichen Resistenzinduktoren inkubiert. 24 Stunden später wurde mit einer Sporangiensuspension von	

- P. viticola* (5×10^4 /ml) inokuliert. Die Bonitur erfolgte nach 5 dpi unter einem Binokular. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 Blattscheibenbonituren mit Standardabweichung.....92
- Abb. 55: Durchschnittliche prozentuale Sporulation auf der Blattgesamtläche von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Applikation verschieden-er BABA Konzenztrationen und anschließender Inokula-tion mit *Plasmopara viticola*. Bonitiert wurde die Sporulation auf der Blattgesamtläche von jeweils 3 Pflanzen. Der Standardfehler aus der Bonitur von 52- (0 mg/l), 58- (250 mg/l), 54- (500 mg/l) bzw. 61 Blättern (1000 mg/l) ist angegeben.....93
- Abb. 56: Vergleich der Befallsstärke- und Befallshäufigkeit von *Plasmopara viticola* an Blättern von *Vitis vinifera* cv. Pinot noir. 7 Applikationen von BABA, Aktuan oder Kupfer wurden durchgeführt. Die Bonitur erfolgte Anfang Juli. Da der rel. Fehler unter 2 % lag wurde auf Fehlerbalken verzichtet. Erklärungen siehe Text.....94
- Abb. 57: Vergleich der Befallsstärke- und Befallshäufigkeit von *Plasmopara viticola* an Blättern von *Vitis vinifera* cv. Pinot noir. 7 Applikationen von BABA, Aktuan oder Kupfer wurden durchgeführt. Die Bonitur erfolgte Ende August. Da der rel. Fehler unter 2 % lag wurde auf Fehlerbalken verzichtet Erklärungen siehe Text.....94
- Abb. 58: Mycelentwicklung von *Plasmopara viticola* 5 dpi im Interzellularraum infizierter Blattscheiben mit- und ohne BABA Behandlung. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden auf BABA Lösungen 0,2 % und Wasser inkubiert. Nach Entfärbung des Gewebes wurde mit basischem Anilinblau gefärbt. Das linke Bild zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit Wasser behandelten Kontrolle, das rechte Bild zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der BABA behandelten Blattscheiben.96
- Abb. 59: Vergleich des interzellulären Mycelwachstums von *P. viticola* nach BABA-, bzw. H₂O Applikation. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden auf 0,2 %iger BABA Lösung oder H₂O inkubiert. Anschließend wurde mit *P. viticola* ($2,5 \times 10^4$ Sporen ml⁻¹) infiziert, das Mycelwachstum 1-5 dpi unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Anilinblau-Färbung ausgewertet und in Bezug zu der infizierten Blattfläche gesetzt. Dargestellt sind Werte aus 3 unabhängigen Parallel-Ansätzen.....97
- Abb. 60: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM)-Aufnahme von Blattgewebe aus *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Infektion durch *Plasmopara viticola* 5dpi. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden mit *Plasmopara viticola* (5×10^4 Sporen ml⁻¹) infiziert. Nach 5 Tagen wurden diese Proben evaporiert und in Glutaraldehyd fixiert. Das obere Bild zeigt eine Pflanzenzelle, die von einem Haustorium penetriert wurde. Das untere Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt.98
- Abb. 61: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von BABA-behandeltem Blattgewebe aus *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau nach Infektion durch *Plasmopara viticola* 5dpi. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden 24 Stunden vor der Infektion mit *Plasmopara viticola* (5×10^4 Sporen ml⁻¹) auf einer 0,2 %igen BABA Lösung inkubiert. Nach 5 d wurden diese Proben evaporiert und in Glutaraldehyd fixiert. Bild A zeigt eine Übersicht, einer Pflanzenzelle, die eine erfolgreiche Papille ausgebildet hat. Die Papille entsteht exakt an der Penetrationsstelle eines Haustoriums. Bild B und C zeigen vergrößerte Ausschnitte von Bild A.99
- Abb. 62: Blatt von *Vitis vinifera* nach BABA Applikation 10 dpi durch *Plasmopara viticola*. Eine *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau Pflanze wurde mit einer BABA Lösung (50 mg/l) gegossen und 2 Tage später mit *Plasmopara viticola* (5×10^4 Sporen ml⁻¹) infiziert. Nekrosen sind an den braunen Stellen des Blattes deutlich zu erkennen.100
- Abb. 63: Mikroskopische Aufnahme von BABA behandelten *Vitis vinifera* Blattscheiben nach Infektion durch *Plasmopara viticola*. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden 24 Stunden vor der Infektion mit *Plasmopara viticola* (5×10^4 Sporen ml⁻¹) auf einer 0,2 %igen BABA Lösung inkubiert. Die Bilder zeigen einen identischen Bildausschnitt. Das linke Bild zeigt eine Aufnahme unter UV-Anregung, während das rechte Bild eine Überlagerung der Hellfeld Aufnahme mit der Fluoreszenz-Aufnahme darstellt. Die Proben wurden mit basischem Anilinblau gefärbt.....101
- Abb. 64: Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA Klons Vv-KS (*Vitis vinifera* Kallozesynthase). Die degenerierten Primer wurden anhand konservierter Bereiche bekannter Kallozesynthasen ausgewählt.....102
- Abb. 65: Vergleich der Aminosäuresequenz des cDNA Klons Vv-KS mit Kallozesynthase aus *Gossypium hirsutum* (Gh-AF085717) und *Arabidopsis thaliana* (At-NM111596). Identische,

- sowie homologe Aminosäuren zu beiden Arten sind schwarz, identische bzw. homologe Aminosäuren zu nur einer Art sind grau unterlegt.....103
- Abb. 66: *Northern blot* Analyse der *Vv-KS* Transkription in Zellkulturen von *Vitis rupestris*. Zellkulturen wurden mit 200 μ M BABA inkubiert und in Zeitintervallen von 12 Stunden nach Applikation zur RNA Extraktion überführt. Je Spur wurden 40 μ g Gesamt-RNA aufgetragen und anschließend mit der *Vv-KS* Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die ribosomale RNA (rRNA) abgebildet.....104
- Abb. 67: Überexpression des *HrpZ* aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bakterien. Das *HrpZ*-Gen wurde in einen Expressionsvektor ohne His-Tag (links) und mit Hia-Tag (rechts) zur Überexpression in Bakterien (BL21) transformiert. Je 10 μ l der Gesamtproteinextrakte aus denaturierend aufgeschlossenen Bakterien wurden elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Die verschiedenen Spuren zeigen die Proteinextrakte aus Zellen in denen die Expression durch IPTG induziert wurde. Als Marker M wurde 7B verwendet.123
- Abb. 68: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von keimten Zoosporen von *P. viticola* nach Inkubation mit entfärbten Blattscheiben von *Vitis vinifera*. Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau wurden durch 1 M KOH (linkes Bild) oder TCA Chloroform (rechtes Bild) entfärbt und anschließend mit Zoosporen von *P. viticola* inkubiert. Die Aufnahmen entstanden 6 Stunden nach Applikation. Die Ausbildung eines Keimschlauches und des Infektionsvesikels ist deutlich zu erkennen. Die Färbung erfolgte durch Anilinblau.....124

7 LITERATUR

- Agrios G. N.** (1997) *Plant Pathology*. Ed 4. Academic Press Inc. San Diego
- Alarez M. E., Pennell R.I., Meijer P.J., Ishakawa A., Dixon R.A., Lamb C.** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**, 773-784.
- Alessi D. R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D., Saltriel A. R.** (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**, 27489-27494.
- Alexander D., Goodman R. M., Gut-Rella M., Glascock C., Weymann K.** (1993) increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7327-7331
- Alexander D., Stinson J., Pear J., Glascock C., Weymann K.** (1993) Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7327-733
- 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. *Nucl. Acid Res.* **25**, 3389-3402.
- Antoniw J. F., White R. F.** (1986) Changes with time in the distribution of virus and PR protein around single local lesions of TMV infected tobacco. *Plant Mol Bio* **6**, 145-148
- Apostel I., Heinstejn P. F., Low P. S.** (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol* **90**, 109-116
- Arens K.** (1929) Physiologische Untersuchungen an *Plasmopara viticola* unter besonderer Berücksichtigung der Infektionsbedingungen. *Jb wiss Bot* **70**, 93-157
- Arias J. A., Dixon R. A., Lamb C.** (1992) Dissection of the functional architecture of a plant defense gene promoter using a homologous in vitro transcription initiation system. *Plant Cell* **5**, 485-496.
- Arlat M., van Gijsegem F., Huet J. C., Pernollet J. C., Boucher C. A.** (1994) PopA1, a protein which induces a hypersensitive-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO J.* **13**, 543-553.
- Ayers A. R., Ebel J., Valent B., Albersheim P.** (1976) Host-pathogen interactions X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the Mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* **57**, 760-765
- Baker C. J., Orlandi E. W.** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**, 299-32
- Baker C. J., Orlandi E. W., Mock N. M.** (1993) Harpin, an elicitor of hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol.* **102**, 1341-1344.
- Barney M. A., Guinebretiere M. H., Marçais B., Coissa C., Paulin J. P., Laurent J.** 1990 Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia-amylovora* cfbp 1430 virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**, 149-56.
- Bauer D. W., Wei Z.-M., Beer S. V., Collmer A.** (1995) *Erwinia chrysanthemi* harpinEcc???. an elicits of the hypersensitive response that contributes to soft-rot-pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 484-491.
- Beer S. V., Bauer D. W., Jiang X. H., Laby R. J., Sneath B. J.** (1991) The hrp gene cluster of *Erwinia amylovora*. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, ed. H. Hennecke, DPS Verma, 53-60, Dordrecht: Kluwer

- Beerhues L., Kombrink E.** (1994) Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3- β -glucanase in potato. *Plant Mol Biol* **24**, 353-367
- Bleyer G., Huber B.** (1996) Bekämpfung der Peronospora nach dem Freiburger Prognosemodell. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch* **47**, 101-112
- Boller T., Gehri A., Mauch F., Vögeli U.** (1983) Chitinase in bean leaves Induction by ethylene purification, properties an possible function. *Planta* **157**, 22-31
- Boller T., Metraux J. P.** (1988) Extracellular localization of chitinase in cucumber. *Physiol Mol Plant Pathol* **33**, 145-147
- Boller, T.** (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Ann.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 189-24.
- Bostock R. M., Kuc J. A., Laine R. A.** (1981) Eicosapentaenoic an arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxis sesquiterpenes in potato. *Science* **212**, 67-69.
- Boucher C. A., Martinel A., Barberis P., Alloing G., Zischeck C.** (1986). Virulence genes are carried by a megaplasmid of the plant pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 270-75
- Brehm I., Preisig-Müller R., Kindl H.** (1999) Grapevine protoplasts as a transient expression system for comparison of stilbene synthase genes containing cGMP-responsive promotor elements. *Naturforscher*, **54**, 220-229
- Busam G., Kassemeyer H. H., Matern U.** (1997). Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera L.* responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol* **115**, 1029-38
- Büscher N.** (1995) Entwicklung molekularer Marker für die Weinrebe (*Vitis* sp.). PhD thesis. Universität Karlsruhe
- Carr J. P., Dixon D. C., Nikolaus R. J., Voelkreding K. V., Klessig D. F.** (1987) Synthesis an localization of pathogenesis-related proteins in tobacco. *Mol Cell Biol* **7**, 1583
- Century K. S., Holub E. B., Stascawicz B. J.** (1995) NDR 1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6597-6601.
- Chandra S., Low P. S.** (1997) Measurement of Ca²⁺ fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 28274-28280.
- Chen Z., Klessig D. F.** (1991) Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease-resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8179-8183
- Cohen Y., Gisi U., Niderman T.** (1993) Local an systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato an tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* **83**, 1054-1062
- Collmer A.** (1998) the *Pseudomonas syringae* pv. tomato HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *J. Bacteriol.* **180**, 5211-5217.
- Conrath U., Jeblinck W., Kauss H.** (1991) The protein kinase inhibitor, K252a, decreases elicitor induced Ca²⁺ uptake an K⁺ release, an increases coumarin synthesis in parsley cells. *FEBS Lett.* **279**, 141-144.
- Conrath U., Kauss H.** (2000) Das Immunsystem der Pflanze. *Biologie in unserer Zeit* **4**, 202-208
- Conrath U., Pieterse C. M. J., Mauch-Mani B.** (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, **2**, 2244-2249
- Coquoz J. L., Buchala A., Metraux J. P.** (1998) The biosynthesis of salicylic acid in potato plants *Plant Physiol.* **117**, 1095-1001

- Coquoz J. L., Buchala A., Meuwly P., Metraux J. P.** (1995) Arachidonic acid induces but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology*, **85**, 1219-1224
- Cosio E. G., Frey T., Ebel J.** (1992) Identification of a high-affinity binding protein for a hepta- β -glucoside phytoalexin elicitor in soybean. *Eur J Biochem* **204**, 1115-112
- Cosio E. G., Frey T., Verduyn R., Van Boom J., Ebel E.** (1990) High affinity binding of a synthetic heptagluconide to a fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS Lett.* **175**, 309-315.
- Cruickshank I. A. M., Perrin D. R.** (1968) The isolation and partial characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollin-inducing activity from *Monilinia fructicola*. *Life Sci* **7**, 449-458
- Cui Y., Madi L., Mukherjee A., Dumenyo C. K. and Chatterjee A. K.** (1996) The RsmA – mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* strain Ecc71 overexpress hrpNEcc and elicit a hypersensitive reaction-like response in tobacco leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9** 656-573.
- Currle O., Bauer O., Hofäcker W., Schumann F., Frisch W.** (1983) *Biologie der Rebe*. Meiningen Verlag, Neustadt/Wstr.
- Cutt J. R., Klessig D. F.** (1992) Pathogenesis-related proteins. In Boller T, Meins F. eds, *Genes involved in plant defense*, Springer Verlag, Wien New York, 209-243
- Dangl J. L., Dietrich R. A., Richberg M. H.** (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**, 1793-1808.
- Darvill A. G., Albersheim P.** (1984) Phytoalexins and their elicitors – a defense against microbial infection in plants. *Annu Rev Plant Physiol* **35**, 243-275
- Davis L. G., Dibner M. D., Battey J. F.** (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Inc, New York.
- De Wit P. J. G. M.** (1992) Functional models to explain gene-for-gene relationships in plant-pathogen interactions. In Boller T, Meins F, eds, *Genes involved in plant defense*, Springer-Verlag, Wien New York, 25-47
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C.** (1998) Nitric oxide signal functions in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Dempsey M. A., Klessig D. F.** (1994) Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends in Cell Biology* 334-338
- Denzer H.** (1991) Resistenz von Rebsorten gegen *Plasmopara viticola* PhD thesis. Universität Giessen.
- Derckel J. P., Legendre L., Audran J. C., Haye B., Lambert B.** (1996) Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant sci* **119**, 31-37
- Despres C., Subramaniam R., Matton D. P., Brisson N.** (1995) The activation of the potato PR-10a Gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *Plant Cell* **7**, 589-598.
- Dickmann M. B., Pdila G. K., Kolattukudy P. E.** (1989) Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. *Nature* **342**, 446-48
- Diehl H.-J.**, (1988) Untersuchungen zur Erbllichkeit von Resistenzeigenschaften bei Reben gegen *Oidium tuckeri*, *Plasmopara viticola* und *Botrytis cinerea* PhD thesis. Universität Stuttgart-Hohenheim
- Dietrich A., Mayer J. E., Hahlbrock K.** (1990) Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J. Biol. Chem.* **265**, 6360-6368
- Doke N.** (1983a) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the phytoalexin wall components. *Physiol Plant Pathol* **23**, 345-357
- Doke N.** (1983b) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reactions by suppressors of hypersensitivity. *Physiol Plant Pathol* **23**, 359-367

- Doke N.** (1985) NADPH-dependent O₂-generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol Plant Pathol* **2**, 311-322
- Dolores A., Mercedes M., Bartolome S.** (2001) Differential leaf stress responses in young and senescent plants. *Physiologia Plantarum*, **113**, 409-415
- Dong H., Delaney T. P., Bauer D.W. Beer S. V.** (1999) Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. *Plant J.* **20**, 207-15.
- Dong X.** (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Cur. Opin. Plant Biol.* **1**, 316-323.
- Dröge-Laser W., Kaiser A., Lindsay W. P., Halkier B. A., Loake G. J., Doerner P., Dixon R. A., Laub C.** (1997) Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *EMBO J*, **16**, 726-738
- Dron M., Clouse S.D., Lawton M. A., Dixon R. A., Lamb C.** (1988) Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6738-6742.
- Durner J., Klessig D. F.** (1995) Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 11312-11316.
- Durner J., Wendehenne D., Klessig D. F.** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxid, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10328-10333.
- Ebel J. Mithöfer A.** (1998) Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**, 335-348. Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4800-4805.
- Ebel J., Cosio E.G.** (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **148**, 1-36,
- Ebel J., Scheel D.** (1992) Elicitor recognition and signal transduction. In: *Plant gene research. Genes involved in plant defense* (Boller, T., Meins, F., eds). Springer Verlag, Berlin, 183-205.
- Eichenberg K, Kunkel T, Kretsch T, Speth V, Schafer E.** (1999) In vivo characterization of chimeric phytochromes in yeast. *J Biol Chem.* **274**, 354-359.
- Elstner E. F., Osswald W., Schneider I.** (1996) *Phytopathologie – Allgemeine und biochemische Grundlagen.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford.
- Enyedi A. J., Yalpani N., Silverman P., Raskin I.** (1992) Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell*, **70**, 879-886
- Faktor O., Kooter J. M., Dixon R. A., Lamb C. J.** (1996) Functional dissection of a bean chalcone synthase gene promoter in transgenic tobacco plants reveals sequence motifs essential for floral expression. *Plant Mol Biol.* **5**, 849-859
- Falk A., Feys B. J., Frost, L. N., Jones, J. D. G., Daniels, M. J., Parker, J. E.** (1999) EDSI, an essential component of R-gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3292-3297.
- Feinberg A., Vogelstein B.** (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Ann. Biochem* **132**, 6-13.
- Felix G., Grosskopf D. G., Regenass M., Boller T.** (1991) Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc Natl Acad Sci*; **88**, 8831-8834.
- Felix G., Regenass M., Boller T.** (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J.* **4**, 307-316.

- Felix G., Regenass M., Spanu P., Boller T.** (1994) The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins as revealed by pulse labeling with (33P)-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 952-956.
- Finer J. J., Jones M. W., McMullen M. D.** (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep.* **11**, 323-328.
- Fink J., Jeblick W., Blaschek W., Kauss H.** (1987) Calcium ions and polyamines activate the plasma membranelocated 1,3- β -Glucan Synthase. *Planta*, **171**, 130-135
- Flor H. H.** (1946) Genetics of pathogenicity in *Melampsora lin.* *J.Agric.* **73**, 357
- Flor H. H.** (1956) The complementry genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet* **8**, 29-54
- Flor H. H.** (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Ann Re Phytopatol* **9**, 275-296
- Freytag S., Arabatzis N., Hahlbrock K., Schmelzer E.** (1994) Reversible cytoplasmic rearrangement precede wall apposition, hypersensitive cell death and defense-related gene activation in potato /*Phytophthora infestans* interactions. *Planta* **194**: 123-135
- Fry W. E., Myers D. F.** (1981) Hydrogen cyanide metabolism by fungal pathogens of cyanogenic plants. In Vennesland B, Knowles CJ, Conn EE, Westley J, Wissing F, eds, *Cyanide in Biology*, Academic Press, London, 321-334
- Fukuda Y., Shinshi H.** (1994) Characterization of a novel cis-acting element that is responsive to a fungal elicitor in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Mol Biol* **24**, 485-493
- Gaffney T., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J.** (1993) Requirement of salicylic acid for the inductions of systemic acquired resistane. *Science*, **261**, 754-756
- Gelli A., Higgins V. J., Blumwald E.** (1997) Activation of plant plasma membrane Ca²⁺-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.*, **113**, 269-279.
- Giancarlo P., Alexandra E., Pieter P., Frank M., Johan M.** (1999) The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor-inducible expression in transgenic tobacco and binds nuclear factors GT-1 and GBF. *Plant Molecular Biology*. **39**,1299-1310.
- Glazebrook J. L., Ausubel F. M.** (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interaction with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8955-8959.
- Glazebrook J., Ausubel, F. M.** (1997a) Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense. *Ann. Rev. Gen.*, **31**, 547-570.
- Glazebrook J., Rogers E. E., Ausubel F. J.** (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct *screening*. *Genetics* **143**, 973-982
- Glazebrook J., Zook M., Mert F., Kagan I., Rogers E. E., Crute I. R., Holub E. B., Hammerschmidt R., Ausubel F. M.** (1997b) Phytoalexin deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* **146**, 381-392.
- Goldsborough A. P.,Albrecht H., Stratford R.** (1993) Salicylic acid-inducible binding of a tobacco nuclear protein to a 10 bp sequence which is highly conserved amongst stress-inducible genes. *Plant J.* **3**, 563-571
- Govrin E. M., Levine A.** (2002) Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant Mol. Biol.* **48**, 267.276
- Gray D. J.** (1995) *Somatic emryogenesis in grape*. Kluwer Academic publsher, Dordrecht, The Netherlands, **2**, 191-217
- Greenberg J. T.** (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 525-545-275.

- Grosskopf D. G., Felix G., Boller T.** (1990) K252a inhibits the response of tomato cells to fungal elicitor in vivo and their microsomal protein kinase in vitro. *FEBS Lett.* **275**, 177-180.
- Hahlbrock K., Scheel D., Logemann E., Nürnberger T., Parniske M., Reinold S., Sacks WR, Schmelzer E** (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 4150-4157
- Hahlbrock K., Scheel D.** (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol*, **40**, 347-369
- Hahlbrock K., Scheel D., Logemann E., Nürnberger T., Parniske M., Reinold S., Sacks WR. and Schmelzer E.** (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 4150-4157
- Hahn M. G.** (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Ann. Rev. plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 387-412.
- Hanania U., Avni A.** (1997) High affinity binding site for ethylene inducing xylanase elicitor in *Nicotiana tabacum* membranes. *Plant J.* **12**, 113-120.
- Hansen G., Wright M. S.** (1999) Recent advances in the transformation of plants *Trends in Plant Science*, **4**:226-231
- Harmuth P.** (1990) Sachkundennachweis Pflanzenschutz. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- Harper J.F., Sussman M. R., Schaller G. E., Putnam-Evans C., Charbonneau H.** (1991) A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science*, **252**, 951-954
- Harris P. J , Hartley R. D.** (1976) Detection of bound ferulic acid in cell wall of monocotyledons. *Biochemical Systematics and Ecology*, **8**, 153-160
- Harrison M. J., Lawton M. A., Lamb C. J. and Dixon R. A.** (1991) Characterization of a nuclear protein that binds to three elements within the silencer region of a bean chalcone synthase gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 2515-2519
- He S. Y., Bauer D. W., Collmer A., Beer S. V.** (1994) Hypersensitive response elicited by *Erwinia amylovora* harpin requires active plant metabolism. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **7**, 289-292.
- He S. Y., Huang H-C., Collmer A.** (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cel*, **73**, 1255-1266.
- Heath H. C.** (1998) Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 117-124.
- Heath M. C.** (1980) Reactions of nonsusceptible to fungal pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **18**, 211-236
- Hill C. S., Treisman R.** (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. *Cell* **80**, 199-211.
- Him J. L., Pelosi L., Chanzy H., Putaux J. L., Bulone V.** (2001) Biosynthesis of (1-<3)-beta-D-glucan (callose) by detergent extracts of a microsomal fraction from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4628-4638
- Hunter T., Karin M.** (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell*, **70**, 375-387.
- Husfeld B.** (1962) Reben, Handbuch der Pflanzenzüchtung, Paul Parey, Berlin und Hamburg 723-773
- Iglesias, V. A.** (1994) Genetic transformation studies in wheat using particle bombardment. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Dissertaion ETH No 10628
- Innes, R. W.** (1998) Genetic dissection of R gene signal transduction pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 299-304.
- Inoue H., Nojima H., Okayame H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Istvanffi G. D., Palinkas G.** (1913) Etudes sur le mildiou de la vigne. *Ann Int centr ampel roy hongr*, **4**, 1-125

- Itzahaki H., Maxson J. M., Woodson WR.** (1994) An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 8925-8929
- Jabs T.** (1994) Beteiligung von elicitorresponsiven Ionenkanälen an der Signaltransduktion zur Aktivierung der Pathogenabwehr in Petersilie. Dissertation an der Universität Tübingen.
- Jabs T., Dietrich R. A., Dangl J. L.** (1996) Extracellular superoxide initiates runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant. *Science* **273**, 1853-56.
- Jabs T., Tschöpe M., Colling C., Hahlbrock K., Scheel D.** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci*, **94**, 4800-4805
- Jakab G., Cottier V., Toquin V., Rigoli G., Zimmerli L., Metraux JP., Mauch-Mani B.** (2001) Beta-Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 29-37
- Jeun Y. Ch., Buchenauer H.** (2001) Infection structures and localization of the pathogenesis –related protein AP24 in leaves of tomato plants exhibiting systemic acquired against *Phytophthora infestans* after pre-treatment with 3-aminobutyric acid or tobacco necrosis virus. *J. of Phytopathology*, **149**, 141-153
- Joosten M., de Wit P.** (1989) Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva* as β -1,3-glucanases and chitinases. *Plant Physiol*, **89**, 945-951
- Juncosa M., Pons J., Dot T., Querol E., Planas A.** (1994) Identification of active site carboxylic residues in *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **20**, 14530-14535
- Kamada Y., Muto S.** (1994) Protein kinase inhibitors inhibit stimulation of inositol phospholipid turnover and induction of phenylalanine ammonia-lyase in fungal elicitor-treated tobacco suspension culture cells. *Plant Cell Physiol.*, **35**, 405-409.
- Kamoun S., Huitema E., Vleeshouwers V.** (1999) Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci.* **4**, 196-200.
- Kauffmann S., Legrand M., Geoffroy P., Fritig B.,** (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins have 1,3- β glucanase activity. *EMBO J*, **6**, 3209-3212
- Kauss H.** (1985) Callose biosynthesis as a Ca²⁺-regulated process and possible relations to the induction of other metabolic changes. *J Cell Sci Suppl.* **2**, 89-103.
- Kauss H.** (1987) Some aspect of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* **38**, 47-72
- Kauss H. Waldmann T. Jeblick W. Takemoto J Y.** (1991) The Phytotoxin Syringomycin Elicits Calcium Dependent Callose Synthesis In Suspension-Cultured Cells Of *Catharanthus- Roseus*. *Physiologia Plantarum* **8**, 134-138.
- Kauss H., Franke R., Krause K., Conrath U., Jeblick W., Grimmig B.** (1993) Conditioning of parsley *Petroselinum crispum* L. suspension cells increases elicitor-induced incorporation of cell wall phenolics. *Plant Physiology* **102**, 459-466.
- Kauss H., Jeblick W., Domard H.** (1989) The degree of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta*, **178**, 385-392.
- Kauss H., Theisinger-Hinkel E., Mindermann R., Conrath U.** (1992) Dichloroisonicotinic and salicylic acid, inducers of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *Plant J*, **2**, 655-660
- Keen N. T.** (1992) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Genet*, **24**, 447-463

- Keen N. T., Dawson W. O.** (1992) Pathogen avirulence genes and elicitors of plant defense. In Bollter T, Meins F, eds, Plant gene research – genes involved in plant defense, Springer-Verlag, Wien, New York. 85-114
- Keller H., Blein J. P., Bonnet P., Ricci P.** (1996) Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiol* 110: 365-376
- Kemper. E. L., da Silva M. J., Arruda P.** (1996) Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. *Plant Science*, **121**, 85-93
- Kessmann H., Staub T., Hofmann C., Maetzke T., Herzog J.** (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 439-59
- Kim H. S., Beer S. V.** (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *J. Bacteriol.* **180**, 5203-5210.
- Kircher, S.** (1997) Studien zur Akkumulation und intrazellulären Lokalisation von bZIP-Transkriptionsfaktoren in Petersilie (*Peterselinum crispum* L.). Dissertation, Universität Freiburg.
- Klein T. M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J. C.** (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70-73.
- Klein T.M., Fromm M., Weissinger A., Tomes D., Schaff S., Sletten M., Stanford J. C.** (1988) Transfer of foreign genes into intact maize cells with high velocity microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4305-4309.
- Kneusel R. E., Matern U., Nicolay K.** (1989) Formation of trans-caffeoyl-CoA from trans-4-coumaroyl-CoA by Zn-dependent enzymes in cultured plant cells and its activation by an elicitor-induced pH shift. *Arch Biochem Biophys*, **269**, 455-462
- Kohler A, Schwindling S, Conrath U.** (2002) Benzothiadiazole-Induced Priming for Potentiated Responses to Pathogen Infection, Wounding, and Infiltration of Water into Leaves Requires the NPR1/NIM1 Gene in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **128**, 1046-1056
- Kohler A., Kauss H.** (1997) Transfer of hydroxycinnamoyl residues to microsomal proteins from parsley. *Phytochemistry*, **44**, 225-228
- Kolattukudy P. E.** (1980) Cutin, suberin and waxes. The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. 4. Lipids: Structure and Function, Academic Press, New York, 571-645
- Kolattukudy P. E.** (1985) Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, **23**, 223-250
- Köller W., Allan C. R., Kolattukudy P. E.** (1982) Role of cutinase and cell wall degrading enzymes in infection of *Pisum sativum* by *Fusarium solani* f. sp. *lisi*. *Physiol Plant Pathol*, **20**, 47-60
- Kombrink E., Schröder M., Hahlbrock K.** (1988) Several „pathogenesis-related“ proteins in potato are 1,3- β -glucanases and chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 782-786
- Kombrink E., Somssich I. E.** (1995) Defense responses of plants to pathogens. In *Advances in Botanical Research*, *Advances in Plant Pathology*, Academic Press, 1-34
- Kosmetschke R., Herr R.** (1991) *Strukturen und Tendenzen auf dem Weltweinmarkt*. Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup
- Kost B., Schnorf M., Potrykos I., Neuhaus G.** (1995) Non-destructive detection of firefly luciferase (LUC) activity in single plant cells using a cooled, slow-scan CCD camera and an optimized assay. *Plant J.* **8**, 155-166.
- Kuc J.** (1982) Induced immunity to plant disease. *Bioscience*, **32**, 854-860
- Lamb C., Dixon R. A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 251-275.
- Lawton K. A., Potter S. L., Uknes S., Ryals J.** (1994b) Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell*, **6**, 581-588

- Lawton K., Uknes S., Friedrich L., Gaffney T., Alexander D., Goodman R., Metraux J. P., Kessmann H., Ahl Goy P., Gutrella M.** (1993) The molecular biology of systemic acquired resistance. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 422-432
- Lee J., Klüsener B., Tsiamis G., Stevens C., Neyt C., Tampakaki A. P., Panopoulos N. J., Noller J., Weiler E. W., Cornelis G. R., Mansfield J. W., Nürnberger T.** (2001) HrpZ(Psph) from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, **98**, 289-294.
- Legendre L., Heinstejn P. F., Low P. S.** (1992) Evidence for the participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 20140-20147.
- Legrand M., Kauffmann S., Geoffroy P., Fritig B.** (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 6750-6754
- Leister D., Ballvora A., Salamini F. and Gebhardt C.** (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature genetics* **14**, 421-428
- Leon J., Lawton M. A., Raskin I.** (1995) Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol*, **103**, 323-328
- Lescot M., Déhais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., van de Peer Y., Rouzé P., Rombauts S.** (2002) PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.***30**, 325-327.
- Letunic I., Goodstadt L., Dickens N. J., Doerks T., Schultz J., Mott R., Ciccarelli F., Copley R. R., Ponting C. P., Bork P.** (2002) Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **30**, 242-244.
- Levadoux L., Boubals D., Rives M.** (1962) Les genre *Vitis* et son especes *Ann Amelior Plantes*, **12**, 19-44
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C.** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79**, 583-593.
- Li H.** (1985) Etude de la relation entre le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola* (B. et C. Berl. et de Toni) et l'espece *Vitis vinifera* L: variabilite de l'agent pathogene et de la sensibilite de l'hote. PhD thesis. Universite de Bordeaux
- Li H., Bacic A., Read S. M.** (1997) Activation of tube callose synthase by detergents. Evidence for different mechanisms of action. *Plant. Physiol*, **114**, 1255-1265
- Lieberei R., Biehl B., Giesemann A., Junqueira N. T. V.** (1989) Cyanogenesis inhibits active defense reactions in plants. *Plant Physiol*, **90**, 33-36
- Lieberei R.** (1988) Relationship of cynogenic capacity of the rubber tree *Hevea brasiliensis* to susceptibility to *Microcyclus ulei*, the agent causing South American leaf blight. *J Phytopathology* **122**: 54-67
- Lindgren P. B., Panopoulos N. J., Staskawicz B. J., Dahlbeck D.** (1988). Genes required for pathogenicity and hypersensitivity are conserved and interchangeable among pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Gen. Genet* **211**, 499-506
- Linthorst H. J. M.** (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sci*, **10**, 123-150
- Liswidowati M.F., Hohmann F., Schwer B., Kindl H.** (1991) Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells. *Planta*, **183**, 307-314
- Loake G. J., Faktor O., Lamb C. J., Dixon R. A.** (1992) Combination of H-box and G-box *cis* elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9230-9234.
- Loh Y.-T., Martin G. B.** (1995) The Pto bacterial resistance gene and the Fen insecticide sensitivity gene encode functional protein kinases with serine/threonine specificity. *Plant Physiol*. **108**, 1735-39.

- Lois R., Dietrich A., Hahlbrock K., Schulz W.** (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO J.* **8**, 1642-1648.
- Loyall L.** (2000) Isolierung und funktionelle Analyse früher UV-Induzierter Gene in Petersilie. Dissertation der Albert-Ludwig-Universität Freiburg
- Loyall L., Kenko U., Furuya M. and Frohnmeyer H.** (2000) Glutathione and a UV-light-induced Glutathione S-Transferase are involved in the signaling to chalcone synthase in cell cultures *Plant cell* **12**, 1939-1950
- MacKintosh, C., Lyon G. D., MacKintosh, R. W.** (1994) Phosphatase inhibitors activate anti-fungal defence responses of soybean cotyledons and cell cultures. *Plant J.* **5**, 137-147).
- Maher E. A., Bate N. J., Ni J., Elkind Y., Dixon C., Lamb C.** (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7803-7806.
- Malamy J., Carr J. P., Klessig D. F., Raskin I.** (1990) Salicylic acid: A Likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, **250**, 1002-1004
- Malamy J., Klessig D. F.** (1992) Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant J.* **2**, 643-654
- Maleck K., Dietrich R. A.** (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* **4**, 215-219.
- Manfield J. W.** (1983) Antimicrobial compounds. In: *Biochemical Plant Pathology* Callow, J. A., ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 237-265.
- Martin G.B., Brommonschenkel S., Chungwongse J., Frary A., Ganai M.W., Spivey R., Wu T., Earle E. D., Tanksley S. D.** (1993) MAP based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**, 1432-1436.
- Matern U.** (1993) Conditioning of parsley (*Petroselinum crispum* L) suspension cells increases elicitor-induced incorporation of cell wall phenolics. *Plant Physiol*, **10**, 459-466
- Mathieu Y., Sanchez F.J., Droillard M.-J., Lapous D., Lauriere C., Guern J.** (1996) Involvement of protein phosphorylation in the early steps of transduction of the oligogalacturonide signal in tobacco cells. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 399-408.
- Mauch F., Hadwiger L., A, Boller T.** (1984) Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol*, **76**, 607-611
- Mauch F., Mauch-Mani B., Boller T.** (1989) Antifungal hydrolases in pea tissue: II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol*, **188**, 936-942
- Mayer M. G., Ziegler E.** (1988) An elicitor from *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* influences the membrane potential of soybean cotyledonary cells. *Physiol Mol Plant Pathol*, **33**, 397-407
- Mehdy M. C.** (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol*, **105**, 467-472
- Meins F., Neuhaus J. M., Sperisen C., Ryals J.** (1992) The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. In Boller T, Meins F, eds, *Genes involved in plant defense*, Springer Verlag Wien New York, 245-282
- Mendgen K, Deising H.** (1993) Infection structures of fungal plant pathogens – cytological and physiological evaluation. *New Phytol* **124**, 193-213
- Menke K. L. H., Parchmann S., Mueller M. J., Kijne J. W., Memelink J.** (1999) Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*. **119**, 1289-1296.
- Messiaen J., Nerinckx F., van Cutsem P.** (1995) Callose synthesis in spirostanol treated carrot cells is not triggered by cytosolic calcium, cytosolic pH or membrane potential changes. *Plant and Cell Physiology*, **36**, 1213-1220

- Metraux J. P., Signer H., Ryals J., Wald E., Benz-Wyss M., Gaudin J., Raschdorf K., Schmid E., Blum W., Inverardt B.** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**, 1004-1006.
- Metraux J. P., Streit L., Staub T.** (1988) A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiol Mol Plant Pathol*, **33**, 1-9
- Millar A. J., Short, S. R., Chua N-H., Kay S. A.** (1992) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* **4**, 1075-1087.
- Mithofer A., Ebel J. Baghwat A., Boller T., Neuhaus-Url G.** (1999) Transgenic aquorine monitors cytosolic Calcium transience in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta* **207**, 566-574.
- Müller K. O., Börger H.** (1940) Experimentelle Untersuchungen über die Phythophthora-Resistenz der Kartoffel – zugleich ein Beitrag zum Problem der „erworbenen Resistenz“ im Pflanzenbereich. *Arb Biol Anst Reichsanst (Berl)* **23**, 189-231
- Müller K., Sleumer H.** (1934) Biologische Untersuchungen über die Peronosporakrankheit des Weinstockes mit besonderer Berücksichtigung ihrer Bekämpfung nach der Inkubationskalendermethode. *Landwirtschaftliche Jahrbücher für wissenschaftliche Landwirtschaft* **79**, 509-576
- Murphy A. M., Chivasa S., Davinder P., Singh, Carr J. P.** (1999) Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: A parting of the ways? *Trends in Plant Science*, **4**, 155-160
- Neuenschwander U., Vernooij B., Friedrich L., Uknes S., Kessmann H., Ryals J.** (1995) Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J* **8**, 227-233
- Neumann K., Droge-Laser W., Kohne S., Broer I.** (1997) Heat treatment results in a loss of transgene-encoded activities in several tobacco lines. *Plant Physiol.*, **115**, 939-947
- Nicol F., His I., Jauneau A., Vernhettes S., Canut H., Höfte H.** (1998) A plasma membrane-bound putative endo-1,4- β -D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. **19**, 5563-5576
- Niderman T., Genetet I., Bruyere T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B., Möisinger E.** (1995) Pathogenesis-related PR-1 Proteins are antifungal. *Plant Physiol* **108**, 17-27
- Noritake T., Kawakita K., Doke N.** (1996) Nitrite oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol.* **37**, 113-116.
- Nürnberg T., Nennstiel D., Jabs T., Sacks W., Hahlbrock K., Scheel D.** (1994) High-affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 49-460.
- Oeser B., Yen O. C.** (1994) Pathogenesis by *Cochliobolus heterostrophus* transformants expressing a cutinase-encoding gene from *Nectria haematococca*. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**, 282-288
- Ohashi Y., Ohshima M.** (1992) Stress-induced expression of genes for pathogenesis-related proteins in plants. *Plant Cell Physiol* **33**, 819-826
- Oiu D., Wei Z.-M., Bauer D. W., Beer S. V.** (1997) Treatment of tomato seed with harpin enhances germination and growth and induces resistance to *Ralstonia solanacearum*, *Phytopathology*, **87**, S80.
- Ojalvo I., Rokem J. S., Navon G., Goldberg I.** (1987) ³¹P-NMR study of elicitor treated *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. *Plant Physiol* **85**, 716-719
- Osborn A. E.** (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**, 1821-1831.
- Parker J. E., Holub, E. B., Frost, L. N., Falk A., Gunn, N. D., Daniels M. J.** (1996) Characterization of *ofedsl*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell* **8**, 2033-2046.
- Parker J. E., Schulte W., Hahlbrock K., Scheel D.** (1991) An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Mol.Plant Microbe Interact.* **4**, 19-27.

- Parker J. M. R., Guo D., Hodges R. S.** (1986) New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* **25**, 5425-5432.
- Patuglia M., Roby D., Dumas C., Cock J. M.** (1997) Rapid induction by wounding and bacterial infection of an S gene family receptor-like kinase gene in *Brassica oleracea*. *Plant Cell*, **9**, 49-60
- Piechulla B., Merforth N., Rudolph B.** (1998) Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol Biol* **1**, 655-662
- Ponstein A. S., Bres-Vloemans S. A., Sela-Buurlage M. B., van den Elzen P. J. M., Melchers L. S., Cornelissen B. J. C.** (1994) A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiol* **104**, 109-118
- Popham P., Pike S., Novacky A.** (1995) The effects of harpin from *Erwinia amylovora* on the plasmalemma of suspension-cultured tobacco cells. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **47**, 39-50.
- Popov N., Schmitt S., Matthies H.** (1975) Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteingehalts in Gewebehomogenaten. *Acta Biol. Germ.* **34**, 1441-1446.
- Preston G., Huang H.-C., He S. Y., Collmer A.** (1995) The hrpZ proteins of *Pseudomonas syringae* pvs *syringae*, *glycinia*, and *tomato* are encoded by an operon containing *Yersinia* ysc homologs and elicit the hypersensitive response in tobacco but not soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 717-732.
- Pugin A., Frachisse J.-M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R., Guern J.** (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* **9**, 2077-2091
- Rasmussen J. B., Hammerschmidt R., Zook M. N.** (1991) Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* ov. *syringae*. *Plant Physiol* **97**, 1342-1347
- Raz V., Fluhr R.** (1993) Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell* **5**, 523-530.
- Reymond P., Farmer E. E.** (1999) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 404-411.
- Ricci P., Bonnet P., Huet J.-C., Sallantin M., Beauvais-Cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G., Pernollet J.-C.** (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* **183**, 555-563.
- Riemann M.** (2000) Die Rolle des Cytoskeletts während der frühen Entwicklung des Falschen Mehltaus (*Plasmopara viticola*). Diplomarbeit, Biologische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
- Rogers E. E., Ausubel F. M.** (1997) *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in PR-1 expression. *Plant Cell* **9**, 305-316.
- Rogers L. M., Flaishman M. A., Kolattukudy P. E.** (1994) Cutinase gene disruption in *Fusarium solani* f. sp. *pisii* decreases its virulence on pea. *Plant Cell* **6**, 935-945
- Rouster J., Leah R., Mundy J., Cameron-Mills V.** (1997) Identification of a methyl jasmonate responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant J.* **11**, 513-523
- Rushton P. J., Somssich I. E.** (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 311-315
- Ryals J., Neuenschwander U., Willits M., Molina A., Steiner H.-Y., Hunt M.** (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819
- Ryals J., Uknes S., Ward E.** (1994) Systemic acquired resistance. *Plant Physiol* **104**, 1109-1112
- Ryals J., Ward E., Ahl-Goy P., Metraux J. P.** (1992) Systemic acquired resistance: an inducible defence mechanism in plants. In *Inducible plant proteins – Their biochemistry and molecular biology*, University Press, Cambridge, 205-229

- Samac D., Shah D.** (1994) Effect of chitinase antisense RNA expression on disease susceptibility of Arabidopsis plants. *Plant Mol Biol* **25**, 587-596
- Schäfer W.** (1994) Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annu Rev Phytopathol* **32**, 461-477
- Schlösser E.** (1983) Allgemeine Phythopathologie. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York
- Schlumbaum A., Mauch F., Vögeli U., Boller T.** (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **324**, 365-367
- Schmidt W. E., Ebel J.** (1987) Specific binding of a fungal glucan phytoalexin elicitor to membrane fractions from soybean *Glycine max.* *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 4117-4121
- Schruff G., Kassemeyer H. H.** (1999) Krankheiten und Schädlinge der Weinrebe Verlag Th. Mann Gelsenkirchen
- Schwacke R., Hager A.** (1992) Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca²⁺ and protein kinase activity. *Planta* **187**, 136-141.
- Schweizer P., Gees R., Möisinger E.** (1993) Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with the powdery mildew *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Plant Physiol* **102**, 503-511
- Sela-Buurlage M. B., Ponstein A. S., Bres-Vloemans S. A., Melchers L. S., van den Elzen P. J. M., Cornelissen B. J. C.** (1993) Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol* **101**, 857-863
- Shah J. and Klessig D. F.** (1996) Identification of a salicylic-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis-related \square -1,3-glucanase gene, PR-2d. *Plant J.* **10**, 1089-1101
- Sharp J. K., McNeil M., Albersheim P.** (1984) The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa (β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the Mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *J. Biol Chem* **259**, 11321-11336
- Sharp J. K., Valent B., Albersheim P.** (1984) Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* **259**, 11321-11336.
- Shibuya N., Ebisu N., Kamada Y., Kaku H. Cohn J., Lot Y.** (1996) Localization and binding characteristics of a high-affinity binding site for N-acetylchito-oligosaccharide elicitor in the plasma membrane from suspension-cultured rice cells suggest a role as a receptor for the elicitor signal at the cell surface. *Plant Cell Physiol.* **37**, 894-898.
- Shulaev V., Leon J., Raskin I.** (1995) Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *The Plant Cell* **7**, 1691-1701
- Shulaev V., Silverman P., Raskin I.** (1997) Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* **385**, 718-721
- Siegrist J., Jeblick W., Kauss H.** (1994) Defense responses in infected and elicited cucumber (*Cucumis sativus* L). hypocotyl segments exhibiting acquired resistance. *Plant Physiol* **105**, 1365-1374
- Siegrist J., Orober M., Buchenauer H.** (2000) beta-aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiological & Molecular Plant Pathology.* **56**, 95-106.
- Silue D., Pajot E., Cohen Y.** (2002) Induction of resistance to downey mildew in cauliflower by DL-beta-n-butanolic acid (BABA). *Plant Pathology*, **51**, 97-102
- Silverman P., Seskar M., Kanter D., Schweizer P., Metraux J. P., Raskin I.** (1995) Salicylic acid in rice. *Plant Physiol* **108**, 633-639
- Singleton V. L., Esau P.** (1969) Phenolic substances in grapes and wines and their significance. Academic Press, New York
- Slusarenko A. J., Croft K. P., Voisey C. R.** (1991) Biochemical and molecular events in the hypersensitive response of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseoliola*. In Smith CJ, eds, *Biochemical and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, Oxford University Press, Oxford, 126-143

- Smith C. J.** (1996) Accumulation of phytoalexins: Defense mechanism and stimulus response system. *New Phytol* **132**, 1-45
- Song W.-Y., Wang G. L., Chen L.-L., Kim H.-S., Si L.-Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W., Zhu L., Fauquet C., Ronald P.** (1995) receptor kinaselike protein encoded by the rice disease resistance gene Xa21. *Science* **270**, 1804-1806.
- Stahl D. J., Schäfer W.** (1992) Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. *Plant Cell* **4**, 621-629
- Staskawicz B. J., Ausubel F. B., Baker B. J., Ellis J. G., Jones J. D. G.** (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**, 661-667
- Steenkamp J., Wiid I., Lourens A., van Helden P.** (1994) Improved Method for DNA Extraction from *Vitis vinifera*. *Am.J. Enol. Vitic.* **45**, 102-106
- Sticher L., Mauch-Mani B., Metraux J. P.** (1997) Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology.* **35**, 235-270
- Strasser H., Hoffmann C., Grisebach H., Matern U.** (1986) Are polyphosphoinositides involved in signal transduction of elicitor-induced phytoalexin synthesis in cultured plant cells? *Z Naturforsch* **41**, 717-724
- Strasser H., Matern U.** (1986) Minimal time requirement for lasting elicitor effects in cultured parsley cells. *Z Naturforsch* **41**, 222-227
- Strasser H., Tietjen KG., Himmelpach K., Matern U.** (1983) Rpid effect of an elicitor on uptake and intracellular distribution of phosphate in cultured parsley ells. *Plant Cell Reports* **2**, 140-143
- Subramaniam R., Despres C., Brisson N.** (1997) A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response in potato. *Plant Cell* **9**, 953-664.
- Suzuki K., Fukuda Y., Shinshi H.** (1995) Studies on elicitor signal transduction leading to differential expression of defense genes in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* **36**, 281-289.
- Tavernier E., Wendehenne D., Bein J.-P., Pugin A.** (1995) Involvement of free calcium in the ation of cryptogein, proteinaceous elicitor of the hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol.* **109**, 1025-1031.
- Tenhaken R., Levine A., Brisson LF., Dixon RA., Lamb C.** (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci*, **10**, 4158-4163.
- Tetsuji Y., Permpong S., Hisaharu K., Tadaaki H., Hisatsugu S., Tomonori S.** (1994) Functional analysis of the promoters of phenylalanine ammonia-lyase genes in pea. *Plant & Cell Physiology.* **35**, 1994. 917-926.
- Thomma B. P. H., Eggermont K., Penninck I., A. M., Mauch-Mani B. Vogelsang R., Cammue B. P. A., Broekaert W. F.** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 15107-15111.
- Trewavas A. J., Malho R.** (1998) Ca²⁺ signalling in plant cells: the big network. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 428-433.
- van der Biezen E. A., Jones J. D.** (1998) Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 454-456.
- van Loon L. C.** (1985) Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* **4**, 111-116
- van Loon L. C.** (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**, 753-765.
- van Loon L. C., Gerritsen Y. A. M., Ritter C. E.** (1987) Identifiation, purification and characterisation of pathogenesis related proteins from virus infected Samsun NN tobacco leaves. *Plant Mol Biol* **9**, 593-609

- van Loon L. C., Pierpoint W. S., Boller T., Conejero V.** (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**, 245-264.
- van Loon L. C., van Kammen A.** (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* var. „Samsun“ and Samsun NN“ II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 199-211
- Vernooij B., Friedrich L., 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
- Viard M. P., Martin F., Pugin A., Ricci P., Blein J.-P.** (1994) Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* **104**, 1245-1249.
- Walters D. R., Mitchell A. F., Hampson J., McPherson A.** (1993) The induction of systemic resistance in barley to powdery mildew infection using salicylates and various phenolic acids. *Ann Appl Biol* **122**, 451-456
- Walton J. D.** (1994) Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol* **104**, 1113-1118
- Ward E. R., Uknes S., Williams S. C., Dincher S. S., Metraux J.-P., Ryals J.** (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**, 1085-1094
- Wei Z.-M. and Beer S. V.** (1996) Harpin from *Erwinia amylovora* induces plant resistance. *Acta Hortic.* **411**, 223-225.
- Wei Z.-M., Laby R. J., Zumoff C. H., Bauer D. W., He S. Y., Vollmer A., Beer S. V.** (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*, *Science*, **257**, 85-88.
- Wendehenne D., Binet M.-N., Blein J.-N., Ricci P., Pugin A.** (1995) Evidence for specific high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membranes. *FEBS Lett.* **374**, 203-207.
- Wu S. C., Blumer J. M., Darvill A. G., Albersheim P.** (1996) Characterization of an endo- β -1,4-glucanase gene induced by auxin in elongating pea epicotils. *Plant Physiol.* **110**, 163-170
- Xu P., Wang J., Fincher G. B.** (1992) Evolution and differential expression of the (1,3)-beta-glucan endo-hydrolase-encoding gene family in barley, *Hordeum vulgare*. *Gene* **21**, 157-165
- Xu Y., Chang P. F., Liu D., Narasimhan M. L., Raghothama K. G., Hasegawa P. M., Bressan R. A.** (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**, 1077-1085
- Yalani N., Silverman P., Wilson T.M.A., Kleier A., Raskin I.** (1991) Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* **3**, 805-813
- Yang P., Chen C., Wang Z., Fan B., Chen Z.** (1999) A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant J.* **18**, 141-149.
- Yang Y., Shah J., Klessig D. F.** (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* **11**, 1621-1639
- Yoshikawa M., Tsuda M., Takeuchi Y.** (1993) Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften* **80**, 417-20
- Zhu Q., Maher E. A., Masoud S., Dixon R. A., Lamb C. J.** (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio/Technology* **12**, 807-812
- Zimmerli L., Jakab G., Metraux J. P., Mauch-Mani B.** (2000) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *PNAS*, **97**, 12920-12925