

**Transkriptomanalyse der *Arabidopsis*-Wurzel  
nach Infektion mit dem pilzlichen Pathogen  
*Verticillium longisporum* und Identifizierung von  
transkriptionellen Regulatoren der Pathogenantwort**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Tim Eberhard Iven  
aus Bad Oldesloe

Göttingen 2009

D7

Referent:

PD Dr. Wolfgang Dröge-Laser

Korreferent:

Prof. Dr. Christiane Gatz

Tag der mündlichen Prüfung:

30.04.2009

„Das schönste Denkmal, das ein Mensch bekommen kann,  
steht in den Herzen der Mitmenschen.“

(Albert Schweitzer 1875-1965)

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1	Das pflanzliche Immunsystem.....	9
1.2	Vaskuläre Pilzkrankheiten bei Pflanzen.....	17
1.3	Das vaskuläre Pathogen <i>Verticillium longisporum</i> .....	20
1.4	Zielsetzung.....	26
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1	Material.....	28
2.1.1	Pilze.....	28
2.1.2	Pflanzen ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ).....	28
2.1.3	Bakterien.....	28
2.1.4	Plasmide.....	29
2.1.5	Oligonucleotide.....	29
2.1.6	Oligonucleotide qRT-PCR.....	30
2.1.7	Pilzmedien.....	32
2.1.8	Pflanzenmedien.....	32
2.1.9	Bakterienmedien.....	32
2.1.10	Antibiotika.....	33
2.1.11	Enzyme.....	33
2.1.12	Puffer und Lösungen.....	33
2.1.13	Geräte.....	34
2.1.14	Kits.....	35
2.1.15	Verbrauchsmittel.....	35
2.1.16	Chemikalien.....	35
2.1.17	Software.....	36
2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Bakterienkultur.....	36
2.2.2	Pilzkultur.....	36
2.2.2.1	Herstellung von <i>Verticillium longisporum</i> -Infektionslösung.....	36
2.2.2.2	Herstellung von <i>Verticillium longisporum</i> -Konidiosporen.....	
	Gefrierstocks.....	37
2.2.3	Kultivierung von <i>A. thaliana</i> .....	37
2.2.4	Infektionssysteme.....	37
2.2.4.1	Steriles <i>in vitro</i> -Infektionssystem.....	37
2.2.4.2	Anzucht von <i>A. thaliana</i> unter Langtag-Regime.....	38

2.2.4.3	Anzucht von <i>A. thaliana</i> unter Kurztag Regime.....	39
2.2.4.4	Infektion von <i>A. thaliana</i> durch „Wurzel-Dip“-Inokulation.....	39
2.2.5	Stängelsterilisations-Assay.....	40
2.2.6	Blattflächenanalyse.....	40
2.2.7	Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis</i> -Samen.....	40
2.2.8	Luciferase-Imaging.....	41
2.2.9	Promoter-Trap-Screening.....	41
2.2.10	<i>Agrobakterien</i> -vermittelte Transformation von <i>A. thaliana</i> .....	41
2.2.11	Selektion auf BASTA®-Resistenz.....	42
2.2.12	Molekulargenetische Methoden.....	43
2.2.12.1	Plasmid-Isolation.....	43
2.2.12.2	Schnell-Lyse von <i>E. coli</i> für eine anschließende PCR.....	43
2.2.12.3	Extraktion genomischer Pflanzen-DNA.....	43
2.2.12.4	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	43
2.2.12.5	Gelelektrophorese.....	43
2.2.12.6	Restriktionsspaltung von DNA.....	44
2.2.12.7	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	44
2.2.12.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	44
2.2.12.9	Polymerase Kettenreaktion.....	44
2.2.12.10	Long-range-inverse PCR.....	45
2.2.12.11	Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR).....	45
2.2.12.12	Gateway-Klonierung.....	47
2.2.12.13	Klonierung von pE-35s-HA-GW.....	48
2.2.12.14	Generierung der <i>AtTORF</i> -Ex-Kollektion.....	48
2.2.12.15	Identifizierung von <i>AtTORF</i> -Ex-Linien.....	48
2.2.12.16	Klonieren von Luciferase-Reporterlinien.....	49
2.2.12.17	Sequenzierung.....	49
2.2.12.18	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> .....	49
2.2.12.19	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	50
2.2.12.20	Herstellung kompetenter <i>Agrobakterien</i> .....	50
2.2.12.21	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	50
2.2.12.22	Extraktion von <i>Arabidopsis</i> -Gesamt-RNA.....	50
2.2.13	Transkriptomanalyse mit ARIZONA-Gesamt-Genom-Arrays.....	51
2.2.13.1	Amplifikation der eingesetzten RNA.....	51
2.2.13.2	Indirekte Markierung der aRNA.....	51
2.2.13.3	Hybridisierung der ARIZONA-Gesamt-Genom-Arrays.....	52
2.2.13.4	Auswertung der ARIZONA-Gesamt-Genom-Arrays.....	52
2.3	<i>Berechnungen</i> .....	53
2.3.1	Statistische Berechnungen zur Promoter-Trap-Kollektion.....	53

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>55</b>
3.1	<i>Infektionssysteme für die transkriptionelle und phänotypische Analyse der V. longisporum - A. thaliana Interaktion</i> .....	55
3.1.1	Etablierung eines sterilen <i>in vitro</i> -Infektionssystems für die Untersuchung früher transkriptioneller Reaktionen der Wurzel auf <i>V. longisporum</i> -Infektion.....	55
3.1.2	Ausprägung des <i>Vl43</i> -Pathophänotyps von <i>A. thaliana</i> in einem erdbasierten Infektionssystem .....	57
3.2	<i>Analyse der frühen, transkriptionellen Reaktion der Wurzel auf Verticillium longisporum-Infektion</i> .....	60
3.2.1	Erstellung eines Transkriptionsprofils von <i>Arabidopsis</i> -Wurzeln ein und drei Tage nach <i>V. longisporum</i> -Infektion.....	60
3.2.2	Vergleich der durch die <i>Verticillium longisporum</i> -Pathovare <i>Vl43</i> und <i>Vl18</i> induzierten Genexpression.....	65
3.3	<i>Die V. longisporum-induzierte transkriptionelle Aktivierung des Sekundärmetabolismus</i> .....	66
3.3.1	<i>Vl43</i> -Infektion führt in den Wurzeln zu einer koordinierten Induktion des Camalexin-Biosyntheseweges.....	69
3.3.2	Biochemischer Nachweis der durch <i>Verticillium</i> -Infektion induzierten Camalexin-Biosynthese.....	72
3.3.3	Entwicklung der durch <i>Verticillium</i> ausgelösten Krankheitssymptome in Camalexin-Biosynthese-Mutanten .....	73
3.4	<i>Identifizierung von Vl43-responsiven Promotoren mittels Luciferase-Promoter-trap-Screening</i> .....	75
3.5	<i>Die AtTORF-EX-Bank: Durchmusterung einer A. thaliana Transkriptionsfaktor-Überexpressionskollektion nach V. longisporum resistenten Linien</i> .....	78
3.5.1	Herstellung der AtTORF-EX Samenbank.....	78
3.5.2	Durchmusterung der AtERF-Überexpressionskollektion auf Resistenz gegen systemische Besiedelung durch <i>Vl43</i> .....	80
3.6	<i>Funktionelle Analyse von Transkriptionsfaktor-Überexpressionslinien</i> .....	83
3.6.1	Analyse von <i>ERF #105</i> Überexpressionslinien.....	84
3.6.2	Analyse von <i>ANAC042</i> Überexpressionslinien.....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>88</b>
4.1	<i>Die Infektion von A. thaliana mit V. longisporum führt zu einer schnellen transkriptionellen Reprogrammierung und der Induktion von wurzelspezifischen Abwehrgenen</i> .....	88
4.2	<i>Die Induktion von antimikrobiellen Sekundärstoffwechsel-Produkten in der Arabidopsis-Wurzel trägt zur Resistenz gegenüber V. longisporum-Infektion bei</i> .....	93

---

4.3	<i>Arabidopsis ERF- und NAC-Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Resistenz gegenüber V. longisporum</i> .....	104
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>114</b>
6.1	<i>Transkriptionsprofil von A. thaliana Wurzeln einen Tag nach V143-Infektion</i> .....	114
6.2	<i>Transkriptionsprofil von A. thaliana Wurzeln drei Tage nach V143-Infektion</i> .....	118
6.3	<i>Schnittmengen des Venn-Diagramms aus Abbildung 10</i> .....	126
6.4	<i>qRT-PCR-Validierung der Arraydaten</i> .....	127
6.5	<i>Kartierung des T-DNA Insertionsortes in der Pt-LUC-1 Promoter-trap Linie</i> .....	130
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>131</b>

## Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
<i>A. brassicicola</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	Abscic Acid (Absicinsäure)
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtTORF-EX	<i>Arabidopsis thaliana</i> Transkriptionsfaktor-ORF-Überexpressions-Kollektion
<i>B. napus</i>	<i>Brassica napus</i>
bar	BASTA <sup>®</sup> -Resistenz-Gen
BGLU	β-Glucosidase
BR	Brassinosteroid
CCD	Charge-coupled Device
CERK1	Chitin Elicitor Receptor Kinase1
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Ökotyp Columbia-0
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
cyp79b2/b3	Cytochrom-P450-79b2/b3 Doppelmutante
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DIN2	DARK INDUCED2
dpi	days post infection
eds1	Enhanced Disease Susceptibility 1
EFR	Ef-Tu Receptor
Ef-Tu	Elongations-Faktor Tu
<i>ein</i>	<i>ethylen insensitiv</i>
ERF	Ethylen Response Factor
ET	Ethylen
ETI	Effektor Triggered Immunity
<i>etr1</i>	<i>ethylen response 1</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>



f.sp.	Forma spezialia
flg22	Flagellin Peptid 22
FLS2	Flagellin Sensitive 2
FMO	Flavin Monooxygenase-like
<i>Fox</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunden
hpi	hours post infection
HPLC	High performance liquid chromatography
HR	Hypersensitive Response
IAN	Indole-Acetonitril
IAOx	Indol-3-Acetaldoxim
ISR	Induced Systemic Resistance
JA	Jasmonic Acid (Jasmonsäure)
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LUC	Luciferase
MAMP	Microbe Associated Molecular Pattern
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAP-Kinase	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
min	Minuten
MKS	MAP Kinase Substrate
mock	Kontrollbehandlung (mock: engl. für Attrappe, Blindprobe)
MS	Murashige-Skoog-Medium
NDR1	NON RACE-SPECIFIC DISEASE RESISTANCE 1
NIT	Nitrilase
NPR1	Nonexpressor of PR1
ORF	Open Reading Frame
p	Signifikanzschwelle
pad3	phytoalexin deficient 3

pad4	phytoalexin deficient 4
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PAPS	Phospho-Adenosin-Phosphosulfat
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNG	Peptidoglycan
PR	Pathogenesis Related
PRR	Pattern Recognition Receptor
Pst	<i>Pseudomonas syringae pathovar tomoto</i>
PTI	PAMP Triggered Immunity
pv.	Pathovar
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
RFO	Resistance To Fusarium Oxysporum
R-Gen	Resistenz-Gen
RLK	Receptor Like Kinase
RLP	Receptor Like Protein
ROS	Reactive Oxygen Species
SA	Salicylic Acid (Salizylsäure)
SAR	Systemic Aquired Resistance
sec	Sekunden
sid2	Salicylic Acid Induction Deficient 2
ssp.	subspecies
TIR-NBS	Toll/Interleukin1 Receptor–Nucleotide Binding Site
<i>V. dahliae</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
<i>V. longisporum</i>	<i>Verticillium longisporum</i>
VET1	<i>Verticillium dahliae</i> tolerance 1
Vl18	<i>Verticillium longisporum</i> Stamm 18
Vl43	<i>Verticillium longisporum</i> Stamm 43
Vlgs	<i>Verticillium longisporum</i> induzierte Gene
WRKY	WRKY-Box Element-bindende Transkriptionsfaktoren
WT, Wt	<i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp

# 1 Einleitung

Pflanzen sind in der Natur diversen abiotischen und biotischen Stressbedingungen ausgesetzt, denen die Pflanze ein Arsenal an Resistenz- und Abwehrmechanismen entgegensetzt. Die Intensivierung der Landwirtschaft und die Beschränkung auf den Anbau einer geringen Anzahl an Sorten führt zu der Ausbreitung angepasster Pathogene. Der Pathogendruck, welcher auf agronomisch wichtigen Pflanzen lastet, ist eine besondere Herausforderung bei der Züchtung resistenter Sorten. Das Verständnis der molekularen Grundlagen von Pathogen-Pflanze-Interaktionen dient zum einen als Basis für die mit molekularen Markern unterstützte Züchtung resistenter Sorten (smart breeding) (Collard und Mackill 2008) und ist zum anderen essentiell bei der Herstellung resistenter transgener Sorten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden molekulare Grundlagen des *Verticillium longisporum*-Pathosystems mit Hilfe der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* näher charakterisiert. *V. longisporum* ist ein bodenbürtiges pilzliches Pathogen, welches speziell im Rapsanbau Ernteeinbußen verursacht. Die Abwehr-Reaktionen, welche in der Wurzel im Rahmen der Basis-Resistenz gegenüber bodenbürtigen Pathogenen ausgelöst werden, sind bisher kaum erforscht (Okubara und Paulitz 2005). Besonders diese frühen Prozesse der *V. longisporum*-Infektion stehen im Zentrum dieser Arbeit.

## 1.1 Das pflanzliche Immunsystem

Anders als Tiere, welche über ein Immunsystem mit mobilen auf Abwehr spezialisierten Zellen verfügen, sind Pflanzen darauf angewiesen, dass jede Zelle die Fähigkeit besitzt, Pathogene zu erkennen und eine Abwehrreaktion auszulösen.

Je nach Lebensweise der Pathogene kann bei Pathogen-Pflanze-Interaktionen zwischen nekrotrophen und biotrophen Wechselwirkungen unterschieden werden. Nekrotrophe Pathogene wie beispielsweise *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicicola* und *Magnaporthe grisea* töten aktiv das befallene Gewebe der Wirtspflanze ab und leben saprophytisch von den Nährstoffen der toten Zellen (Ferrari et al. 2007; Dean et al. 2005). Um das Wirtsgewebe zu zerstören, setzen sie ein Arsenal von lytischen Enzymen und Phytotoxinen ein (van Kan 2006). Biotrophe Pathogene beuten dagegen die

Nährstoffe von lebenden Pflanzenzellen aus. Zu den biotrophen Pathogenen gehören beispielsweise Bakterien wie *Pseudomonas syringae* oder Pilze wie *Cladosporium fulvum* und *Blumeria graminis* (van Esse et al. 2008). Obligat biotrophe Blattpathogene, wie echte und falsche Mehltau-Pilze, treten in besonders enge Verbindung mit der Wirtspflanze. Sie bilden in den befallenen Epidermiszellen sogenannte Haustorien aus. Haustorien sind interzelluläre Hypheneinstülpungen, die von der Wirtspflanzenmembran umgeben sind. Über ihre Kontaktfläche kann der Pilz über einen langen Zeitraum Nährstoffe der Wirtspflanze ausbeuten (zur Übersicht siehe Eichmann und Hückelhoven 2008).

Einige Pathogene lassen sich nicht eindeutig einer dieser Kategorien zuordnen (Glazebrook 2005). Pathogene, deren Lebensweise sich während ihrer Entwicklung von einer biotrophen zu einer nekrotrophen ändert, werden als hemibiotroph bezeichnet. Die hemibiotrophen *Colletotrichum*-Arten bilden beispielsweise zunächst Haustorium-ähnliche primäre Hyphen aus und entwickeln erst später sekundäre, nekrotrophe Hyphen, welche das Absterben des Wirtsgewebes auslösen (Münch et al. 2008). Auch das vaskuläre Pathogen *V. longisporum* wird als hemibiotroph eingestuft, da *V. longisporum* während der frühen Besiedelung der Xylem-Elemente biotroph lebt und die Interaktion erst in der späten Entwicklung der Infektion nekrotrophe Merkmale aufweist (Fradin und Thomma 2006).

Die Infektion einer Pflanze durch einen Mikroorganismus ist nicht die Regel, sondern die Ausnahme. Der größte Teil des Pflanzenbestandes ist gegenüber den meisten Mikroorganismen resistent. Nur ein kleiner Anteil angepasster Mikroorganismen kann Pflanzen befallen. Ist die Gesamtheit einer Pflanzenart gegen alle genetischen Varianten eines nicht-angepassten Pathogens resistent, spricht man von Nicht-Wirts-Resistenz (zur Übersicht siehe Lipka et al. 2008). Ist eine Pflanze suszeptibel gegenüber einem angepassten Pathogen, spricht man von einer kompatiblen Interaktion. Die Pflanzenart ist entsprechend eine Wirtspflanze. Durch eine evolutionäre Anpassung an das Pathogen können Wirtspflanzen eine Resistenz gegen einzelne Rassen (bei Pilzen *forma specialis* [f.sp.], bei Bakterien *pathovar* [pv.]) einer Pathogenart entwickeln. Bei einer solchen rassenspezifischen Resistenz spricht man von einer inkompatiblen Interaktion von Wirtspflanze und Pathogen-Rasse (Flor 1971).

Nur spezialisierte Pathogene können das effektive System der gestaffelten pflanzlichen Abwehr überwinden (Jones und Dangel 2006; Lipka et al. 2008). Die pflanzliche Abwehr setzt sich aus preformierten Abwehrbarrieren und induzierbaren Abwehrmechanismen zusammen. Als passive Barriere der Basis-Resistenz verfügen Pflanzen über eine penetrationsresistente äußere Schutzschicht. In den Blättern übernimmt dies die Epidermis. Sie ist durch die hydrophobe Cuticula geschützt, welche sich hauptsächlich aus den Polymeren Cutin und Cutan sowie intracuticularen und epicuticularen Wachsen zusammensetzt (Pollard et al. 2008). In Wurzeln übernehmen die Exo- und Endodermis eine Schutzfunktion gegen Pathogenbefall. In der Exo- und Endodermis bilden die Zelllagen der Casparischen Streifen durch extrazellulär eingelagertes Suberin apoplastische Grenzschichten, welche ein Eindringen in die Wurzel blockieren (Franke und Schreiber 2007). Als weitere Komponente der preformierten Abwehr lagert die Pflanze antibiotische Sekundärmetabolite, sogenannte Phytoanticipine, in der Zellwand ein (VanEtten et al. 1994).

Um die Cuticula und die Zellwand abzubauen, sekretieren phytopathogene Pilze lytische Enzyme (zur Übersicht siehe Beliën et al. 2006; Juge 2006). Viele Pilze bilden spezielle Penetrationshyphen, die sogenannten Appressorien aus, um durch Anwendung von Druck die pflanzliche Schutzschicht zu durchdringen. Appressorien von *Magnaporthe grisea* können für die Penetration von Oberflächen einen Tugordruck von über 80 bar erzeugen (Howard et al. 1991). Andere Pilze und bakterielle Pathogene nutzen Eintrittspforten wie die Stomata oder Wunden, um die Pflanze zu befallen (zur Übersicht siehe Melotto et al. 2008). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Tomatenpflanzen ihre Stomata aufgrund eines von Bakterien ausgelösten Stimulus schließen und *Pseudomonas syringae pv. tomato (Pst) DC3000* durch die Freisetzung des Phytotoxins Coronatin in der Lage ist, innerhalb von drei Stunden die erneute Öffnung der Stomata auszulösen (Melotto et al. 2006). Coronatin-defiziente *Pst DC3000* zeigten deutlich geringere Pathogenität.

Neben den preformierten Barrieren verfügen Pflanzen auch über eine induzierbare Abwehr. Ihre Funktionsweise wurde von Jones und Dangel (2006) in dem Zick-Zack-Modell der pflanzlichen Immunantwort zusammengefasst (Abbildung 1). Sie kann in eine durch mikrobielle Muster ausgelöste Abwehrreaktion, hiernach als „*Pathogen Associated Molecular Pattern Triggerd Immunity*“ (PTI) bezeichnet, und in eine durch

mikrobielle Effektormoleküle ausgelöste Abwehrreaktion, der sogenannten „*Effector Triggered Immunity*“ (ETI), eingeteilt werden.

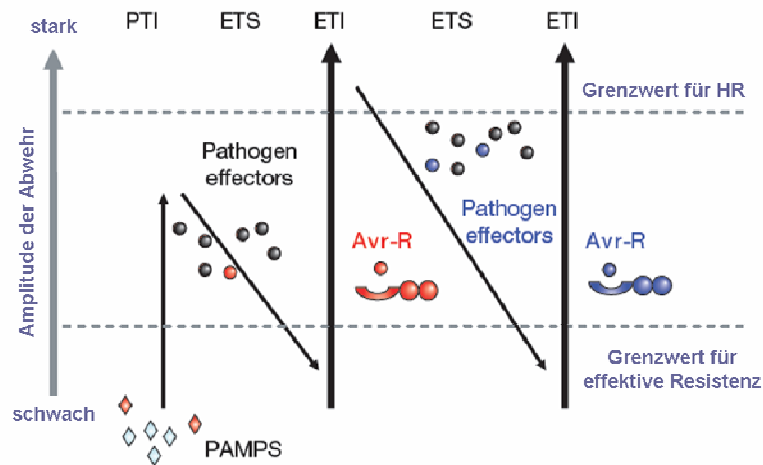


Abbildung 1: Zick-Zack-Modell der pflanzlichen Immun-Antwort modifiziert nach Jones und Dangel (Jones und Dangl 2006). Die Amplitude der Abwehrreaktion ergibt ein Gleichgewicht zwischen den pflanzlichen Abwehrmechanismen der PTI („PAMP triggered Immunity“), der ETI („Effector triggered Immunity“) und der durch Pathogen-Effektoren ausgelösten ETS („Effector triggered Susceptibility“). Bei einer starken Abwehrreaktion kommt es zur Auslösung der „Hypersensitive Response“ (HR), während die Pflanze bei einer schwachen Abwehrreaktion vom Pathogen befallen wird. Die Avr-R-Interaktion (Avirulenzfaktor-Resistenzgen-Interaktion) löst die ETI aus.

Die PTI wird durch mikrobielle Elicitoren, den „*Pathogen*“ oder „*Microbe Associated Molecular Patterns*“ (PAMPs oder MAMPs) ausgelöst, welche von der Pflanze durch membranlokalisierte „*Pattern Recognition Receptors*“ (PRRs) erkannt werden (Schwessinger und Zipfel 2008). Der ursprünglich für die mikrobiellen Elicitoren eingeführte Begriff der PAMPs wurde durch MAMPs erweitert, da nicht nur Pathogene, sondern auch nicht-pathogene Mikroben eine PTI auslösen können. Im Folgenden werden MAMPs und PAMPs der Einfachheit halber nur als PAMPs bezeichnet. Die PAMPs umfassen allgemeine, evolutionär wenig veränderliche Moleküle, welche nicht spezifisch für ein einzelnes Pathogen sind, sondern ganzen Pathogen-Familien gemein sind. Zu den bakteriellen PAMPs zählen beispielsweise der bakterielle Translations-Elongations-Faktor Tu (Ef-Tu), Lipopolysaccharide (LPS) und Peptidogluane (PNGs), sowie die bei mobilen Bakterien konservierte N-terminale Domäne von Flagellin (Schwessinger und Zipfel 2008). Zu pilzlichen PAMPs zählen Chitin und Ergosterol, strukturelle Komponenten der pilzlichen Zellwand. Neben den von Mikroben abstammenden Elicitoren kann die PTI auch von pflanzeigenen Molekülen induziert werden. Für diese bei der Penetration der Pflanze freigesetzten Moleküle wurde der

Begriff der „Damage Associated Molecular Pattern“ (DAMPs) eingeführt (Matzinger 2007). Ein Beispiel für DAMPs sind die bei dem lytischen Angriff der Pflanzenzellwand durch pilzliche Polygalacturonasen freigesetzten Zellwand-Abbauprodukte, die Oligogalacturonide (Ferrari et al. 2007).

Die unterschiedlichen PAMPs werden durch spezifische „*Pathogen-Recognition-Receptors*“ (PRRs) erkannt, von denen bisher nur wenige charakterisiert werden konnten. Sie gehören hauptsächlich der in *A. thaliana* 610 Proteine umfassenden Gruppe der „*Receptor-Like Kinases*“ (RLKs) und der Gruppe der 56 Proteine umfassenden „*Receptor-Like Proteins*“ (RLPs) an (Fritz-Laylin et al. 2005; Shiu und Bleecker 2001). Für Chitin konnte beispielsweise die RLK CERK1 als essentielle Komponente der Chitin-Erkennung identifiziert werden (Miya et al. 2007; Wan et al. 2008). Das PRR-Protein EFR wurde als Rezeptor des bakteriellen Elicitors EF-Tu (Zipfel et al. 2006) und der Membranrezeptor FLS2 als Rezeptor des Flagellum-Peptids *flg22* identifiziert (Chinchilla et al. 2007).

Durch die Erkennung eines PAMP-Elicitors wird in der Pflanzenzelle eine Signalkaskade ausgelöst. Dabei aktivieren verschiedenen PAMPs sich zu einem großen Teil überschneidende Abwehrreaktionen (Zipfel et al. 2006; Wan et al. 2008; Navarro et al. 2004). Die PAMP-induzierten Signalkaskaden umfassen unter anderem Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAP-Kinasen), Calcium-Signale, Ionen-Flüsse über die Plasmamembran, Stickstoffmonoxid-Signale, Protein-Protein-Interaktionen und Transkriptionsfaktor-Aktivierung (zur Übersicht siehe Bittel und Robatzek 2007).

Infolge der Signaltransduktion wird in der infizierten Pflanzenzelle eine basale Abwehrreaktion ausgelöst. Es kommt unter anderem zu der Bildung von antimikrobiellen Stoffen, der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), einer Verstärkung der Zellwand, der lokalen Ablagerung von Kallose an der Infektionsstelle und der Expression von „Pathogenesis-Related“-Genen (PR-Genen) (zur Übersicht siehe Altenbach und Robatzek 2007).

Die im Rahmen der basalen Resistenz *de novo* synthetisierten, antimikrobiellen Sekundärmetabolite werden auch als Phytoalexine bezeichnet (VanEtten et al. 1994). Die Phytoalexine weisen eine große chemische Vielfalt auf und die Synthese der einzelnen Substanzen ist meist auf wenige Pflanzenarten beschränkt. Camalexin ist ein in verschiedenen Kruziferen nachgewiesenes Phytoalexin, welches in *A. thaliana* als

Komponente der basalen Abwehrreaktion induziert wird (zur Übersicht siehe Glawischnig 2007). Die Resistenz von *A. thaliana* gegenüber den nekrotrophen Pilzen *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* konnte mit der Synthese von Camalexin korreliert werden (Thomma et al. 1999; Ferrari et al. 2007). Unter anderem führt der PAMP-Elicitor Flagellin zu einer transkriptionellen Induktion des Camalexin-Synthese-Gens „Phytoalexin Deficient 3“ (PAD3) (Qiu et al. 2008). Die von PAD3 kodierte Cytochrom P450-Monooxygenase CYP71B15 katalysiert den letzten Schritt der Camalexin-Synthese (Zhou et al. 1999). Die PAD3-Induktion erfolgt durch die Derepression des PAD3-aktivierenden Transkriptionsfaktors WRKY33. Diese Aktivierung von WRKY33 ist abhängig von der Phosphorylierung von zwei mit WRKY33 assoziierten MAP-Kinasen, MKS1 und MPK4. Nach Pathogen-Stimulus dissoziiert MPK4 von WRKY33 und WRKY33 kann anschließend durch die Bindung an den PAD3-Promoter dessen Transkription induzieren (Qiu et al. 2008). Zusätzlich zu der Regulation über MPK4 und MKS1 ist die Induktion der Camalexin-Synthese von der Aktivierung der MAPKKK $\alpha$ /MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 MAP-Kinase-Kaskade abhängig (Ren et al. 2008). Die Camalexin-Induktion zeigt beispielhaft, wie ein PAMP-Signal über einen Rezeptor wahrgenommen wird und das Signal unter Beteiligung von MAP-Kinasen und Transkriptionsfaktoren zur Transkription eines Phytoalexin-Synthese-Gens führt.

Neben der Induktion von Phytoalexinen kommt es im Bereich des Pathogenbefalls zu einer Verstärkung der Zellwand (zur Übersicht siehe Hückelhoven 2007). Einerseits wird die Zellwand durch eine stärkere Vernetzung des Zellwandlignins gefestigt, zum anderen kommt es im Bereich der Pathogenpenetration häufig zu einer lokalen Kalloseapposition.

Die während der PTI induzierten reaktiven Sauerstoffspezies haben eine Funktion bei der Verstärkung der Zellwand, wahrscheinlich eine direkte antibiotische Wirkung, eine Signalfunktion und sie lösen in hohen Konzentrationen einen programmierten Zelltod aus (Lamb und Dixon 1997).

Die Reaktion der Pflanze auf einen PAMP-Elicitor wurde auch vielfach auf transkriptioneller Ebene untersucht. Die transkriptionellen Veränderungen während der PTI umfassen bis zu 3% des *Arabidopsis*-Genoms und die durch verschiedene PAMPs ausgelösten Transkriptionsprofile zeigen eine deutliche Überschneidung der induzierten



Transkripte (zur Übersicht siehe Schwessinger und Zipfel 2008). Unter den induzierten Transkripten sind auch Vertreter der durch verschiedene Pathogene induzierten Abwehr-spezifischen PR-Gene enthalten. Die PR-Proteine können in 17 verschiedene Protein-Familien unterteilt werden (Tabelle 1), wobei die genaue Funktion vieler der von den PR-Genen kodierten Proteine bisher ungeklärt ist (van Loon et al. 2006).

**Tabelle 1: Übersicht der 17 PR-Protein-Familien mit dem jeweils charakteristischen Vertreter (Type member) und den Protein-Eigenschaften (Properties) der jeweiligen PR-Gen Familie. Verändert aus van Loon et al. (2006).**

Family	Type member	Properties
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown
PR-2	Tobacco PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II
PR-5	Tobacco S	Thaumatococcus-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P <sub>69</sub>	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown

Angepasste phytopathogene Mikroben haben Mechanismen entwickelt, um die mit der PTI einhergehenden pflanzlichen Abwehrmaßnahmen zu überwinden. Indem sie die PAMP-Erkennung umgehen, Komponenten der PTI supprimieren oder tolerant gegenüber den pflanzlichen Abwehrmaßnahmen sind, können spezialisierte Pathogene eine Infektion der Wirtspflanze erreichen. Das phytopathogene Bakterium *Xanthomonas campestris pv. campestris* besitzt beispielsweise einen Polymorphismus im *flg22* Peptid, so dass der *Arabidopsis*-FLS2-Rezeptor dieses modifizierte Flagellin nicht mehr erkennt (Sun et al. 2006). Um die toxische Wirkung von Phytoalexinen zu entkräften, können einige Pathogene diese durch lytischen Abbau entgiften (Pedras und Ahiahonu 2005). Eine besondere Rolle beim Infektionsprozess angepasster Mikroorganismen spielen die von Pathogenen freigesetzten Effektormoleküle. Effektoren dienen einerseits der Suppression von pflanzlichen Abwehrmaßnahmen, andererseits haben sie Funktionen

bei der Etablierung der parasitären Interaktion (da Cunha et al. 2007). Hat ein Effektormolekül eine bedeutende Funktion für den Infektionserfolg, wird es als Virulenz-Faktor bezeichnet.

Die Effektormoleküle können wiederum von der Pflanze durch Rezeptoren wahrgenommen werden und die „Effektor-ausgelöste-Immunreaktion“ (ETI) induzieren. Die ETI wird auch als „Gen für Gen“-Abwehr bezeichnet, da hier ein Pathogen-spezifisches Effektormolekül (Avirulenz-Faktor) von einem spezifischen pflanzlichen Rezeptor (Resistenz-Gen) erkannt wird (Flor 1971). Diese „Gen für Gen“-Resistenz ist im Gegensatz zu der sehr allgemeinen PAMP-vermittelten Basalresistenz rassenspezifisch, da hier ein für eine Pathogenrasse spezifisches Effektormolekül Auslöser der Resistenzantwort ist. Die Erkennung eines Effektors kann auch indirekt stattfinden, indem nicht das Effektormolekül direkt an ein Avirulenz-Protein bindet, sondern nach dem „guard“-Modell der Rezeptor die durch das Effektormolekül ausgelösten Veränderungen in der Pflanzenzelle erkennt (Dangl und Jones 2001). Bei diesem Mechanismus kann ein Rezeptor verschiedene Effektormoleküle wahrnehmen und die Bezeichnung „Gen für Gen“-Resistenz ist irreführend (van der Hoorn und Kamoun 2008). Die Effektor-ausgelöste Abwehr verläuft schneller und intensiver als die PTI und führt häufig zu einer lokalen Zelltodreaktion (HR), welche mit einer Akkumulation von ROS einhergeht („oxidative burst“). Durch die HR wird biotrophen Pathogenen ihr Substrat genommen und die hohe Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies, die beim „oxidative burst“ akkumuliert, hat zusätzlich eine antimikrobielle Wirkung. Durch vermehrte Lignin- und Kallozesynthese werden die Zellwände um das nekrotische Gewebe verstärkt, wodurch die Ausbreitung des Pathogens zusätzlich eingedämmt wird.

Viele der Signalprozesse der basalen Immunreaktion sind von Pflanzenhormonen abhängig. Am besten sind dabei die wechselseitigen Wirkungen von Salizylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) auf die Abwehrreaktion untersucht (zur Übersicht siehe Koornneef und Pieterse 2008). ET und JA übernehmen bei der Interaktion mit nekrotrophen Pilzen, SA hauptsächlich bei biotrophen Interaktionen eine zentrale Signalfunktion (Glazebrook 2005). SA wirkt antagonistisch zu JA- und ET- Signalen, indem es bei nekrotrophen Interaktionen die Aktivierung von JA- und ET- responsiven Genen unterdrückt und eine für nekrotrophe Pathogene förderliche Zelltodreaktion

auslöst. Zusätzlich zu SA, JA und ET dienen auch Absicinsäure- (ABA), Brassinosteroid- (BR) und Auxin-Signale als Modulatoren der Abwehr (zur Übersicht siehe Spoel und Dong 2008).

Obwohl Pflanzen ein Kreislaufsystem fehlt, ist es auch ihnen möglich neben der lokalen Basal-Abwehr über mobile Signale systemische Immunreaktionen zu induzieren. Die „*Systemic Acquired Resistance*“ (SAR) oder die „*Induced Systemic Resistance*“ (ISR) sind solche systemischen Prozesse. Die SAR wird in der Regel nach der Infektion durch biotrophe Pathogene abhängig von dem Pflanzenhormon SA ausgelöst (Durrant und Dong 2004). Die ISR ist eine systemisch erworbene Resistenz, welche abhängig von den Pflanzenhormonen JA und ET nach der Besiedlung der Wurzel durch nicht-pathogene Rhizobakterien induziert wird (Bakker et al. 2007; van Loon et al. 1998). Beide Prozesse führen dazu, dass die Pflanze eine Zweitinfektion in einem von der Erstinfektion entfernten Gewebe effektiver Abwehren kann.

Die meisten der in diesem Abschnitt diskutierten Erkenntnisse über das pflanzliche Immunsystem stammen aus Untersuchungen mit Blattpathogenen. Detaillierte Untersuchungen über Abwehrprozesse der Wurzel fehlen bis heute und die bisherigen Erkenntnisse weisen auf einen deutlichen Unterschied in der Pathogenantwort von Blatt und Wurzel hin (Okubara und Paulitz 2005). Bei dem Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Abwehrreaktionen der *A. thaliana* Wurzeln nach *Verticillium*-Infektion mit den für Blattpathogene beschriebenen Reaktionen der PTI und ETI muss dieser Unterschied berücksichtigt werden.

## 1.2 Vaskuläre Pilzkrankheiten bei Pflanzen

Die Tracheomykose ist ein Krankheitsbild bei Pflanzen, welches vorwiegend durch phytopathogene Pilze der Gattungen *Fusarium* und *Verticillium* ausgelöst wird. Aber auch Vertreter anderer Pilzgattungen führen zu einer Tracheomykose, wie beispielsweise der Auslöser des Ulmensterbens *Ceratocystis ulmi* und der Auslöser der Streifenkrankheit von Getreide *Cephalosporium gramineum* (Takai 1974; Slope 1962). Das besondere dieser Erreger ist ihre Spezialisierung auf die Besiedelung des Xylems der Pflanze. Das Xylem dient hauptsächlich dem Transport von Wasser und Nährsalzen von der Wurzel zu den Blättern. Da Xylemsäfte auch in geringem Maße Zucker, Aminosäuren und Proteine enthalten bieten sie Mikroorganismen einen nährstoffarmen

Lebensraum (Buhtz et al. 2004; Iwai et al. 2003). Das Krankheitsbild der Tracheomykose ist nicht einheitlich, aber häufig kommt es bei befallenen Pflanzen zu einer Wachstumsdepression, Welkesymptomen, Chlorosen, Nekrosen und einer braunen Verfärbung des Leitgewebes (Beckman 1987). Die durch vaskuläre Pathogene ausgelösten Welkesymptome werden auf verschiedene Faktoren zurückgeführt. Zum einen verstopft das sich im Infektionsverlauf in den Xylemelementen ausbreitende Pilzmycel die Leitungsbahnen, zum anderen kommt es während der Abwehrreaktion der Pflanze häufig zur Absonderung von Kallose, Suberin, Gelen und zu Membraneinstülpungen (Thyllen) in das Xylem (Beckman 1987). Diese Maßnahmen können die Ausbreitung des Pilzes blockieren und ihn im Xylem isolieren, führen aber auch zu einer Verringerung der Wasserleitfähigkeit des Xylems (Pegg und Brady 2002). Einige der vaskulären Pathogene setzen im Leitgewebe außerdem Phytotoxine frei, welche zu der Ausprägung von Welke und Chlorosen beitragen (Beckman 1987). Da sich die Erreger in dem Leitgewebe der Pflanze befinden, ist nach einer Infektion eine Bekämpfung mit Fungiziden schwer möglich. Außerdem besitzen *Verticillium*- und *Fusarium*-Arten sehr widerstandsfähige Dauerformen, die Mikro- und Makrosklerotien, welche auch nach vielen Jahren im Boden infektiös bleiben. Daher stellen die vaskulären Pilzkrankheiten, welche viele agronomisch wichtige Pflanzen befallen, ein besonderes Problem in der Landwirtschaft dar.

*Fusarium* kann als Modellorganismus für bodenbürtige vaskuläre Pathogene betrachtet werden (Roncero et al. 2003). Die Gattung *Fusarium* umfasst verschiedene Arten, von denen *Fusarium oxysporum* (Fox) als Auslöser von Wurzelfäule und Welkekrankheiten in über 100 Pflanzenarten besonders intensiv erforscht wurde (Berrocal-Lobo und Molina 2008). *Fusarium oxysporum* wird in viele Spezialformen (ff.ssp.: formae speciales) unterteilt, die jeweils ein eingeschränktes Wirtsspektrum haben und meist nach ihrer vorwiegenden Wirtspflanze benannt sind. Die Infektion findet an der Wurzel statt, von wo sich Fox durch das Leitgewebe bis in den Spross ausbreitet. Im Infektionsverlauf führt der Pilz durch die Verstopfung der Leitungsbahnen und durch die Absonderung von Welketoxinen zur Welke und schließlich zum Absterben der Wirtspflanze. Da auch *A. thaliana* von Fox als Wirtspflanze befallen wird, konnten verschiedene molekulare Aspekte der *Arabidopsis*-Fox-Interaktion erforscht werden. Aus Resistenz-Studien geht hervor, dass die Resistenz gegenüber Fox ein von

verschiedenen Genen („*oligogenic trait*“) vermitteltes Merkmal ist. Bei der Interaktion von *A. thaliana Col-0* mit *Fox f. sp. mathiolae* konnten 6 dominante „Resistenz gegen *Fox*“ vermittelnde Loci (RFO) identifiziert werden (Diener und Ausubel 2005). Von den RFO-Genen hat RFO1 den größten Einfluss auf die Resistenz. RFO1 kodiert für eine Rezeptor ähnliche Kinase der WAK/WAKL-Klasse namens WAKL22 (Verica und He 2002). Wahrscheinlich dient RFO1 als Rezeptor bei der Aktivierung von PAMP-vermittelter Resistenz. Auch für die Interaktion von *Fox f. sp. lycopersici* mit Tomate (*Solanum lycopersicon*) konnten sechs Resistenz-Loci (*I-1* bis *I-6*) identifiziert werden, von denen *I-2* vollständige Resistenz gegen verschiedene Arten von *Fox* vermittelt (Simons et al. 1998).

Bei transkriptionellen Veränderungen übernehmen Transkriptionsfaktoren die Vermittlerrolle zwischen Pathogen-induzierten Signalkaskaden und der Genexpression. „Ethylen Responsiv Element binding Factors“ (ERFs) gehören zu einer in *A. thaliana* 122 Gene umfassenden Transkriptionsfaktor-Familie (Nakano et al. 2006). Im *Fox*-Pathosystem zeigen die Überexpressionslinien von ERF1 und ERF2 eine erhöhte Resistenz (McGrath et al. 2005; Berrocal-Lobo und Molina 2004). ERF1 und ERF2 sind jeweils durch Methyl-Jasmonat induzierbar und in der ERF2-Überexpressionslinie ist das JA-Markergen PDF1.2 konstitutiv induziert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die JA-abhängige Induktion von ERF1 und ERF2 in einer ERF14 *knock out*-Mutante nicht mehr stattfindet (Oñate-Sánchez et al. 2007). Diese Mutante ist entsprechend suszeptibler gegenüber *Fox*. Die Transkriptionsfaktoren ERF4, MYC2 und ATAF2 sind hingegen negative Regulatoren der *Fox*-Resistenz (Anderson et al. 2004; McGrath et al. 2005; Delessert et al. 2005). Das ERF4-Protein ist im Gegensatz zu ERF1 und ERF2 ein transkriptioneller Repressor und die ERF4-Überexpressionslinien zeigen eine verringerte JA-Induzierbarkeit von PDF1.2. ERF1 und ERF2 scheinen eine zu dem transkriptionellen Repressor ERF4 antagonistische Funktion in der JA-vermittelten Induktion von PR-Genen zu haben und dadurch die Resistenz gegenüber *Fox* zu beeinflussen.

Neben der PR-Gen-Induktion erfolgt nach *Fox*-Infektion durch die Induktion von Peroxidasen und NADPH-Oxidasen eine Generierung von ROS (Berrocal-Lobo und Molina 2008). Außerdem geht aus Mutanten-Analysen hervor, dass bei der basalen *Fox*-

Abwehr SA-, JA-, ET- und ABA- vermittelte Prozesse eine wichtige Funktion einnehmen (Berrocal-Lobo und Molina 2008).

### 1.3 Das vaskuläre Pathogen *Verticillium longisporum*

Die Gattung *Verticillium* gehört phylogenetisch dem Stamm der *Ascomyceten* an und kann deren Untergruppe der filamentösen *Ascomyceten* zugeordnet werden (Hibbett et al. 2007). Weiterhin lassen sich die *Verticillium ssp.* in die Klasse der *Soradiomycetes* und weiter in die Ordnung der *Phyllachorales* einordnen. Da *Verticillium* keine Ascosporen ausbildet und damit kein sexuelles Stadium besitzt (anamorph), werden *Verticillium ssp.* auch der Sammelgruppe der *Deuteromyceten* zugeordnet. Die *Deuteromyceten* sind allerdings eine Formtaxa und keine monophyletische Ordnung. Die Gattung der *Verticillium ssp.* ist eine weit verbreitete Gruppe von bedeutenden Pflanzenpathogenen, welche besonders in kalten und gemäßigten Zonen zu finden ist (Pegg und Brady 2002). Den *Verticillium ssp.* werden nach allgemeinem Konsens aktuell sechs phytopathogene Arten zugeordnet (Barbara und Clewes 2003). Von diesen sind die weit verbreiteten hemi-biotrophen Arten *Verticillium dahliae* und *Verticillium albo-atrum* die am besten untersuchten und aggressivsten. *V. dahliae* hat ein sehr breites Wirtsspektrum und befällt unter anderem Tomate, Pfeffer, Wassermelone, Minze, Kantalupmelone, Kopfsalat, Kartoffel, Baumwolle und Erdbeere. *V. albo-atrum* ist hauptsächlich für *Verticillium*-Welke in Hopfen, Tomate, Kartoffel und Luzerne verantwortlich. Die vier anderen Arten *V. tricorpus*, *V. nigrescens*, *V. nubilum* und *V. theobromae* sind ähnliche, aber nicht so bedeutende Phytopathogene oder Boden-Saprophyten. Von Karapappa et al. wurde die Einführung der neuen *Verticillium* Art *V. longisporum* vorgeschlagen, welche alle langsporigen, auf *Brassica*-Arten spezialisierten Isolate einschließt (Karapapa und Typas 2001; Karapapa et al. 1997). Im Vergleich zu *V. dahliae* lässt sich *V. longisporum* morphologisch durch längliche Konidiosporen und verlängerte Mikrosklerotien unterscheiden. Auch molekular wurde die phylogenetische Unterscheidung durch eine *V. longisporum*-spezifische Enzymausstattung (Karapapa et al. 1997) und dem Nachweis von artspezifischen genetischen Elementen begründet (Karapapa und Typas 2001). *V. longisporum* weist im Vergleich zu *V. dahliae* und *V. albo-atrum* außerdem eine annähernde Verdoppelung des Genoms auf (amphihaploid). Wahrscheinlich ist diese Amphihaploidie bei *V.*

*longisporum* durch die parasexuelle Hybridisierung von zwei *Verticillium*-Arten entstanden (Collins et al. 2003; Barbara et al. 2005).

Im Gegensatz zu *V. dahliae* und *V. albo-atrum* mit einem sehr breiten Wirtsspektrum beschränkt sich das Wirtspflanzen-Spektrum von *V. longisporum* auf Kreuzblütler (Zeise und Tiedemann 2001; Zeise und Tiedemann 2002). Im Rapsanbau stellt *V. longisporum* durch die ausgelösten Krankheitssymptome und die damit einhergehenden Ernteeinbußen eine bedeutendes Pathogen dar. Durch den intensiven Anbau von Raps (*Brassica napus*) als der wichtigsten Ölpflanze Europas ist der *Verticillium*-Befall ein zunehmendes Problem (Dunker et al. 2006). Da die sehr langlebigen *V. longisporum*-Überdauerungsorgane (Mikrosklerotien) schwer zu bekämpfen sind, reichert sich bei intensivem Rapsanbau das Inokulum im Boden an. Resistente Rapssorten liegen bisher nicht vor (Rygulla et al. 2007). Der Befall kann einzig durch eine breite Fruchtfolge effektiv verringert werden (Pegg und Brady 2002). Der Infektionszyklus (Abbildung 2) von *V. longisporum* und *V. dahliae* ist sehr ähnlich und lässt sich in eine ruhende, eine parasitische und eine saprophytische Entwicklungsphase einteilen (Fradin und Thomma 2006).

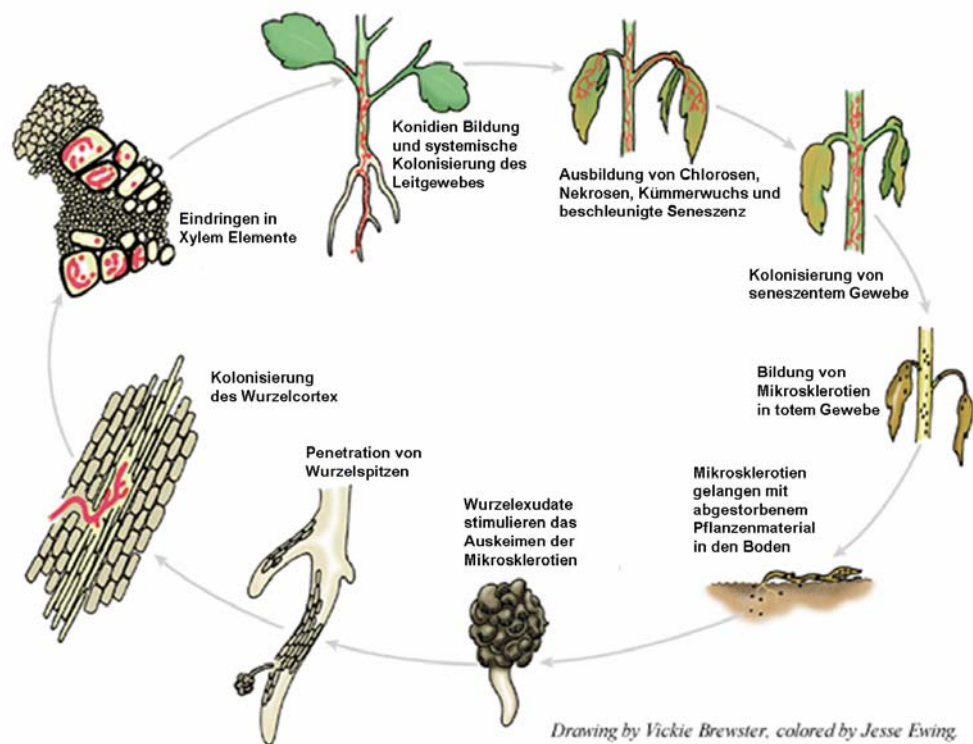


Abbildung 2: Infektionszyklus von *Verticillium*-Arten verändert nach Berlangier und Powelson (Berlangier und Powelson 2000).

Die Dauerform der ruhenden Phase bilden die Mikrosklerotien, welche aus Aggregaten von stark melanisierten, dickwandigen Hyphen bestehen (Gordee und Porter 1985; Klimes und Dobinson 2006). Durch die Nähe zu einer Wurzel und den damit verbundenen chemischen Signalen von Wurzelexudaten keimen die Mikrosklerotien aus und die *Verticillium*-Hyphen beginnen, den Wurzelkortex zu penetrieren (Beckman 1987). Infektions-Studien von *V. longisporum* und *V. dahliae* mit *Brassica napus* zeigten, dass *Verticillium* 36 Stunden nach Inokulation die Epidermiszellen der Wurzelhaare netzartig bedeckt (Eynck et al. 2007). Dabei weist *V. longisporum* ein entlang der Grenzen der Wurzel-Epidermiszellen verlaufendes Hyphenwachstum auf, während *V. dahliae* auf Rapswurzeln ein ungerichtetes Hyphenwachstum zeigt (Eynck et al. 2007). Als Eintrittsstellen für den Pilz gelten Wurzelbereiche wie Initiationszonen von Seitenwurzeln oder Wurzelspitzen, an denen die Endodermis noch nicht vollständig ausgebildet ist (Pegg und Brady 2002; Bishop und Cooper 1983). *V. longisporum* penetriert die Wurzel ohne die Ausbildung von Appressorien; lediglich eine leichte Hyphenschwellung tritt an den Penetrationsstellen auf (Eynck et al. 2007). Die Pilzhyphe wachsen inter- und intrazellulär durch den Wurzelcortex zum Zentralzylinder (Eynck et al. 2007). Eine Belastung des Bodens mit Nematoden, welche zu Verletzungen der Wurzeln führen, kann den Befall durch *V. dahliae* verstärken (Back et al. 2002; Bowers et al. 1996).

Nach dem Durchdringen von Wurzelcortex und Endodermis breitet sich *Verticillium* in den Xylemelementen des Leitgewebes aus, wobei *V. longisporum* nur einzelne Leitgefäße des Xylems besiedelt (Eynck et al. 2007). In den nährstoffarmen, apoplastischen Xylemsäften zeigt *Verticillium* neben normalem Hyphenwachstum auch eine „hefeähnliche“ Bildung von Konidiosporen (Buckley et al. 1969). Dabei beschleunigen die Konidiosporen, welche mit dem Transpirationsstrom aufwärts transportiert werden, die systemische Besiedelung (Pegg und Brady 2002). Werden die Konidien an Gefäßenden oder Siebplatten aufgehalten, keimen sie aus und wachsen in aufwärts gelegene Gefäßelemente ein (Beckman 1987). Während der weiterschreitenden Kolonisierung der Leitgefäße entwickeln die infizierten Pflanzen typische Krankheits-Symptome. Bei Raps kommt es durch *V. longisporum* zu Chlorosen der Blätter, einem gestauchten Wuchs und einem verfrühten Abreifen der Pflanze. *V. dahliae* konnte bei Raps keine Symptome auslösen (Eynck et al. 2007).



Welkesymptome, welche bei anderen *Verticillium*- und *Fusarium*-Interaktionen häufig auftreten, werden durch *V. longisporum* nicht ausgelöst. Neben den äußerlichen Schadsymptomen zeigen infizierte Pflanzen auch braune Verfärbungen von Leitgefäßen in Stängelquerschnitten. Diese vaskulären Verfärbungen sind vermutlich auf die Anreicherung phenolischer Substanzen in befallenen Gefäßabschnitten zurückzuführen (Eynck 2007). Mit beginnender Seneszenz der Wirtspflanze tritt der Pilz in die saprophytische Phase ein. Dann bricht er aus dem Zentralzylinder heraus und bildet in totem Gewebe Mikrosklerotien. Die Mikrosklerotien gelangen mit dem abgestorbenen Pflanzenmaterial zurück in den Boden, wo sie 10-15 Jahre im Ruhestadium überdauern können (Wilhelm 1955). In dieser Langlebigkeit liegt die besondere Problematik des intensiven Rapsanbaus, da sich das Inokulum im Boden anreichert. Durch den Anbau von geeigneten Nicht-Wirtspflanzen als Zwischenfrucht, welche auch zum Auskeimen der Mikrosklerotien führen, lässt sich die Inokulumkonzentration im Boden verringern (Pegg und Brady 2002).

Da die Bekämpfung von *Verticillium ssp.* mit den Mitteln des Pflanzenschutzes nicht effektiv ist, beruht die Hoffnung auf der Züchtung von *Verticillium*-resistenten oder -toleranten Sorten. In verschiedenen Pflanzen wie Raps (Rygulla et al. 2008), Baumwolle (Wang et al. 2008; Bolek et al. 2005), Tomate (Kawchuk et al. 2001) und Kartoffel (Simko et al. 2004; Hunter et al. 1968) konnten polygene Resistenz-Loci gegen *Verticillium ssp.* kartiert werden. Der in Tomate identifizierte *Ve*-Locus vermittelt Resistenz gegenüber *V. dahliae* und *V. albo-atrum*. Die Resistenzgene des *Ve*-Locus *Ve1* und *Ve2* kodieren für „leucin rich repeat“-Proteine der Klasse der RLPs (Kawchuk et al. 2001).

Resistenz gegenüber *Verticillium ssp.* kann in der pre-vaskulären und in der vaskulären Phase der Besiedlung determiniert werden (Talboys 1972). Bei vielen *Verticillium*-Infektionen zeigte sich, dass die Infektion die pre-vaskuläre Phase nicht überschreitet und der Wurzelkortex nur bis zur Endodermis besiedelt wird, ohne dadurch in der Pflanze gravierende Krankheitssymptome auszulösen (Talboys 1972; Huisman 1988; Eynck et al. 2007). Dabei blockieren die suberinisierte Endodermis, Ligninablagerungen, Zellwandappositionen und die Bildung von Lignituben (auch Papillen genannt) die Ausbreitung der Hyphen im Zentralzylinder der Wurzel (Talboys 1972; Fradin und Thomma 2006; Griffiths 1971). In dieser Phase werden von der

Pflanze auch antimikrobielle Stoffe zur Pilzabwehr produziert (Bell 1969; Daayf et al. 1997). Bei anderen Interaktionen wird die *Verticillium*-Resistenz erst in der vaskulären Phase determiniert. Bei der vaskulären Ausbreitung von *V. dahliae* kommt es zu alternierenden Phasen von Pilz-Propagation und Pilz-Eliminierung (Heinz et al. 1998). In „resistenten“ Pflanzen wird der Pilz in der Wurzel und der Stängelbasis durch eine schnelle Abwehrreaktion zurückgehalten, während der Pilz in suszeptiblen Pflanzen den Abwehrmechanismen entkommt (Talboys 1972; Heinz et al. 1998). Im Zusammenhang mit der Eindämmung und Eliminierung von *Verticillium ssp.* im Xylem wurden verschiedene Abwehrreaktionen der Pflanze identifiziert. Die Eindämmung erfolgt durch Ablagerung von Suberin und anderen Abschlußmaterialien im Xylem (Robb et al. 1989; Benhamou 1995). Bei der Eliminierung von *Verticillium ssp.* konnten in verschiedenen Pflanzen antimikrobiellen Molekülen eine Funktion in der Resistenz nachgewiesen werden. Beispielsweise wurden Glucanasen, Chitinasen, Phytoalexine und elementarer Schwefel in *Verticillium*-infizierten Pflanzen gebildet (Bell 1969; Benhamou 1995; Cooper und Williams 2004; Daayf et al. 1997; Talboys 1972; Williams et al. 2002; Floerl et al. 2008).

Die molekularen Mechanismen, welche die *V. longisporum*-Pathogenese in der Rapspflanze bestimmen, sind bisher erst wenig aufgeklärt. Für die Untersuchung der molekularen Aspekte der *V. longisporum*-Infektion kann die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*Ackerschmalwand*), welche wie Raps zu den *Brassicaceen* gehört, eingesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass *A. thaliana* unter Laborbedingungen von *V. longisporum* befallen wird und die für die Wirtspflanze Raps (*Brassica oleracea*) typischen Krankheitssymptome entwickelt (Veronese et al. 2003; Steventon et al. 2001). Das *A. thaliana*-Genom wurde 2000 vollständig sequenziert (Arabidopsis Genome Initiative 2000) und *Arabidopsis* entwickelte sich zur Modellpflanze der molekularen Pflanzenwissenschaft (Somerville und Koornneef 2002).

Veronese et al. (2003) haben für *A. thaliana* den Toleranz vermittelnden Lokus *Vet1* (*Verticillium longisporum tolerance1*) identifiziert. Bei der Symptomausprägung scheint Ethylen eine Bedeutung zu haben, da in der Ethylen-insensitiven Mutante *etr1-1* die *V. longisporum*-induzierten Symptome ausbleiben und nach *Verticillium*-Infektion Ethylen induziert wird (Tjamos et al. 2005; Veronese et al. 2003; Johansson et al. 2006). Die ET-insensitiven Mutanten *ein2-1*, *ein4-1*, *ein6-1* sind dagegen suszeptibler

(Veronese et al. 2003; Johansson et al. 2006). Eine Induktion der Markergene *PR1* und *PDF1.2*, entsprechend für eine aktivierte SA- bzw. JA- regulierte Abwehr, konnten Veronese et al. (2003) nach Infektion nicht nachweisen. In den Experimenten von Tjamos et al. (2005) konnte jedoch eine erhöhte Suszeptibilität der SA-defizienten Mutanten *sid2* und *eds5/sid1* festgestellt werden (Tjamos et al. 2005). Außerdem konnten sie entgegen den Ergebnissen von Veronese et al. eine Induktion des *PR1*-Transkriptes zeigen.

Weitere widersprüchliche Ergebnisse wurden durch die Studien von Johansson et al. (2006) beigetragen. Sie konnten die *VET1*-abhängige Toleranz gegen *V. longisporum* unter ihren Versuchsbedingungen nicht reproduzieren. Die mit SA-induzierten Abwehrmechanismen assoziierten Mutanten *eds1-1*, *pad4-1* und *sid2-1* erwiesen sich als resistenter gegenüber *V. longisporum* (Johansson et al. 2006). Die Mutanten *pad1-1*, *coil-16* und *esa1-1*, welche in JA-vermittelte Abwehrprozesse eingeordnet werden, waren dagegen deutlich suszeptibler. Außerdem zeigte sich die *npr1-1* Mutante als besonders suszeptibel. NPR1 ist ein Schlüsselregulator der SAR und ist auch beim „Crosstalk“ von ET-, JA- und SA-Signalen wichtig (Dong 2004). Johansson et al. (2006) schließen aus ihren Beobachtungen, dass es einen ET- und JA-Signalweg abhängigen Resistenz-Mechanismus gibt, der durch den SA-Antagonismus reprimiert werden kann. Zudem wurde dem *F. oxysporum* Resistenzgen RFO1 und der R-Gen-Signalkomponente NDR1 eine Beteiligung an der *V. longisporum*-Resistenz nachgewiesen (Johansson et al. 2006). Die getestete Camalexin-Synthese-Mutante *pad3-1* zeigte keine deutlichen Unterschiede in der Suszeptibilität.

Die widersprüchlichen Ergebnisse der drei Studien begründen Johansson et al. mit den unterschiedlichen Kultur- und Infektionsbedingungen. Alle drei Studien verwendeten für die Resistenzstudien relativ artifizielle *in vitro*-Infektions-Systeme, sowie verschiedene *Verticillium*-Kultivare.

Neben den Mutanten-Analysen wurden Microarray-Experimente mit dem Blattgewebe von *V. longisporum*-infizierten *A. thaliana*-Pflanzen durchgeführt (Tappe 2008). Die Expressions-Profile für die Zeitpunkte 5 und 18 Tage nach *V. longisporum*-Infektion ergaben diverse *V. longisporum*-induzierte Gene (*Vligns*). Die relativ geringe Zahl der induzierten *Vligns* zeigt, dass während der vaskulären Phase des *V. longisporum*-Entwicklungszyklus nur eine geringe Abwehrreaktion der Pflanze induziert wird. Die

zeitliche und lokale Induktion einiger *Vlgs*, welche anhand von Luciferase-Reporterlinien untersucht wurde, ergab ab fünf Tagen nach Infektion eine auf das Leitgewebe beschränkte Induktion. Die Reporteraktivität ließ sich auch durch Extrakte von *Verticillium*-Kulturmedium induzieren, was auf einen von *V. longisporum* ins Medium abgesonderten Elicitor schließen lässt (Tappe 2008).

Neben den transkriptionellen Untersuchungen in *A. thaliana* wurden auch Analysen des in Raps (*Brassica napus* var. *napus*) durch *V. longisporum* differentiell induzierten Proteoms durchgeführt (Floerl et al. 2008). Dabei konnte in apoplastischen Xylem- und Blatt-Säften eine *V. longisporum*-induzierte Veränderung im Proteom festgestellt werden und verschiedene induzierte PR-Proteine identifiziert werden (Floerl et al. 2008). Über molekulare Reaktionen während der frühen pre-vaskulären Pflanze-Pilz-Interaktion im Wurzelgewebe gibt es bisher noch keine Erkenntnisse.

## 1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, *Arabidopsis*-Gene zu identifizieren, welche an Signaltransduktions-Prozessen der pflanzlichen Antwort auf *Verticillium*-Infektion oder an der Ausprägung von Krankheitssymptomen beteiligt sind. Zwei verschiedene Aspekte der Interaktion stehen im Fokus der vorliegenden Arbeit. Zum einen sollen frühe, lokal in der Wurzel durch *Vl43*-Infektion induzierte Transkripte identifiziert werden, zum anderen soll eine Transkriptionsfaktor-Überexpressions-Populationen nach Veränderungen der durch *V. longisporum* induzierten Pathogenese durchmustert werden. Die transkriptionelle Induktion von *Vl43*-responsiven Genen soll einerseits durch die Durchmusterung einer Luciferase-Promoter-Trap-Kollektion nach induzierter Reporter-Aktivität, andererseits durch die Durchführung eines Microarray-Experimentes untersucht werden. Die Funktion der isolierten *Vl43*-responsiven Gene soll durch die Analyse von Überexpressionslinien und *knock out*-Mutanten ausgewählter Gene näher charakterisiert werden.

Für die Identifizierung von Überexpressions-Pflanzen, welche eine erhöhte Resistenz gegenüber *V. longisporum*-Infektion aufweisen, soll unter Anwendung der Gateway<sup>®</sup>-Klonierungstechnik (Invitrogen) eine Transkriptionsfaktor-Überexpressions-Kollektion erstellt werden. Diese Kollektion soll im Weiteren durch Bonitur des durch *V. longisporum* induzierten Pathophänotypen nach resistenten *Arabidopsis*-Linien

durchmustert werden. Die nähere Charakterisierung der durch die überexprimierten Transkriptionsfaktoren regulierten Transkripte soll die molekulare Ursache einer erhöhten Resistenz aufklären.

Um geeignete Screeningparameter für eine Massen-Durchmusterung definieren zu können, muss zunächst eine genaue Charakterisierung des durch *Vl43*-Infektion in *Arabidopsis* ausgelösten Pathophänotyps durchgeführt werden.

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen muss zum einen ein Infektionssystem etabliert werden, mit dessen Hilfe die Untersuchung der frühen transkriptionellen Veränderung in der Wurzel nach *Vl43*-Infektion möglich ist, zum anderen muss ein Infektionssystem etabliert werden, mit dessen Hilfe die Suszeptibilität von *Arabidopsis* gegenüber *Vl43* evaluiert werden kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pilze

Isolat	Eigenschaften	Referenz
<i>Verticillium longisporum</i> 43	isoliert in Mecklenburg/Deutschland	Zeise und von Tiedemann, 2002
<i>Verticillium longisporum</i> 18	isoliert in Mecklenburg/Deutschland	Zeise und von Tiedemann, 2002
<i>gLUC-VI43</i>	Gaussia-Luciferase Reporterstamm von <i>VI43</i>	Jan Utermark (Abteilung Prof. Petr Karlovsky)
<i>eGFP-VI43</i>	eGFP-Reporterstamm von <i>VI43</i>	Eynck et al. 2007

#### 2.1.2 Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*)

Ökotyp/Mutante	Eigenschaften	Referenz
<i>Columbia, Col-0</i>	Wildtyp Columbia	N1092
<i>cyp79b2/b3</i>	Ökotyp Col-0, homozygot, Mutationen in CYP79B2 und CYP79B3, in der Mutante ist die IAOx Synthese vom Trptophan unterbrochen	Zhao et al. 2002
<i>pad3-1</i>	Ökotyp Col-0, homozygot, Mutation in CYP71B15, <i>phytoalexin-deficient3</i> , die Mutante ist Camalexin defizient	Glazebrook und Ausubel 1994
<i>yucca-2D</i>	Ökotyp Col-0, homozygot, 35s Activation-tagging Linie von At4g32540, erhöhte Auxin Synthese	Zhao et al. 2001
<i>P<sub>CYP79B2</sub>:LUC</i>	Der 2kb Promoter von <i>CYP79B2</i> wurde ein Luziferase-Reporter gen kloniert und stabil in <i>A. thaliana Col-0</i> transformiert	diese Arbeit
<i>Luciferase Promoter-trap-Kollektion</i>	Kollektion von gepoolten Luciferase Promoter-trap Linien im <i>A. thaliana Col-0</i> Hintergrund	Alvarado et al. 2004
<i>AtTORF-EX-Kollektion</i>	Kollektion von Transkriptionsfaktor Überexpressions Linien im <i>A. thaliana Col-0</i> Hintergrund	diese Arbeit Weiste et al. 2007

#### 2.1.3 Bakterien

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 pMP90-RK	pMP90-RK, gm <sup>r</sup> , rif <sup>r</sup> , km <sup>r</sup>	Koncz und Schell 1968
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	recA1 relA1 thi-1 $\Delta$ lacU 169 $\phi$ 80 (lacZ $\Delta$ M15) hsdR17(rk-mk+)	Hanahan 1983
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F <sup>-</sup> gyr A462 end A1 $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r <sub>B</sub> ,m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) ara14 galK2 lacY1 proA2 rspL20(Sm <sup>r</sup> ) xyl5 $\Delta$ leu mtl1	Bernard et al. 1993

### 2.1.4 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pE-35s-HA-GW	Gateway <sup>®</sup> kompatibler Destinationvektor für die Überexpression HA-getaggtter Proteine	diese Arbeit
pDONR201	pUC ori, Kmr, attL1, Cmr, ccdB, attL2	Invitrogen, 2001
pBGWL7	Gateway <sup>®</sup> -Destination-Vektor, zum Herstellen von Promoter::Luciferase Fusionen, Spec <sup>R</sup>	Karimi et al. 2005
pAlligator2	Gateway <sup>®</sup> -Destination-Vektor, HA-Tag	Bensmihen et al. 2004
pE	Ein pE-Spyne Derivat aus dem das YFP entfernt wurde, Gateway-Destination-Vektor	Caroline Carsjens
pDONR201 At5g05410	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , DREB2A	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>
REGIA-TF-Kollektion	Kollektion von Gateway <sup>®</sup> DONR-Vektoren welche ca. 1200 Transkriptionsfaktor Open Reading Frames enthält	Paz-Ares und The Regia Consortium 2002 <sup>a</sup>
pDONR201 At1g78080	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , RAP2.4	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>
pDONR201 At5g51190	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , ERF#105	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>
pDONR201 At5g47220	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , ERF#101/ERF2	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>
pDONR201 At3g01970	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , WRKY45	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>
pDONR201 At5g13080	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , WRKY75	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>
pDONR201 At1g18330	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , EPR1	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>
pDONR201 At3g23250	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , AtMYB15	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>
pDONR201 At2g43000	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , ANAC042	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>
pDONR201 At5g08790	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , ANAC081/ATAF2	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>
pDONR201 At1g14200	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , Zink-Finger-TF	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>
pDONR201 At5g59820	Gateway <sup>®</sup> Donor-Vektor, km <sup>R</sup> , ZAT12	REGIA-Kollektion <sup>a</sup>

a: Die REGIA-Kollektion ist über die Internetseite des John Innes Centers(Genome Laboratory) frei verfügbar (<http://www.jicgenomelab.co.uk/libraries/arabidopsis/tf.html>)

### 2.1.5 Oligonucleotide

Oligonucleotid	Sequenz 5'-3'
PB	CACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACG
LB41	TTCTCCATATTGACCATCATACTCATTGC
LCE	TTTGTACCAGAGTCCTTTGATCGTG
LC3-LUC-RB	CCTTTCTTTATGTTTTTGGCG
XhoI-HA-GW-fw	ACTCGAGAACAATGGCATAACCCATACGACGTTCC
GWkassetteREV	AGGTACCACCACTTTGTACAAGAAAGCTGAA
pE-HA-RB	CGTATGGATAACCCCATCA

pE-HA-LB	CGTCCCGGACTATGCAGATA
attB1 fw Cyp71A13 prom	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTgatgccttctctgtteta cacgagg
attB2 rw Cyp71A13 prom	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGcatgtaagaagtg tttgattgg
attB1 fw CYP79B2 prom	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcttaagtaaagttggt attgct
attB2 rw CYP79B2 prom	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGcatgtttgtgtatag agaagaag
attB1 fw TSA1 prom	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTgtttcttatgcacatta gtccac
attB2 rw TSA1 prom	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGcatttgaaaaacttt gtggaa
attB1 fw AOX1A prom	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcaacttcgtaatatga acagttaac
attB2 rw AOX1A prom	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGcatgagtaacaaca gttgggggt
attB1 fw T7F6 prom	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTactctctgagctaaac tcaatcc
attB2 rw T7F6 prom	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGcatttttcttactctt gta
attB1 fw At2g43510 prom	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCAAGAACA CCAGAGAAGAAG
attB2 rw At2g43510 prom	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGcattttctctttgttat ctaac
attB1 fw At1g14550 prom	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTctcagtgcgtagtagt gagttttc
attB2 rw At1g14550 prom	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGcatattttagatctc acttgg

### 2.1.6 Oligonucleotide qRT-PCR

AGI	Oligonucleotid	Sequenz 5'-3'
At1g13320	PP2A-1	TAACGTGGCCAAAATGATGC
At1g13320	PP2A-2	GTTCTCCACAAC^CGCTTGGT
At3g62250	UBQ5-1	GACGCTTCATCTCGTCC
At3g62250	UBQ5-2	GTAAACGTAGGTGAGTCCA
At2g38870	At_T7F6.4_1_SG	Qiagen QuantiTect® QT00719502
At5g64120	At_MHJ_24.10_1_SG	Qiagen QuantiTect® QT00848820
At2g43000	At_ANAC042_1_SG	Qiagen QuantiTect® QT00722435
At2g30750	At_CYP71A12_1_SG	Qiagen QuantiTect® QT00760298
At5g38910	At_K15E6.90_1_SG	Qiagen QuantiTect® QT00734615
At3g26830	At_PAD3_1_SG	Qiagen QuantiTect® QT00780339
At1g72900	At_F3N23.10_1_SG	Qiagen QuantiTect® QT00892164
At3g22370	CATMA_AOX1A_5	TGTCCTACAGATCGATTTACCGC
At3g22370	CATMA_AOX1A_3	CATCGGCCGTTCCGATAG
At2g43510	CATMA_At2g43510_5	CAGTAACGTCAAATGCTTATGCGAC
At2g43510	CATMA_At2g43510_3	TCACATTACATCACTTGGATAGACC
At4g37370	CATMA_CYP91A1_5	ACGGTGACCACTGGCGTAAC
At4g37370	CATMA_CYP91A1_3	GAGCCTACCCGCCAACTTCT
At1g17180	CATMA_AtGSTU25_5	AACTGATTGCTTGGGGTAAAAG
At1g17180	CATMA_AtGSTU25_3	AACAGAGCAGAAACAGCAACACA



At1g26380	CATMA_At1g26380_5	AAAGCTAAGAGTGATCCTGAGA
At1g26380	CATMA_At1g26380_3	GTAAAATTTAGAGCATACAATCC
At2g03760	CATMA_At2g03760_5	TCTCCAGTTTGCCTTCTCC
At2g03760	CATMA_At2g03760_3	GCTTCAACCGCTTTTTCGAT
At5g43450	CATMA_At5g43450_5	TGCAGGATTTCTTGCGAGC
At5g43450	CATMA_At5g43450_3	CTTATTGGTACAATGGTTGAGGAAC
At2g26560	CATMA_PLA2A_5	AAGAAAAGAAGATCCGAGAC
At2g26560	CATMA_PLA2A_3	ATCAAACGTACAAGTGACC
At2g41100	CATMA_TCH3_5	GAACCATCAGTTTCTCTGAGTTT
At2g41100	CATMA_TCH3_3	ATGATATTGCTGGCAACCC
At5g12030	CATMA_At-HSP17.6A_5	AAAGCCAAGAAGCAAGAAAG
At5g12030	CATMA_At-HSP17.6A_3	ATCCAGGCATGTCCACG
At3g60140	CATMA_DIN2_5	CCAATCGAGGAGAGATGAGG
At3g60140	CATMA_DIN2_3	ACTACATGTCCAACCATAAGGA
At5g57220	CATMA_CYP81F2_5	GAAGATGTTGACATGACAGAG
At5g57220	CATMA_CYP81F2_3	TGCTTAAACCGGTAAACTTC
At4g05020	CATMA_NDB2_5	GCATCTGATTTTCAACCTCC
At4g05020	CATMA_NDB2_3	AAAGGTAAAAAGCCAACCTG
At1g14550	CATMA_At1g14550_5	TGGAGAGATTTTCACTAAGG
At1g14550	CATMA_At1g14550_3	TGCATGCGGATTAGAGAC
At5g06860	CATMA_PGIP1_5	CCTCACGACCTGTTTGTCT
At5g06860	CATMA_PGIP1_3	GTTGGATTGTACCGGTGAGG
At1g75830	CATMA_LCR67/PDF1.1_5	GTCTTCCCAGCTCACAAA
At1g75830	CATMA_LCR67/PDF1.1_3	CAAAGCAACATAACATATCTGG
At2g43590	CATMA_At2g43590/CHB4_5	TGGCTTTCACAAAAATCTCC
At2g43590	CATMA_At2g43590/CHB4_3	GCATCCAACACCGCAGTA
At5g22300	CATMA_NIT4_5	ATGCAACAAGAAACGTCTCACA
At5g22300	CATMA_NIT4_3	TAGCGTGGCGGGAGTATCG
At4g39950	CATMA_CYP79B2_5	GAGACGACCCGTATATATTTTATG
At4g39950	CATMA_CYP79B2_3	GGAGACACAATTCAAGTGTCCCAA
At5g08790	CZECHO_ATAF2_5	AGCAGATCTCGGCTCCGTTAT
At5g08790	CZECHO_ATAF2_3	GGTAAACTAGACCCGGTTCCGTAA
At1g74080	CHECHO_MYB122_5	TGGAGAGTTTAGCCAAGACGAGGA
At1g74080	CHECHO_MYB122_3	TGGCCGACCATTTGTTGCCAT
At2g47520	CHECHO_AtERF#071_5	GCGTAAACCCGTCTCAGTGAGTGA
At2g47520	CHECHO_AtERF#071_3	TGGCCTCTGCCTTATCCCTCTGTA
At5g47220	CHECHO_AtERF#101/ERF2_5	GAGGAGTCCGTACACCAACATGTC
At5g47220	CHECHO_AtERF#101/ERF2_3	TGTTTCACAGAGAGTTGGGGAGGT
At3g60120	At3g60120 RT-left (BGLU27)	CATCTCCAAAGCATCCAACA
At3g60120	At3g60120 RT-right (BGLU27)	ACCACGCAAAGTATCCTTCAA
At1g74080	MYB122 RT-left	GGTTGAAGAAAGGAGCATGG
At1g74080	MYB122 RT-right	TGCCACATCTTTTGAGTCCA
At1g67980	CCoAMT RT-left	TTTTATCCATTCCGATGGTCTT
At1g67980	CCoAMT RT-right	CATGGAAGTTGACGTAGCTTGA
At1g74590	AtGSTU10 RT-left	TTATGAAAGGGCCAGGTC
At1g74590	AtGSTU10 RT-right	TTGACCCATGACCTCAAACA
At5g38900	At5g38900 RT-left	TTGCAGACTCAGCCATAATGA
At5g38900	At5g38900 RT-right	CTCCATTAATTAGAGGTTTACGAT

### 2.1.7 Pilzmedien

Die Pilzmedien wurden nach Herstellerangaben angesetzt. Um bakterieller Kontamination vorzubeugen, wurden sie mit 500 mg/l Cefotaxim versetzt.

<b>Medium</b>	<b>Hersteller</b>
CPD, Czapek Dox	SIGMA
PDB, Potato Dextrose Broth	SIGMA

### 2.1.8 Pflanzenmedien

**¼ MS:**

(Murashige und Skoog, 1962)

MS-Salze 1,5 g

Einstellen des pH-Wertes auf pH 5,8 mit KOH

Mit H<sub>2</sub>O ultra pure auf 1 l auffüllen

### 2.1.9 Bakterienmedien

**LB:** Trypton 10 g/l

Hefeextrakt 5 g/l

NaCl<sub>2</sub> 10 g/l

pH 7,0 mit NaOH

### Agrobakterium-Minimal-Medium (AMM):

(Sambrook *et al.*, 1989)

#### AMM

20 x T-Puffer 50 ml

20 x T-Salze 50 ml

Glucose 5 g

mit H<sub>2</sub>O ultra pure auf 1 l auffüllen

Für ein Festmedium 12 g Bacteriological Agar/l Medium zusetzen.

Autoklavieren (15 min, 120 °C, 1,2 bar)

#### 20 x T-Puffer

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 210 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 90 g

mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

#### 20 x T-Salze

MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 4 g

CaCl<sub>2</sub> 0,2 g

FeSO<sub>4</sub> 0,1g

MnCl<sub>2</sub> 0,04 g

NH<sub>4</sub>Cl 20 g

mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

**YEB-Medium**(Sambrook *et al.*, 1989)

Beefextrakt 10g

Hefe-Extrakt 2g

Pepton 5g

Saccharose 5g

MgSO<sub>4</sub> 2 mM

Einstellen des pH-Wertes auf 7,0

Mit H<sub>2</sub>O ultra pure auf 1 l auffüllen**2.1.10 Antibiotika**

<b>Substanz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Stammlösung</b>
Ampicillin (Amp)	100 mg/l	100 mg/ml H <sub>2</sub> O
Cefotaxim (Cefo)	500 mg/l	250 mg/ml H <sub>2</sub> O
Gentamicin (Gm)	25 mg/l	25 mg/ml
Hygromycin B (Hyg)	40 mg/l	50 mg/ml Methanol
Kanamycin (Km)	50 mg/l	50 mg/ml H <sub>2</sub> O
Rifampicin (Rif)	50 mg/l	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Spectinomycin (Sm)	100 mg/ml	10 mg/ml

**2.1.11 Enzyme**

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
BP-Clonase Reaction Mix	Invitrogen
LR-Clonase Reaction Mix	Invitrogen
Proteinase K	Invitrogen
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
RNase freie DNase I	MBI Fermentas
RNase A (DNase frei)	Qiagen
Biotaq Polymerase	Biotaq, Biozym
iProof Polymerase	Bio Rad
Advantage Polymerase	Clontech

**2.1.12 Puffer und Lösungen**

**Luciferin-Substrat:** 1 mM D-Luciferin-Kalium Salz  
0,01% Triton-X 100

**Trizolpuffer:** 380 ml/l Phenol mit 0,1 M Citrat-Puffer gesättigt  
0,8 M Guanidiniumthiocyanat  
0,4 M Ammoniumthiocyanat  
33,4 ml/l Na-Acetat (3 M pH 5,2 mit Essigsäure)  
5% Glycerin

**Fällungspuffer:** 1,2 M NaCl  
0,8 M tri-Natrium-Citrat

<b>CTAB-Extraktionspuffer:</b>	2% (w/v) CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) 100 mM TrisHCl, pH 8,0 20 mM EDTA 1,4 M NaCl 2% $\beta$ -Mercaptoethanol (frisch zugeben)
<b>TAE (20 x):</b>	0,8 M Tris 2,3 % (v/v) Essigsäure 20 mM EDTA
<b>SSC (20 x):</b>	3 M NaCl 300 mM Na-Citrat

### 2.1.13 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller/Lieferant
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Dark-Box		Tischlerei der Universität
Digitalkamera	Coolpix	Nikon
Elektroporationsapparatur	Gene pulser® II	BioRad
Feinwaage, Waage	SPO51; 1207 MP2	Scaltec, Satorius
Gefriertruhe -80 °C	C54285	New Brunswick Scientific
Geldokumentationsanlage		MWG Biotech
Gelelektrophoresekammer		Werkstatt der Universität
Heizrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Heizschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
Inkubationsschränke		WTC binder; Memmert
Kapilarsequenzierer	ABI Prism 310	Perkin-Elmer
Klimakammer		York
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	DuPont
Luciferase-Imaging System	C4742-98 gekühlte CCD-Kamera	Hamamatsu Photonics
PCR-Gerät, MiniCycler™	PTC-150	MJ Research, USA
Pflanzenkulturschrank		Percivall
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
qRT-PCR Gerät	MyIQ	BioRad
PCR-Geräte	Mini-Cycler PTC-150	MJ Research
RNA-/DNA-Calculator	GeneQuant II	Pharmacia
Schwingmühle	MM301	Retsch
Spektrophotometer	Nano Vue	GE Healthcare
Standzentrifuge mit Ausschwingrotor	UJ3S	Christ
Sterilbank	Microflow	Nunc
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Christ
Tischzentrifuge, gekühlt	5403	Eppendorf
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vortex	L46	Labinco BV
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA
Zählkammer	Thoma	Brand

### 2.1.14 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1	Perkin-Elmer
Nucleo Spin® Extract II	Macherey-Nagel
Nucleo Spin® Plasmid	Macherey-Nagel
Plasmid Preparation Kit (Maxi)	Qiagen
RNeasy® Plant-Mini-Kit	Qiagen
Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit	Ambion
cDNAClear™ Kit	Ambion
MEGAClear Kit	Ambion

### 2.1.15 Verbrauchsmittel

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Alufolie	Roth
Elektroporationsküvetten	BioRad
Fliesspapier	Whatman
Glasmaterialien	Brand, Schott
Kunststoff-Einwegmaterial	Sarstedt; Eppendorf; Greiner; Roth
Parafilm N	American National Can™
Leukopor®	BSN-Medical
Papier-Filter	Macherey-Nagel
Sand	Vitakraft, Nr. 12262
Seramis	Masterfoods GmbH

### 2.1.16 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
D-Luciferin Kalium Salz	Synchem
Benomyl®	DuPont
BASTA®	AgrEvo
Confidor	Bayer
Agar bakteriologisch	Roth
Agarose	Biozym
Agarose SeaKem-LE (low melting)	Biozym
Select Agar	Invitrogen
Cefotaxim	Duchefa
Ampicillin	AGS
Bacto Pepton	Difco
Rifampicin	Duchefa
Murashige & Skoog Medium	Duchefa
Triton X-100	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth
Ethidumbromid 1%	Roth
EDTA	ApliChem
Phenol gesättigt mit 1M Citrat-Puffer	Sigma
Triton X-100	Roth

Nicht aufgeführte Standardchemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Fluka oder Sigma bezogen.

### 2.1.17 Software

Software	Hersteller
Wasabi 1.5	Hamamatsu Photonics (Herrsching am Ammersee)
Chromas 1.55	Technelysium Pty Ltd (Shannon Co. Clare, Irland)
Bildanalyseprogramm 1.0.4.6	Datinf GmbH (Tübingen, Deutschland)
Bio-Rad iQ5	BioRad (München, Deutschland)
Office XP	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
Acrobat Reader 8.1.2	Adobe ( <a href="http://www.adobe.com/de/">http://www.adobe.com/de/</a> )
Zotero	George Mason Universität (Virginia, USA)
Genevestigator	ETH Zürich (Zürich, Schweiz)
Vector-NTI Version10	Invitrogen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bakterienkultur

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte über Nacht auf LB-Fest- oder Flüssigmedium bei 37° C. *Agrobacterium tumefaciens* wurde auf LB- oder YEB-Medium bei 30° C über zwei Tage angezogen. Die Medien enthielten Antibiotika, um das Wachstum von Resistenzgen-tragenden Bakterien unter Selektionsdruck zu gewährleisten. Die Inkubation der Flüssigkulturen erfolgte im Inkubationsroller. Die Konservierung der Bakterienstämme erfolgte durch Lagerung der Kulturen in Glycerin-Stocks. Dafür wurden über Nacht gewachsene Bakterienkulturen auf eine Glycerin-Endkonzentration von 25% gebracht und schockgefroren. Die Langzeit-Lagerung erfolgte bei -80° C.

### 2.2.2 Pilzkultur

#### 2.2.2.1 Herstellung von *Verticillium longisporum*-Infektionslösung

Um bakterieller Kontamination vorzubeugen, wurden die Flüssigmedien stets mit 500 mg ml<sup>-1</sup> Cefotaxim versetzt. Zur Herstellung von Konidiosporen wurde zunächst *Verticillium*-Mycel in Flüssigkultur angezogen. Dazu wurden 150 ml PDB-Medium in einem 500 ml Schikanekolben mit 100 µl einer 1x10<sup>7</sup> Sp ml<sup>-1</sup> *Verticillium*-Gefrierstock Sporensuspension angeimpft und für zehn Tage im Dunkeln bei 21° C auf einem Schütteltisch kultiviert. In den zehn Tagen bilden sich im Medium weiße bis gelblich-weiße Mycelbällchen. Anschließend wurde das PDB-Medium mit einer sterilen Pipette vorsichtig abgezogen, so dass die Mycelbällchen in dem Schikanekolben verbleiben. Um die Bildung von Konidiosporen zu induzieren, wurden die Mycelbällchen weitere fünf Tage in 70-100 ml CPD-Medium geschüttelt. Das CPD-Medium trübt sich durch die Bildung der Konidiosporen weiß ein. Die entstandene Sporensuspension wurde mit Hilfe eines Trichters und eines Papierfilters (Macherey-Nagel) vom Mycel getrennt und die Sporen anschließend in einem 50ml Schraubdeckelröhrchen für 10 min bei 3000 rpm und 18° C abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen des Sporenpellets durch Resuspension in 50 ml H<sub>2</sub>O und erneuter Zentrifugation wurde das Sporenpellet in 5-40 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Die

Sporenkonzentration wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer ermittelt und für die Infektion mit sterilem Leitungswasser auf  $1 \times 10^6$  Sp ml<sup>-1</sup> eingestellt.

### 2.2.2.2 Herstellung von *Verticillium longisporum*-Konidiosporen-Gefrierstocks

Zur Herstellung der Dauerstocks wurden die Konidiosporen zunächst nach der Anleitung im Absatz 2.2.1 geerntet. Dabei müssen alle verwendeten Materialien (Kolben, Pipetten, Papierfilter, Trichter, Leitungswasser und 50% Glycerin) steril sein und die Sporenernte wurde an einer Sterilbank durchgeführt. Die geernteten Sporen wurden 1:1 mit 50% Glycerin gemischt (Glycerin-Endkonzentration von 25%) und in 1ml Aliquotts bei -20°C langsam eingefroren. Die Sporenkonzentration der Stocks sollte zwischen  $2 \times 10^8$  und  $2 \times 10^7$  Sp ml<sup>-1</sup> liegen. Zur längeren Verwahrung wurden die Sporen bei -80°C gelagert.

### 2.2.3 Kultivierung von *A. thaliana*

Die Pflanzen wurden auf Minimal-Erde angezogen. Vor der Aussaat wurde die Erde für 30 min bei 100°C autoklaviert. Die Samen wurden zwei Tage im Dunkeln bei 4°C stratifiziert, um eine gleichmäßigere und bessere Keimung zu erreichen. Die Kultivierung der Pflanzen fand in einer Klimakammer unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) oder in einem Percivall-Kulturschrank unter Kurztag-Bedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) statt. Dem Gießwasser wurden 0,05% Wuxal zugesetzt.

### 2.2.4 Infektionssysteme

#### 2.2.4.1 Steriles *in vitro*-Infektionssystem

Für die Anzucht von *A. thaliana* unter sterilen Bedingungen wurde ein in dieser Arbeit etabliertes *in vitro*-Kultursystem angewendet. Die Pflanzen werden in Petrischalen auf einem zuckerfreien 1/4-konzentrierten MS-Festmedium angezogen. Durch das Einschneiden eines Infektionskanals in das Festmedium können die in diesem System kultivierten *A. thaliana*-Pflanzen gezielt an den Wurzeln mit *V. longisporum*-Konidiosporen inokuliert werden (Abbildung 3).

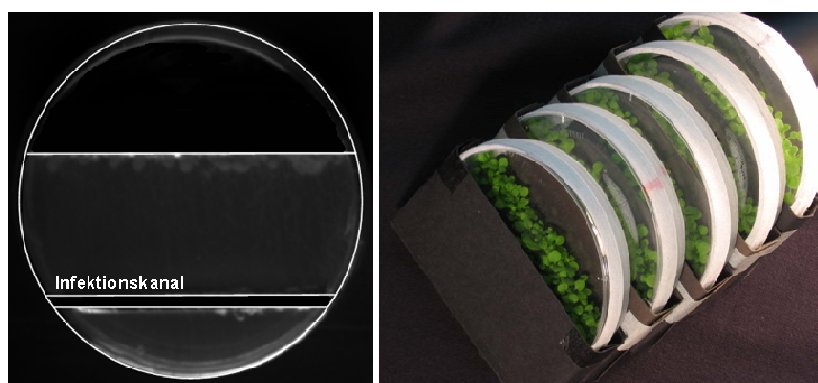


Abbildung 3: Das *in vitro*-Infektionssystem. Links: Schematische Darstellung einer Kulturplatte. Die von dem Medium freigeschnittenen Bereiche sind schwarz dargestellt. Rechts: Vertikal-Kultur von *A. thaliana* in dem Kultursystem. Die schwarzen Tonpapierhüllen schützen die Wurzeln vor UV-Strahlung.

#### Vorbereitung von ¼ MS-Agarplatten:

In Petrischalen (Durchmesser 92 mm) wurden je ca. 25 ml autoklaviertes, mit 4,8 g/l Selekt-Agar (Invitrogen) versetztes ¼-MS-Medium gegossen. Nach dem Abkühlen des Mediums wurde mit einem Skalpell durch einen glatten Schnitt jeweils 1/3 des Mediums abgeschnitten. Durch Umdrehen der Agarplatte und leichtes Schieben an dem ausgeschnittenen Agardrittel wurde dieser Teil gelöst und entfernt. Anschließend wurde auf der Hälfte des in der Platte verbliebenen Agars ein 0,5 cm breiter Streifen herausgeschnitten und ebenfalls entfernt (Abbildung 3).

#### Auslegen von *A. thaliana* Samen:

Oberflächensterilisierte *Arabidopsis*-Samen wurden auf die Kulturplatten pipettiert. Hierfür fand eine 2%ige *low melting*-Agarose Verwendung, welche mit ¼ MS-Flüssigmedium angesetzt und in 1,5 ml Vorrats-Aliquotts aufgeteilt wurde. Die Aliquotts wurden bei 4° C aufbewahrt. Vor dem Auslegen der Samen wurde die *low melting*-Agarose durch kurzes Aufheizen auf 95° geschmolzen und anschließend auf einem Heizschüttler auf 42° C abgekühlt. 750 µl wurden jeweils zu den oberflächensterilisierten Samen in die 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die Samen wurden mit der noch flüssigen Agarose gemischt und anschließend in 20 µl Portionen auf die vorbereiteten Agarplatten pipettiert (abgeschnittene Pipettenspitzen verwenden). Dabei wurde das Samen-Agarose-Gemisch gleichmäßig an die Grenze zwischen Medium und Petrischalenboden ausgebracht. Nach dem Abkühlen der *low melting*-Agarose sind die Samen in den Kulturplatten fixiert. Anschließend wurden die Platten mit Leukopor®-Klebeband verschlossen. Das Leukopor® erlaubt einen Gasaustausch und verhindert eine Kontamination der Platten. Die Platten wurden zur Stratifizierung der Samen 2-3 Tage bei 4° C im Dunkeln gelagert und anschließend mit einer leichten Schräglage für zwei Wochen in eine Langtag-Klimakammer gestellt. Um die Wurzeln vor UV-Strahlung zu schützen, wurde nach einer Woche der Wurzelbereich mit schwarzen Tonpapierhüllen verdeckt.

#### Infektion mit *V. longisporum*:

Für die Infektion wurden die Kulturplatten unter einer Sterilbank geöffnet. In den Infektionskanal wurden 500 µl Sporensuspension ( $4 \times 10^5$  Sp ml<sup>-1</sup>) pipettiert (Abbildung 3). Für das Ansetzen der Sporensuspension wurden Konidiosporen-Gefrierstocks entsprechend mit ¼ MS-Flüssigmedium auf die Infektionskonzentration verdünnt (Achtung: werden frische Sporen verwendet muss eine geringere Sporenkonzentration eingesetzt werden, da frische Sporen besser auskeimen.) Die uninfizierten Kontrollpflanzen wurden mit einer *mock*-Lösung aus 500 µl ¼ MS-Medium angeimpft, welches entsprechend der Infektionslösung mit Glycerin versetzt wurde. Anschließend wurden die Kulturplatten wieder mit Leukopor® verschlossen und zurück in die Klimakammer gestellt.

#### 2.2.4.2 Anzucht von *A. thaliana* unter Langtag-Regime

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* unter Langtag-Bedingungen (16h Licht / 8h Dunkelheit) erfolgte in einer York-Klimakammer mit einer Luftfeuchte von 60% und 22° C. Voraussetzung für ein späteres Auswaschen der Wurzeln für die Wurzelinokulation ist die Anzucht der Pflanzen in einem Schichtsystem aus einer 1 cm tiefen Lage Seramis®, überschichtet von einer



4 cm starken Schicht Sand/Erd-Gemisch (Volumenverhältnis 1/1) und einer abschließenden, wenige Millimeter dicken Schicht Sand. Um ein homogeneres Gemisch zu erhalten, wurde die Erde für das Sand/Erd-Gemisch mit einem Kompostsieb (Maschengröße 0,8 x 0,8 cm) gesiebt und anschließend in einem Autoklavierbeutel mit dem Sand gründlich vermengt. Das Schichtsystem wurde in einer 12,5 cm x 17 cm x 6 cm Pflanzenschale vorbereitet und dann mit Hilfe einer 50 ml-Einwegspritze vorsichtig mit 250 ml Düngerwasser von oben angegossen. Bei dem Angießen sollte die Sandoberfläche nicht aufgewühlt oder verdichtet werden. Das Seramis<sup>®</sup> dient zur Wasserspeicherung und der abschließende Sand sorgt für eine glatte Oberfläche, die das gleichmäßige Auslegen der Samen erleichtert. Auf die so vorbereitete Sandoberfläche wurden *Arabidopsis*-Samen in einem Abstand von je 1,5 cm ausgelegt. Die Schalen wurden mit Cellophan-Folie abgeschlossen und für drei Tage bei 4°C stratifiziert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte über 16 Tage, wobei nach fünf Tagen die Cellophan-Folie entfernt und durch eine Pflanzenschalen-Plastikhaube ersetzt wurde. Nach der Wurzelinokulation (Absatz 2.2.4.4) wurden die Pflanzen in Erdtöpfe gepflanzt und für drei Tage unter dem Schutz einer Pflanzenschalen-Plastikhaube gehalten. Nach ca. acht Tagen waren die ersten Infektionssymptome zu erkennen.

Der Verlauf der Infektion wird von der Anzucht der Pflanzen maßgeblich beeinflusst und ist im Besonderen von folgenden kritischen Punkten abhängig:

Die Wurzel- und Pflanzenentwicklung in dem Sand/Erd-System wird bei zu feuchter Erde deutlich negativ beeinflusst. Die angegebene Gießmenge, sowie die Handhabung der Abdeckung sollte daher strikt eingehalten werden.

Die Pflanzen entwickeln bei zu dichter Aussaat Stresssymptome, welche die Infektion beeinflussen.

Nach der Wurzelinokulation ist darauf zu achten, die Wurzeln nur locker mit Erde zu bedecken. Wird die Erde um die Wurzeln beim Eintopfen zu sehr verdichtet, entwickeln die Pflanzen Stresssymptome. Dies zeigt sich in dem unmittelbaren Schoßen der Pflanzen und der dunkelgrünen bis violetten Verfärbung der Blätter.

#### **2.2.4.3 Anzucht von *A. thaliana* unter Kurztag Regime**

Die Anzucht von *A. thaliana* erfolgte mit einigen Abänderungen entsprechend der Anzucht im Langtag. Im Kurztag wurde statt dem Sand/Erd-Gemisch reiner Sand für die Anzucht verwendet. Da das Wachstum unter Kurztag-Bedingungen deutlich langsamer verläuft, wurden die Pflanzen vor der Infektion vier Wochen kultiviert. Nach zehn Tagen wurde die Cellophan-Abdeckung durch eine Pflanzentablett-Plastikhaube ersetzt. Nach drei Wochen wurde einmal mit Hilfe einer Spritze vorsichtig von oben 50 ml Düngerwasser nachgegossen.

#### **2.2.4.4 Infektion von *A. thaliana* durch „Wurzel-Dip“-Inokulation**

Für die *Verticillium*-Infektion von *A. thaliana*, welche mit den in den vorigen Abschnitten beschriebenen Erd/Sand-Anzuchtverfahren kultiviert werden, wurde eine „Wurzel-Dip“-Inokulation angewendet. Dazu wurden die *A. thaliana*-Pflanzen vorsichtig ausgetopft und die Wurzeln gründlich in Leitungswasser ausgespült. Um die Pflanzen möglichst ohne

Verletzungen aus den Pflanzenschalen zu bekommen, wurde deren Inhalt auf einen Arbeitstisch gekippt. Die Pflanzen wurden dann mit den abgespülten Wurzeln in eine mit Wasser gefüllte Petrischale gehängt, so dass der Sprossenteil der Pflanzen nicht in Kontakt mit der Flüssigkeit stand. Waren alle für die Infektion vorgesehenen Linien in dieser Weise vorbereitet, wurde das Wasser mit einer Pipette abgezogen und anschließend pro Petrischale 25 ml Sporensuspension mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Sp ml<sup>-1</sup> hinzugefügt. Diese wurde nach 40 min, in denen die Wurzeln mit der Sporensuspension inkubiert wurden, mit einer Pipette abgezogen. Die *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in Erdtöpfe eingepflanzt und in eine Langtag- bzw. Kurztag-Kulturkammern gestellt. Die *mock*-Kontrollen wurden entsprechend behandelt, nur dass sie mit Leitungswasser, statt mit Sporensuspension inkubiert wurden. Die ersten drei Tage nach Infektion wurden die Pflanzen unter Plastikhauben kultiviert, welche am vierten Tag entfernt wurden.

### 2.2.5 Stängelsterilisations-Assay

Durch den Stängelsterilisations-Assay lässt sich die systemische Kolonisation von *Arabidopsis* durch *Verticillium* untersuchen. 30 Tage nach der Infektion von Langtag-kultivierten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden Stängelsegmente oberflächensterilisiert und auf Pilzmedium ausplattiert. Dazu wurden 1,5-2 cm der Basis des primären Infloreszenzstängels präpariert und fünf Minuten in 70%igem Ethanol in einem 2 ml-Reaktionsgefäß inkubiert. Anschließend wurde das Stängelsegment für 5 min in 2%ige Natriumhypochlorid-Lösung (+0,02% Triton X-100) inkubiert, danach in H<sub>2</sub>O gewaschen und auf PDB-Medium (+Cefotaxim) ausplattiert. Schließlich wurde die Petrischale mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur im Dunkeln mehrere Tage inkubiert. Nach 3-5 Tagen wächst bei Stängelsegmenten von Pflanzen, welche systemisch von *Verticillium* befallen sind, Pilzmycel aus.

### 2.2.6 Blattflächenanalyse

Mit einer Digitalkamera wurden Bilder von *Arabidopsis*-Blattrosetten aufgenommen. Die projizierte Blattfläche wurde mit einem speziell für diesen Zweck entwickelten Bildanalyseprogramm (Datinf GmbH, Tübingen) ausgewertet. Der Durchmesser der Kulturtöpfe wurde als interner Standard für die Normalisierung der Blattfläche verwendet.

### 2.2.7 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis*-Samen

*Arabidopsis*-Samen wurden durch Chlorbegasung oberflächensterilisiert. Dazu wurden jeweils ca. 200-300 Samen in 2ml-Reaktionsgefäße gefüllt und diese in einen Kunststoff-Ständer gestellt. Die Sterilisation der Samen erfolgte in einem Exsikkator, in den ein Weckglas mit 100 ml 14%iger Natriumhypochlorid-Lösung gefüllt wurde. Durch Zugabe von 5 ml HCl wurde die Entwicklung von Chlorgas ausgelöst. Nach der Zugabe der Salzsäure wurde der Deckel des Exsikkators schnell geschlossen und ein leichtes Vakuum angelegt. Nach fünf Stunden Inkubation der Samen unter Chlorgasatmosphäre wurde der Exsikkator unter einer Sterilbank belüftet und der Ständer mit den Samen zum Abdampfen des Chlorgases für 20 min unter der Sterilbank belassen. Oberflächensterilisierte Samen verlieren nach ca. einer Woche ihre Keimfähigkeit.

### 2.2.8 Luciferase-Imaging

*Arabidopsis*-Pflanzen wurden mit Hilfe einer Zerstäuberflasche mit 1 mM Luciferin-Lösung besprüht (1 mM Luciferin, 0,02% Triton-X 100, demineralisiertes H<sub>2</sub>O). Die Pflanzen wurden anschließend in die „dark box“ des Luciferase-Imaging-Systems platziert. Nach der Fokussierung des Bildes im *live-Image*-Modus des Kamerasystems wurde eine Schwarzweiß-Aufnahme erstellt und die die „dark box“ anschließend verschlossen. Vor dem Aufnahmestart des Lumineszenz-Bildes mussten die Pflanzen acht Minuten zur Abstrahlung der Autophosphoreszenz der photosynthetisch aktiven Pflanzenteile in der Dunkelkammer verbleiben. Danach wurden mit der *high gain*-Einstellung der Kamera je nach Stärke der Luciferase-Expression Bilder mit einer Belichtungszeit von 5-60 Minuten erstellt. Da es bei langen Belichtungszeiten zu Bildstörungen durch Umgebungsstrahlung kommt, wurden die Bilder mit der *spot noise reduction*-Einstellung gemacht. Mit der Kamerasoftware Wasabi<sup>®</sup> konnten die Schwarzweiß- und Lumineszenz-Aufnahmen anschließend durch Bildüberlagerung vereint werden.

### 2.2.9 Promoter-Trap-Screening

Beim Durchmustern der Luciferase-Promoter-Trap-Kollektion wurde drei Tage nach *V143*-Infektion ein Luciferase-Imaging mit Promoter-Trap-Linien, welche in dem *in vitro*-Infektionssystem kultiviert wurden, durchgeführt. Pro Petrischale wurden 30-60 Pflanzen kultiviert. Für das Promoter-Trap-Screening wurde eine Belichtungszeit von 20 Minuten angewendet. Im primären Screening wurden durch Analyse des Überlagerungsbildes von Lumineszenz- und Schwarzweißaufnahme Pflanzen mit Luciferase-Aktivität lokalisiert und diese, ohne die Wurzeln zu verletzen, aus der Kulturplatte gelöst. Um den an den Wurzeln anheftenden Pilz abzutöten, wurden die Wurzeln kurz in eine fungizide Benomyl<sup>®</sup>-Lösung (500µg/ml) gehängt und anschließend in Erdtöpfe eingepflanzt. Die ersten 24 h nach dem Umsetzen wurden die Pflanzen in verschlossenen Plastikcontainern (Duchefa) und danach für weitere fünf Tage in Pflanzentabletts mit Plastikhaube kultiviert. Anschließend wurde die Plastikhaube entfernt und die Pflanzen bis zur Abreife im Langtag kultiviert.

Im Sekundär-Screening wurden die im Primär-Screening identifizierten Luciferase-exprimierenden Linien jeweils parallel auf zwei Kulturplatten des *in vitro*-Infektionssystems angezogen. Es wurde erneut ein Luciferase-Imaging drei Tage nach *V143*-Infektion durchgeführt, wobei eine der zwei Kulturplatten als Kontrollplatte *mock*-inokuliert wurde. Durch den Vergleich der Lumineszenz von Kontrollplatte und *V143*-inokulierter Platte konnte zwischen konstitutiver und *Verticillium*-induzierter Reporteraktivität unterschieden werden.

### 2.2.10 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana*

Ein klassischer Weg zur Transformation von Pflanzen ist der *Agrobakterien*-vermittelte Gentransfer. *Agrobacterium tumefaciens* hat die Fähigkeit, einen durch zwei Border-Sequenzen definierten Abschnitt des so genannten Ti-Plasmids in eine Pflanzenzelle zu transportieren und dort an einer zufälligen Stelle eines Pflanzen-Chromosoms einzufügen (Herrera-Estrella et al., 1992). Dieser DNA-Abschnitt wird T-DNA genannt. Das Ti-Plasmid wurde speziell für die gezielte Integration von Genen in das pflanzliche Genom modifiziert. Die zu übertragenden

DNA-Sequenzen lassen sich mit molekularbiologischen Methoden zwischen den T-DNA Border-Sequenzen inserieren. Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde die „Floral-dip“-Methode angewendet (Clough und Bent, 1998). Pflanzen die gerade zu blühen begonnen haben, werden in Medium mit *Agrobakterien* getaucht. Sich entwickelnde Eizellen sind das bevorzugte Ziel von Transformationen. Aus diesen Zellen entstehen hemizygote Samen. Für die Transformation werden pro Topf (6 cm) bis zu zehn Samen ausgesät. Gesunde und kräftige Pflanzen erhöhen die Transformationsrate. Durch das Abschneiden der ersten Blütenstände lässt sich die Bildung vieler sekundärer Blütenstände anregen, wodurch die Ausbeute an transgenen Samen pro Topf erhöht wird.

Es wird eine 25 ml *Agrobakterien*-Vorkultur durch Zugabe von Rifampicin und Gentamicin sowie entsprechend des Resistenzmarkers des binären Vektors eines weiteren Antibiotikums über Nacht bei 28° C angezogen. Diese Vorkultur wird vollständig in eine 400 ml Hauptkultur überführt und diese erneut über Nacht kultiviert. Die Kultur wird durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm in einer Sorval-Zentrifuge (Rotor SLA-3000) sedimentiert und das Pellet in der Infektionslösung (5% Saccharose, 0,02% Silvet-L77) resuspendiert. Diese Suspension wird auf eine OD<sub>600</sub> von 0,8 eingestellt. Für die Transformation werden junge *Arabidopsis*-Blütenstände für zehn Sekunden in die *Agrobakterien*-Suspension getaucht und, um eine gute Benetzung zu erreichen, leicht geschwenkt. Die Pflanzen erhalten für einen Tag eine transparente Haube und werden bis zum Abreifen der Samen unter Langtagbedingungen kultiviert. In dieser Arbeit wurde der Phosphinothricin-Resistenz-Marker (BASTA<sup>®</sup>) für die Selektion von Transformanden verwendet.

### 2.2.11 Selektion auf BASTA<sup>®</sup>-Resistenz

Die Samen werden zunächst auf Erde ausgesät und kultiviert. Wenn die Pflanzen 2-4 vegetative Blätter gebildet haben werden sie mit 1 mM BASTA<sup>®</sup> besprüht. BASTA<sup>®</sup> bzw. Phosphinothricin (auch Glufosinat oder L-Homoanalin-4-yl-(methyl)-phosphinsäure) wirkt als Struktur analogon des L-Glutamat und inhibiert dadurch die Glutaminsynthetase. Die Pflanzen können bei Behandlung mit BASTA<sup>®</sup> Glutamat nicht mehr in Glutamin umwandeln. Dadurch häuft sich Ammonium zu einer letalen Konzentration in der Pflanze an und führt zusammen mit dem Glutaminmangel zum raschen Absterben der behandelten Pflanzen. Pflanzen, die als Resistenzmarker das bar-Gen tragen, sind unempfindlich gegenüber Phosphinothricin (White et al., 1990). Die Behandlung mit BASTA<sup>®</sup> wird alle drei Tage wiederholt. Nach ein bis zwei Wochen werden sensitive Pflanzen gelb und sterben ab, während sich transformierte Pflanzen normal entwickeln.

## 2.2.12 Molekulargenetische Methoden

### 2.2.12.1 Plasmid-Isolation

Zur Isolierung kleiner Mengen reiner Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Macherey-Nagel NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kit verwendet. Zur Gewinnung von Plasmid-DNA in größeren Mengen wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit verwendet. Die Isolierung erfolgte jeweils nach den Vorschriften der Hersteller.

### 2.2.12.2 Schnell-Lyse von *E.coli* für eine anschließende PCR

Einzelne Bakterienkolonien wurden in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert, für fünf Minuten bei 95° C erhitzt und anschließend für eine PCR eingesetzt.

### 2.2.12.3 Extraktion genomischer Pflanzen-DNA

Um genomische DNA für PCR-Anwendungen aus *Arabidopsis* zu isolieren, wurde die DNA-Extraktion unter Verwendung eines CTAB-Extraktionspuffers (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) durchgeführt. 100 mg Pflanzenmaterial werden in 2 ml Reaktionsgefäßen unter Stickstoffkühlung mit Hilfe einer Schwingmühle (Retsch) gemahlen. Das Pflanzenpulver wurde mit 200 µl CTAB-Extraktionspuffer versetzt, gut gemischt und für 15 min bei 65° C inkubiert. Danach wurden 700 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und die Lösung gut durchmischt. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 rpm für fünf Minuten wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit der gleichen Menge kaltem Isopropanol versetzt und gemischt. Die genomische DNA wurde durch zwei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Es folgte für zehn Minuten eine Zentrifugation bei 10.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Es wurde erneut für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 50-100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.2.12.4 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in wässriger Lösung erfolgte photometrisch am GeneQuant II (Pharmacia) und dem NanoVue<sup>®</sup>-Spektrophotometer (GE Healthcare). Dabei wird die Absorption von Licht durch wässrige Lösungen von RNA und DNA bei 260 nm gemessen.

### 2.2.12.5 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (McDonell *et al.*, 1977; Southern, 1979) werden DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. DNA ist aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen. Im elektrischen Feld wandert sie somit zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umso größer, je kleiner die DNA-Moleküle sind. Als Gelmatrix dient Agarose. Der Trennbereich ist abhängig von der Agarosekonzentration, da sie die Porengröße beeinflusst. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA für analytische und präparative Zwecke wurde in dieser Arbeit in horizontalen Agarosegelen (10 cm x 7 cm x

0,3 cm, 16 Taschen) mit 1x TAE als Laufpuffer durchgeführt. Für DNA-Moleküle im Größenbereich von 300 bp bis 10 kb wurden Gele mit einer Konzentration von 1% (w/v) Agarose in 1x TAE benutzt. Als DNA-Probenpuffer wurde 67% (w/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 0,42% (w/v) Bromphenolblau und 0,42% (w/v) Xylencyanol verwendet. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld bei 120 V für 30-60 Minuten. Um die DNA im Anschluss an die Auftrennung sichtbar zu machen, wurde das Gel zehn Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/l EtBr) inkubiert, anschließend der Gelhintergrund kurz in Wasser entfärbt und der Bandenverlauf auf dem UV-Transilluminator (302 nm) mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage dokumentiert.

#### **2.2.12.6 Restriktionsspaltung von DNA**

Restriktionsendonukleasen vom Typ II spalten doppelsträngige DNA innerhalb spezifischer Erkennungssequenzen. Je nach Enzym entstehen dabei glatte („blunt“) oder überstehende („sticky“) Enden. Die für die verschiedenen Restriktionsenzyme optimalen Reaktionsbedingungen wurden mit dem Puffersystem der Firma MBI Fermentas eingestellt. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in „Units“ U angegeben, wobei mit 1 U die Enzymmenge definiert ist, die 1 µg λ-DNA (48,5 kb) innerhalb von einer Stunde unter optimalen Bedingungen vollständig spaltet. Die DNA wurde in der Regel in einer Endkonzentration von 0,1 µg/µl mit 2 U Enzym/µg DNA für 2-10 Stunden inkubiert.

#### **2.2.12.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der Machery-Nagel NucleoExtract® Kit verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde mit 30-40 µl Elutions-Puffer von der Säule eluiert.

#### **2.2.12.8 Ligation von DNA-Fragmenten**

Das Enzym T4-DNA-Ligase ist in der Lage, DNA-Fragmente mit überstehenden komplementären bzw. glatten Enden miteinander kovalent zu verknüpfen, sofern eines der beiden Fragmente eine endständige 5'-Phosphatgruppe trägt. Als Cosubstrat muss ATP in geeigneter Konzentration im Puffermedium vorliegen. Das zu inserierende DNA-Fragment wurde im zehnfachen molaren Überschuss zu der gespaltenen Vektor-DNA (ca. 50 fmol) zugegeben. Die Ligation erfolgte im Ligationspuffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, pH 7, 8) mit drei Units T4-DNA-Ligase bei RT über Nacht.

#### **2.2.12.9 Polymerase Kettenreaktion**

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987) können unter Verwendung zweier gegenläufiger Primer spezifische Sequenzen eines DNA-Templates amplifiziert werden. Die als Matrize dienende Template-DNA wird zunächst denaturiert. Nach Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase komplementäre DNA-Stränge an der Matrizen-DNA. Dieser Zyklus aus Denaturieren, Primeranlagerung und DNA-Synthese wird mehrfach wiederholt und führt

exponentiell zu einer selektiven Anreicherung der DNA-Sequenz. Die Länge und die Temperatur der einzelnen Schritte eines Zyklus, sowie die Anzahl von Zyklen wurde durch den Schmelzpunkt der Primer und die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt. Die Zyklen starteten nach zweiminütiger Denaturierung bei 94° C. Die anschließende Denaturierung erfolgte in der Regel für 30 sec bei 92° C, das Primer-Annealing für 30 sec bei der für die Primer charakteristischen Temperatur und die Elongation für eine Minute pro Kilobase bei 72° C. Die Schmelztemperatur  $T_m$  eines Primers berechnet sich nach einer empirischen Formel, die sowohl den relativen molaren GC-Gehalt (%GC), als auch die Länge der Oligonukleotide (n) berücksichtigt. Es gibt verschiedene Formeln zur Berechnung der Schmelztemperatur. In dieser Arbeit wurde die Schmelztemperatur mit dem Vector-NTI Programm berechnet.

#### 2.2.12.10 Long-range-inverse PCR

Die Long-Range-inverse-PCR (LRi-PCR) wurde verwendet, um die Insertionsorte von T-DNA-Sequenzen in *Arabidopsis*-Linien der Luciferase-Promoter-Trap-Kollektion zu identifizieren. Dazu wurde ein bereits etabliertes Protokoll zur Identifizierung von T-DNA-Insertionsorten verwendet (Alvarado et al. 2004; Mathur et al. 1998). Genomische DNA wurde mit EcoRI über Nacht verdaut und anschließend durch Ligation zirkularisiert. Aus dem Ligationsansatz wurde mit dem NucleoSpin Plasmid Kit die zirkuläre DNA extrahiert. Mit dieser DNA wurde eine PCR angesetzt:

PCR-Ansatz:	Programm:
- 4 µl HF-I-Proof-Puffer (5x)	1. 30 sec 98°C
- 0,4 µl dNTPs (200mM)	2. 10 sec 98°C
- 1 µl Primer1 (PB)	3. 20 sec 56°C
- 1 µl Primer2 (LB41)	4. 150 sec 72°C
- 0,2 µl I-Proof-Polymerase	5. 32x ab 2.
- 10 µl zirkuläre DNA	6. 8 min 72°C
- 3,4 µl H <sub>2</sub> O	7. 4°C

Die PCR-Produkte wurden auf einem Gel aufgetrennt und die DNA-Fragmente durch Gelextraktion isoliert. Durch Anwendung der Primer PB und LB41 wurden diese Fragmente anschließend sequenziert. Durch die eingesetzten Primer erhält man die an die Left-Border-Sequenz der T-DNA angrenzende genomische DNA-Sequenz. Mittels Gen-Blast-Analyse wurden nun die entsprechenden Sequenzabschnitte im *Arabidopsis*-Genom identifiziert.

#### 2.2.12.11 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Methode, mit der man die relative Expression einer mRNA im Verhältnis zu einer unter den entsprechenden Versuchsbedingungen konstant exprimierten Referenz-mRNA bestimmen kann. Die angewendete „two step“-qRT-PCR setzt sich aus zwei nacheinander durchgeführten Schritten zusammen. Im ersten Schritt wird die aus Pflanzenmaterial präparierte mRNA als Template für eine Reverse-Transkription eingesetzt und in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend wird eine PCR mit

genspezifischen Primern durchgeführt, bei welcher die amplifizierte DNA-Menge über ein fluorimetrisches Verfahren detektiert wird. Bei dem verwendeten *LightCycler*<sup>TM</sup> von BIO-RAD wird der PCR-Reaktion das Fluorofor *Cyber Green* zugefügt. Dieses bindet sequenzunabhängig an die kleine Furche doppelsträngiger DNA, wodurch sich die amplifizierte DNA-Menge durch den Anstieg der Fluoreszenz messen lässt. Da sich die amplifizierte DNA-Menge proportional zu der eingesetzten cDNA-Konzentration verhält, kann die relativ zu dem Referenztemplate vorliegende cDNA-Konzentration eines Gens berechnet werden.

### **cDNA-Synthese:**

Für die cDNA-Synthese mittels reverser Transkription wurde 1 µg RNA Template eingesetzt. Um Spuren genomischer DNA aus den Proben zu entfernen, wurde vor der eigentlichen reversen Transkription ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 1 µg RNA, 1 µl DNaseI, 1,03 µl 10x DNaseI-Puffer mit DEPC-Wasser auf 10,3 µl aufgefüllt und dieser Reaktionsansatz für 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die DNaseI durch Zugabe von 1 µl EDTA und 10 min Behandlung bei 65° C deaktiviert. Für die cDNA-Synthese wurde ein Mix aus degenerierten Random-Nonamere Primern und Oligo-dT Primern verwendet. Die 11,3 µl Reaktionsansatz aus dem DNase-Verdau wurden mit 0,2 µl Oligo-dT (100 mM) und 1 µl Random Nonamere (200 mM) Primern gemischt und für 10 min auf 70° C erhitzt. Anschließend wurden auf Eis 2 µl dNTPs (10 mM), 4 µl RevertAid<sup>TM</sup> H<sup>-</sup> M-MuLV Reverse Transcriptase-Puffer (Invitrogen) und 0,5 µl RNase-Inhibitor zugegeben und dieser Mix 10 min bei 37° C inkubiert. Für die reverse Transkription wurde 1 µl RevertAid<sup>TM</sup> H<sup>-</sup> Reverse-Transkriptase (Invitrogen) zugegeben und die Reaktion in einem PCR-Cycler für 70 min bei 42° C durchgeführt. Durch 10 min Inkubation bei 70° C wurde die Reaktion gestoppt und die cDNA anschließend bei 4° C gelagert. Für die Verwendung in der semiquantitativen qRT-PCR wurde die cDNA 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt.

### **qRT-PCR:**

Für die qRT-PCR wurden die Referenzgene Ubiquitin 5 (UBQ5, At3g62250) oder die Protein Phosphatase 2A Untereinheit A3 (PP2A, At1g13320) eingesetzt (Czechowski et al. 2005). Der PCR-Reaktionsmix setzte sich folgendermaßen zusammen: 17,2 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 10x Biotaq-Puffer (Bioline), 1 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25 µl dNTP (10 mM), 2,5 µl Primer-Mix (0,4 mM), 1 µl Fluorescein (1 µM), 0,25 µl SybrGreen (10x), 0,05 µl BIOTaq Polymerase (5 U/µl). Nach 3 min primärer Denaturierung wurden 40 PCR-Zyklen nach folgendem Programm durchgeführt: 20 sec 95° C Denaturierung; 20 sec 55° C Annealing; 40 sec 72° C Elongation (während der Annealing- und der Elongationsphase jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen). Anschließend erfolgte eine terminale Elongation für 4 min, nach der das PCR-Produkt für 1 min bei 95° C denaturiert wurde. Für 1 min erfolgte dann eine Renaturierung mit anschließender Schmelzkurven-Bestimmung, bei der die Temperatur in 0,5° C-Schritten bis auf 95° C erhöht wurde. Die relative Expressionsstärke der Transkripte wurde mit der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) bestimmt. Dazu wurde zunächst die zu dem Referenzgen relative Expressionsstärke  $\Delta C_T$  bestimmt und diese dann auf eine Referenzbedingung (hier die  $\Delta C_T$ -Werte der mock induzierten WT-Pflanzen) normiert.



### 2.2.12.12 Gateway-Klonierung

Bei Gateway<sup>TM</sup>-Klonierungen werden DNA-Segmente über ortsspezifische Rekombination zwischen verschiedenen Plasmiden transferiert. Das System basiert auf der ortsspezifischen Integration des Phagen *Lambda* in das Genom von *E. coli*. Um für die Rekombination verfügbar zu sein, müssen Erkennungssequenzen an das gewünschte DNA-Segment angefügt werden. Dies geschieht, indem man das gewünschte DNA-Stück mit Primern amplifiziert, die an den 5'Enden die Erkennungssequenzen enthalten. Bei Gateway-Klonierungen kommen zwei Reaktionen zur Anwendung. Das DNA-Segment kann von dem PCR-Produkt aus in der BP-Reaktion in einen Entry-Vektor rekombiniert werden. Von dort aus kann es in einer LR-Reaktion in verschiedene Ziel-Vektoren (Destination-Vektor) transferiert werden. Durch eine PCR wird ein DNA-Segment mit den Gateway-attB-Erkennungssequenzen versehen. Die speziellen Primer, durch welche während der PCR die attB-Sequenzen angefügt werden, wurden nach dem Gateway-Handbuch erstellt. Nach der PCR erfolgte eine Aufreinigung der PCR Produkte mit dem Macherey-Nagel NucleoSpin-Extract-Kit.

#### **BP-Reaktion:**

Die BP-Reaktion dient dazu, den DNA-Abschnitt des BP-PCR Produktes zwischen den attB-Sites in einen Donor-Vektor mit attP-Sites zu transferieren. Dabei entsteht ein Entry -Vektor mit attL-Sites.

- 2,5-5 µl attB-PCR-Produkt in ein PCR-Reaktionsgefäß geben
- 150 ng Eingangs-Vektor zugeben
- 2 µl 5x BP Clonase<sup>TM</sup> Reaktions-Mix zugeben
- mit TE-Puffer auf 8 µl auffüllen
- kurz vortexen und ü.N. bei 25° C inkubieren
- 1 µl *Proteinase K* zugeben und 10 min bei 37° C inkubieren
- 5 µl des Ansatzes werden in 100 µl *DB3.1 E. coli* transformiert

#### **LR-Reaktion:**

Die LR-Reaktion dient dazu, die DNA zwischen den attL-Sites des Entry-Vektors in einen Destination-Vektor mit attR-Sites zu transferieren. Sie läuft am effizientesten ab, wenn beide Vektoren linearisiert werden.

- 100-200 ng Eingangs-Vektor in ein PCR-Reaktionsgefäß geben
- 200 ng Ziel-Vektor zugeben
- 2 µl 5x LR- Clonase<sup>TM</sup> Reaktions Mix zugeben
- mit TE-Puffer auf 8 µl auffüllen
- 2 µl LR- Clonase<sup>TM</sup> Enzym Mix zugeben
- kurz vortexen und ü.N. bei 25° C inkubieren
- 1 µl *Proteinase K* zugeben und 10 min bei 37° C inkubieren
- 5 µl dieses Ansatzes werden in 100 µl *DH5α E. coli* transformiert

### 2.2.12.13 Klonierung von pE-35s-HA-GW

Für die durch den 35S-Promoter getriebene Überexpression von HA-markierten Transkriptionsfaktoren wurde der pE-35s-HA-GW-Vektor kloniert. Dieser Vektor ist ein Gateway-kompatibler Destination-Vektor mit att-R Sites. Ein HA-Tag wird C-terminal an das Protein angehängt. Für die Klonierung des Vektors wurde aus dem Alligator2-Vektor (Bensmihen et al. 2004) durch PCR unter Verwendung der Advantage-Taq-Polymerase (Clontech) und der Primer XhoI-HA-GW-fw und GWkassetteREV die Alligator2-GW-Kassette amplifiziert. Durch den XhoI-HA-GW-fw Primer wurde an das 5'-Ende die Sequenz 5'ACTCGAGAACA3' angehängt. Dadurch wurden vor das Start-ATG des HA-Tags eine XhoI-Schnittstelle (CTCGAG) und die Kozak-Sequenz (AACA) angefügt. Das 1885 bp große PCR-Fragment wurde durch eine XhoI/NcoI-Restriktionsspaltung verdaut und das 922 bp große, den HA-Tag tragende Fragment geextrahiert. Dieses Fragment wurde in das mit XhoI/NcoI verdaute und geextrahierte Vektorfragment (6246 bp) des pE-Vektors (basiert auf dem pSPYCE-Vektor (Walter et al. 2004)) einkloniert. Der pE-35s-HA-GW-Vektor wurde anschließend durch Sequenzierung kontrolliert. Da das Plasmid eine Ampicillin-Resistenz trägt, wurde nach der Transformation des Expressions-Vektors in den *Agrobakterien*-Stamm GV3101-pMP90-RK Carbenicillin für die Selektion transformierter *Agrobakterien* eingesetzt. In Konzentrationsreihen wurde die beste Selektion auf AMM-Platten bei 40µg/ml Carbenicillin, 15µg/ml Gentamicin, 50µg/ml Kanamicin und 50µg/ml Rifampicin erreicht.

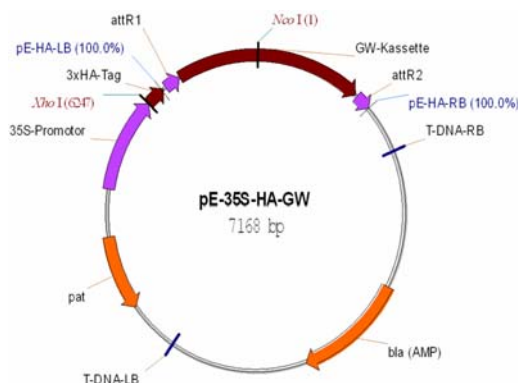


Abbildung 4: Vektorkarte des pE-35S-HA-GW-Vektors. Die Bindestellen der zwei Primer pE-HA-LB und pE-HA-RB sind blau markiert. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme XhoI und NcoI sind rot markiert. bla (AMP): Beta-Lactamase-Gen; T-DNA LB: T-DNA Left-Border; T-DNA RB: T-DNA Right-Border; attR: Gateway Rekombinations-Sequenzen

### 2.2.12.14 Generierung der *At*TORF-Ex-Kollektion

Die „*Arabidopsis thaliana*-Transkriptionsfaktor-ORF-Überexpressions“-(*At*TORF-Ex)-Kollektion wurde nach der von Weiste et al. (2007) beschriebenen Methode durchgeführt.

### 2.2.12.15 Identifizierung von *At*TORF-Ex-Linien

Um die Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, welche in einzelnen Linien der *At*TORF-Ex-Kollektion überexprimiert sind, wurde der entsprechende Transkriptionsfaktor-ORF unter Verwendung der T-DNA spezifischen Primer pE-HA-RB und pE-HA-LB mittels einer PCR mit

genomischer DNA der Überexpressionslinie als Template amplifiziert. Anschließend wurde das amplifizierte Transkriptionsfaktor-ORF-Fragment geextrahiert und sequenziert. Durch Blast-Analyse der Sequenz konnte der Transkriptionsfaktor identifiziert werden.

#### **2.2.12.16 Klonieren von Luciferase-Reporterlinien**

Um Luciferase-Reporterlinien zu erstellen, müssen die Promotorbereiche der Gene durch PCR-Amplifikation aus genomischer DNA isoliert werden. Es wurden Primer konstruiert, welche eine ca. 2 kb große 5'-Promotorsequenz der Gene amplifiziert und gleichzeitig attB-Gatewaysequenzen anhängt. Außerdem wurde an dem 3'-Ende des Promotorbereiches noch ein Start-ATG zwischen Promotorsequenz und Gateway-attB-Sequenz eingefügt. Dadurch befindet sich in dem Reporterkonstrukt kein attB-Sequenzstück zwischen Promotor und Luciferase-Start-ATG. Mit diesen Primern wurde unter Verwendung der Advantage-Taq Polymerase (Clontech) der Promotorbereich aus genomischer *Arabidopsis*-DNA (Col-0) amplifiziert und das Fragment anschließend geextrahiert. In einer Gateway-BP-Reaktion wurden diese Promotorfragmente in den pDONR201 Entry-Vektor übertragen. In einer Gateway LR-Reaktion mit den Promotor-Entry-Vektoren und dem Destination-Vektor pBGWL7 (Karimi et al. 2005) wurden Luciferase-Reporter-Vektoren erhalten. Diese wurden durch Sequenzierung überprüft. Anschließend erfolgte mit diesen Vektoren eine *Agrobakterien*-vermittelte Pflanzentransformation.

#### **2.2.12.17 Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung erfolgt mit Hilfe des BigDye™ Terminator-Cycle Sequencing Ready Reaction 3.1 Kits von Perkin Elmer. Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.*, (1977). Hier befindet sich in einem Ansatz zur Amplifikation der DNA nur ein Primer, wodurch die Elongation linear abläuft. Neben den vier Desoxynukleotiden befinden sich auch vier mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide zur Termination der Polymerisation in dem Ansatz. Die durch die Amplifikation entstehenden, unterschiedlich großen und markierten Fragmente können nun mit Hilfe des Analysegerätes (Kapillarsequencer ABI Prism 310 von Applied Biosystems) über eine Kapillarmatrix aufgetrennt und detektiert werden.

Für die Reaktion der linearen PCR wurden 170 fmol Plasmid-DNA, 5 pmol Primer und 2 µl RR-Mix 3.1 in einem Endvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Reaktion im Thermocycler besteht aus 25 Zyklen mit 10 s Denaturierung bei 95 °C, 5 s Annealing bei 50° C und 4 min bei 60° C Elongation. Die Fragmente wurden durch eine Ethanol-Fällung von den nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt und in TSR (Template Suppression Reagent, Perkin Elmer) aufgenommen. Nach dem Denaturieren wurden sie in das Analysegerät appliziert. Die gewonnenen Rohdaten wurden mit Hilfe des Chromas-Programms ausgewertet.

#### **2.2.12.18 Herstellung kompetenter *Escherichia coli***

Für die Herstellung kompetenter Zellen nach einer modifizierten Methode von Inoue *et al.* (1990) wurden Bakterien der *E. coli*-Stämme *DH5α* oder *DB3.1* verwendet. Hierfür wurden 0,8 ml einer Übernachtskultur in 40 ml LB-Medium überimpft. Die Anzucht der Kultur erfolgte bis zum Erreichen einer OD600 von 0,5. Jeweils 10 ml der Kultur wurden in Greiner-Röhrchen

überführt und abzentrifugiert (5 min, 6000 x g, 4° C). Das Pellet wurde in 5 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> (4° C) resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (5 min, 6000x g, 4° C). Die Zellen wurden in 2 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> (4° C) und 0,4 ml 87% Glycerin aufgenommen und nach aliquotieren (je 200 µl) in Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80° C

#### **2.2.12.19 Transformation von *Escherichia coli***

Kompetente *E. coli*-Zellen sind in der Lage, DNA aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen. Mit Hilfe der nachfolgenden Methode (Hanahan, 1983) wurden *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA transformiert. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, dann erfolgte die Zugabe der Plasmid-DNA und Inkubation für 10 min auf Eis (Anheftung der DNA an die Zellen). Durch einen Hitzeschock der Zellen für 2 min bei 42° C erfolgte die Aufnahme der DNA. Eine 30 min (Amp<sup>R</sup>) bis 60 min (alle anderen Selektionsmarker) Regeneration der Zellen schloß sich nach Zugabe von 0,8 ml LB-Medium bei 37° C an. Danach wurde der Transformationsansatz auf LB-Selektionsmedium ausplattiert

#### **2.2.12.20 Herstellung kompetenter *Agrobakterien***

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden *Agrobakterien* des Stammes GV3101 verwendet. 5 ml einer *Agrobakterien*-Flüssigkultur wurden abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm, RT) und dreimal durch Resuspendieren und erneutes Abzentrifugieren in sterilem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl sterilem Wasser aufgenommen und in 100 µl Aliquots in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren.

#### **2.2.12.21 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens***

Durch Erzeugen kurzer Spannungspulse wird die Membran kompetenter Bakterienzellen permeabilisiert. Dadurch wird die Aufnahme von freier DNA aus dem Medium in die Zelle ermöglicht. Nach der Zugabe der zu transformierenden DNA zu den kompetenten Zellen wurde der Transformationsansatz in sterile Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 2 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte am GenePulser mit 2,5 kV, 25 µF, 400 Ω. Der Transformationsansatz wurde anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt. Die Regeneration der *Agrobakterien* erfolgte für 2 h bei 28° C, danach wurden sie auf LB-Selektionsmedium ausplattiert.

#### **2.2.12.22 Extraktion von *Arabidopsis*-Gesamt-RNA**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenteilen wurde eine Extraktion mit Trizolpuffer durchgeführt. Dazu wurden 200 mg Pflanzenmaterial auf flüssigem N<sub>2</sub> aufgemörsert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Auf das Pflanzenmaterial im Reaktionsgefäß wird 1,5 ml Trizolpuffer gegeben. Vor der Trizolzugabe muss das Pflanzenmaterial gefroren bleiben, damit kein RNA-Abbau durch RNasen stattfindet. Zum Lösen der RNA wurde das Reaktionsgefäß auf einem Vortexer fixiert und für 5 min gevortext. Anschließend wird 300 µl Chloroform hinzugefügt und erneut 5 min gevortext. Es folgt ein 30-60 min Zentrifugationsschritt in einer

Kühlzentrifuge bei 12.000 rpm und 4° C. In diesem Schritt wird die Chloroformphase (unten) von der RNA-enthaltenden Trizolphase (Überstand) getrennt. Zwischen den Phasen bildet sich eine feste Trennschicht. Zur RNA Fällung wird 1 ml des Überstandes in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, in welches 500 µl kalter Fällungspuffer und 500 µl kaltes Isopropanol vorgelegt wurden. Das Reaktionsgefäß wird zum Vermischen des Überstandes mit dem Isopropanol einmal invertiert und die RNA anschließend 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Die gefällte RNA wird für 15-30 min bei 12000 rpm und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das RNA Pellet mit 250 µl 70% EtOH gewaschen. Nach einem weiteren 10-20 min Zentrifugationsschritt bei 12000 rpm und 4° C wird der Überstand abgenommen, verworfen und das RNA-Pellet 5 min luftgetrocknet. Die RNA wird in 50 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80° C weggefroren.

### **2.2.13 Transkriptomanalyse mit ARIZONA-Gesamt-Genom-Arrays**

Die für die Transkriptomanalysen verwendeten Microarrays stammen von der pflanzenwissenschaftlichen Abteilung der Universität Arizona und werden durch das Spotten des von der Firma Operon hergestellten Oligonucleotidsatzes „Arabidopsis Genome Oligo Set Version 3.0“ auf Glasträger erstellt. Mit dem Oligonucleotidsatz können 26.173 Proteinkodierende-Bereiche detektiert werden. Die für die Hybridisierung dieser Microarrays verwendete RNA wird zunächst mit dem „Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit“ (Ambion) zu aRNA umgeschrieben und dabei indirekt mit den Cy3/Cy5-Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

#### **2.2.13.1 Amplifikation der eingesetzten RNA**

Die RNA wurde zunächst nach dem Trizol-Protokoll aus Wurzelmaterial extrahiert. Vor der Verwendung in der aRNA-Synthese wurde die RNA zusätzlich mit dem RNeasyMini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Für die aRNA-Synthese wurde das Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit nach dem Herstellerprotokoll angewendet. Für die Aufreinigung und Aufkonzentrierung der doppelsträngigen cDNA wurde der cDNAClear™ Kit (Ambion) verwendet, während die *in vitro*-Transkription mit dem MEGAClear Kit (Ambion) aufgereinigt wurde. Die Konzentration der eluierten aRNA wurde mit dem Nanodrop (Thermo Scientific) gemessen und die Qualität der aRNA im Bioanalyzer (Agilent) überprüft.

#### **2.2.13.2 Indirekte Markierung der aRNA**

Während der folgenden Arbeitsschritte wurden die Proben vor Licht geschützt um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Für die indirekte Markierung wurden je 7,5 µg der Aminoallyl-aRNA auf ein Volumen von 14 µl gebracht und mit 2 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9) und 4 µl Cy5 bzw. Cy3 für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kopplungsreaktion wurde durch Zugabe von 35 µl 100 mM Natriumacetat (pH 9) gestoppt. Die Proben wurden mit 45 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt und die fluoreszenzmarkierte aRNA mit den dafür vorgesehenen Säulen nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Elution der fluoreszenzmarkierten aRNA fand mit zweimal 50 µl auf 60° C vorgewärmtem Wasser statt. Anschließend wurde am Nanodrop gemessen, wie viel pmol Fluorophore eingebaut wurden. Je

nach Ausbeute wurden für die Hybridisierung der Array Slides Proben mit 150-300 pmol Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass von beiden auf einem Array hybridisierten Proben gleichviel pmol Fluorofor pro  $\mu\text{l}$  eingesetzt wurde. Die für einen Array verwendeten Volumen Cy5- und Cy3-markierte aRNA wurden vereinigt und 1  $\mu\text{l}$  polyA (20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) zugegeben. In einer Vakuumzentrifuge wurde das Hybridisierungsgemisch bis zur Trockne eingengt.

### 2.2.13.3 Hybridisierung der ARIZONA-Gesamt-Genom-Arrays

Vor der Verwendung wurden die ARIZONA-Arrays „hydratisiert“. Das bedeutet, dass sie dreimal kurz über ein 60° C Wasserbad gehalten wurden, so dass ihre Oberfläche leicht beschlägt. Dabei laufen die hygroskopischen Spots etwas auseinander, wodurch sie sich später besser auswerten lassen. Die Oligonucleotide wurden durch Bestrahlung mit 120 Millijoule UV-Licht kovalent an der Oberfläche des Glasträgers gebunden. Danach wurden die Arrays vier Minuten mit 0,1% SDS, dreimal zwei Minuten mit Wasser und dann 30 Sekunden in 100% Ethanol gewaschen und schließlich durch Abpusten mit Druckluft getrocknet.

Die Vorhybridisierungslösung besteht aus 300  $\mu\text{l}$  20x SSC, 575  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, 100  $\mu\text{l}$  10% BSA und 25  $\mu\text{l}$  20% SDS. Zur Vorhybridisierung wurden 80  $\mu\text{l}$  Vorhybridisierungslösung auf ein Deckglas gegeben und durch Adhäsion mit dem Array verbunden. Danach wurde der Array in der Hybridisierungskassette 1 h bei 42° C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde die getrocknete aRNA in 9  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O resuspendiert und 1  $\mu\text{l}$  10x Fragmentations-Puffer zugegeben. Dann wurde 15 min bei 70° C inkubiert und 1  $\mu\text{l}$  Fragmentations-Stopp-Puffer zugegeben. Zu jeder Probe wurde 56,4  $\mu\text{l}$  Hybridisierungslösung (350  $\mu\text{l}$  Formamid, 210  $\mu\text{l}$  20x SSC, 70  $\mu\text{l}$  50x Denhardts Reagenz, 17,5  $\mu\text{l}$  20% SDS, und 52,5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O) zugegeben, gevortext, 5 min auf 95° C erhitzt und 5 min bei 10.000 g abzentrifugiert.

Die vorhybridisierten Array-Slides wurden mit Wasser gewaschen und die in der Hybridisierungslösung aufgenommene aRNA wurden zwischen den Glasträger und ein darauf platzierten *Liftslip* appliziert. Der Glasträger mit Probe wurde in wasserdichte Hybridisierungsgefäße eingeschlossen und anschließend über Nacht bei 37° C in einem Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Glasträger 5 min bei 37° C mit 0,5x SSC + 1% SDS, zweimal 5 min bei RT mit 0,5x SSC + 1% SDS, viermal 5 min bei RT mit 0,5x SSC und 5 min bei RT mit 0,1x SSC gewaschen und anschließend durch Abpusten getrocknet.

Anschließend wurden die Fluoreszenzsignale mit einem G2505B Microarray-Scanner (Aligent Technologies) eingelesen.

### 2.2.13.4 Auswertung der ARIZONA-Gesamt-Genom-Arrays

Die Auswertung erfolgte mit der Software „Automatic Imageprocessing for Microarrays“ (Katzer, 2004). Normalisierung der lokalen Hintergrund-korrigierten Intensitäts-Rohdaten wurde nach der nichtlinearen „Lowess Regression“ durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit der Array-Slides zu verbessern, wurde jeder normalisierte Datensatz mittels Division durch seine Standardabweichung angepasst. Die Datenprozessierung wurde mit dem Statistikprogramm „R“

durchgeführt. Differentiell exprimierte Gene wurden mit einem „ANOVA Mixed Effects“-Modell unter Anwendung von „SAS PROC MIXED“ erhalten. Dabei wurden die „False Discovery Rate“ (FDR)-angepassten p-Werte durch die Benjamini-Hochberg Methode berechnet (Bertz et al. 2005). Die Auswertung wurde zweifach unter Anwendung stringenter Grenzwertkriterien ( $p \leq 0,05$ , Induktion  $\geq 2,5$ ) und weniger stringenter Grenzwertkriterien ( $p \leq 0,1$ , Induktion  $\geq 2$ ) durchgeführt.

## 2.3 Berechnungen

### 2.3.1 Statistische Berechnungen zur Promoter-Trap-Kollektion

Die Luciferase-Promoter-Trap-Kollektion umfasst 20.261 individuelle transgene Linien, die als Annahme (A1) in einer unendlichen Grundgesamtheit normalverteilt sind. Jede individuelle Linie hat damit die Wahrscheinlichkeit von 1 zu 20.261, bei einer zufälligen Ziehung (Stichprobe der Größe eins) gezogen zu werden. Die Wahrscheinlichkeit bleibt bei jeder Ziehung gleich, da die Grundgesamtheit unendlich ist (Annahme A2). Bei einer Stichprobe der Größe  $n = 40.000$  gleicht das zufällige Ziehen durch die Annahme der unendlichen Grundgesamtheit dem „Ziehen mit Zurücklegen“ der Multinomial-Verteilung.

$n = 40.000$

$X_i = X_{1,2,\dots,n}$  = transgene Linien der Stichprobe ( $i = 1, 2, \dots, 40.000$ )

$p_m$  = Wahrscheinlichkeit der 20.261 Linien in der Grundgesamtheit ( $m = 1, 2, \dots, 20.261$ )

=  $1 / 20.261$  ( $p_1 = p_2 = \dots = p_{20.261}$ )

= 0,0049355%

$P(X_i)$  = Wahrscheinlichkeit von jedem  $X_i$  der Stichprobe

Annahme (A3): die  $X_i$  sind multinomial-verteilt.

Um  $P(X_i)$  zu berechnen, benötigt man den Erwartungswert  $E(X_i)$  und die Standardabweichung  $\sigma$ :

$E(X_i)$  = Erwartungswert für  $X_i = n * p_i = 40.000 * (1 / 20.261) = 1,974$

$\sigma^2$  = Varianz für  $X_i = n * p_i * (1 - p_i) = 40.000 * (1 / 20.261) * (1 - (1 / 20.261)) = 1,974$

$\sigma$  = Wurzel(Varianz) = 1,4049911...

Da die Stichprobe größer als 50 und die Wahrscheinlichkeit jeder einzelnen transgenen Linie kleiner als 0,05 ist, kann die Multinomial-Verteilung durch eine **Poisson-Verteilung** mit der Variablen  $\lambda$  angenähert werden:

$n > 50$  und  $p < 0,05$

$\lambda = n * p = 1,974$

$$P_\lambda(X = k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$

$P_\lambda(X_i = k)$  = Wahrscheinlichkeit, dass eines der  $X_i$  in der Stichprobe k-mal vorkommt

$P_\lambda(X_i = 0)$  = Wahrscheinlichkeit, dass eines der  $X_i$  in der Stichprobe nicht vorkommt

Die Wahrscheinlichkeit **P(0)** einer einzelnen transgenen Linie, nicht in der Stichprobe vorzukommen, wird folgendermaßen berechnet:

$$\mathbf{P(0)} = (1,974^0 / 0!) * e^{-1,974} = e^{-1,974} = 0,1389.. = 13,89\%$$

[Da  $0! = 1$ ,  $x^0 = 1$  und **eulersche Zahl**  $e = 2,718281828459...$  ]

Die Wahrscheinlichkeit für jede der 20.261 Ereignisse, nicht in der Stichprobe vorzukommen (**P(0)**), ist **13,89%**; d.h. umgekehrt, dass die Wahrscheinlichkeit für jedes der 20.261 Ereignisse, in der Stichprobe der Größe 40.000 vorzukommen ist **86,11%** ist.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Infektionssysteme für die transkriptionelle und phänotypische Analyse der *V. longisporum* - *A. thaliana* Interaktion

Die Untersuchung der Interaktion des bodenbürtigen Pathogens *V. longisporum* mit *Arabidopsis* stellt besondere Anforderungen an ein kontrolliertes Infektionssystem. Um eine erfolgreiche Infektion zu erreichen, müssen die Wurzeln der Pflanze in direkten Kontakt mit den *V. longisporum* Konidiosporen treten. Für die Untersuchung von frühen Abwehrreaktionen in der Wurzel wurde ein *in vitro*-Infektionssystem etabliert. Dieses System sollte für eine Massen-Durchmusterung einer *Arabidopsis*-Mutanten-Kollektion nach *V. longisporum*-responsiven Genen der Wurzeln und für die Analyse des durch *V. longisporum* induzierten Transkriptionsprofils der Wurzeln geeignet sein. Die Suszeptibilität von *Arabidopsis*-Mutaten konnte in dem *in vitro*-System nicht untersucht werden, da es unter den *in vitro*-Kulturbedingungen nicht zu der Ausprägung eines Pathophänotyps kam.

Für die phänotypische Beurteilung der Suszeptibilität von *A. thaliana*-Mutanten wurde ein auf Erde basierendes Infektionssystem etabliert. Dieses Infektionssystem wurde für einen *gain-of-function*-Screeningansatz von Transkriptionsfaktor-Überexpressionslinien auf erhöhte Resistenz gegen *V. longisporum*-Besiedelung angewandt. In der vorliegenden Arbeit wurde vorwiegend das *V. longisporum* Isolat *V. longisporum* 43 (V143) (Zeise und Tiedemann 2002) verwendet.

#### 3.1.1 Etablierung eines sterilen *in vitro*-Infektionssystems für die Untersuchung früher transkriptioneller Reaktionen der Wurzel auf *V. longisporum*-Infektion

Das *in vitro*-Infektionssystem wurde für den Einsatz in einem Massenscreening von mit *V. longisporum* infizierten *A. thaliana* optimiert. In dem Screening sollte eine *A. thaliana*-Promoter-trap-Kollektion auf in den Wurzeln durch *V. longisporum* induzierte Lucifersase-Aktivität durchmustert werden. Weiterhin sollte das *in vitro*-System für die Untersuchung früher transkriptioneller Reaktionen der *A. thaliana*-Wurzel auf den Befall mit *V. longisporum* eingesetzt werden. Für die transkriptionelle

Untersuchung ist es essentiell, dass das infizierte Wurzelgewebe leicht zu ernten ist. Das System sollte außerdem steril sein, um den Einfluss der Pilzinfektion ohne Störungen durch andere Pathogene untersuchen zu können. Das etablierte und in Abbildung 5 dargestellte Plattensystem wurde erfolgreich im Screening und im Microarray angewendet und erfüllt die gestellten Anforderungen.

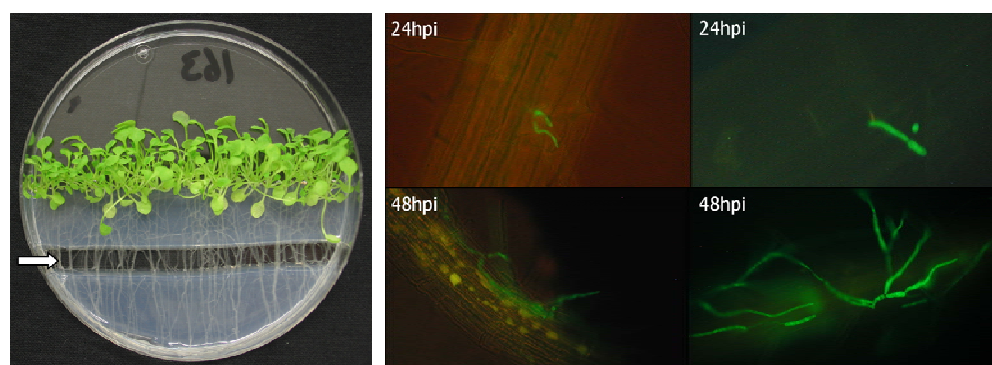


Abbildung 5: Steriles *in vitro*-Infektionssystem für die Untersuchung früher Reaktionen von *A. thaliana*-Wurzeln auf *V. longisporum*-Infektion. Links: Abbildung einer Petrischale des Infektionssystems mit 20 Tage alten *Arabidopsis*-Pflanzen. Der in den Agar geschnittene Infektionskanal (Pfeil) ist im Wurzelbereich zu erkennen. Rechts: Fluoreszenzbilder von *Arabidopsis*-Wurzeln 24 Stunden (24 hpi) und 48 Stunden (48 hpi) nach Infektion mit einem *GFP* markierten *V143*-Stamm (Eynck et al. 2007).

In dem Kultursystem wachsen die Pflanzen auf Agar, welcher mit  $\frac{1}{4}$ -konzentrierten MS-Salzen versehen ist. Um nach der Infektion ein Überwachsen des Mediums mit Mycel zu vermeiden, ist ihm keine Kohlenhydratquelle zugesetzt. Damit die Pflanzen autotroph wachsen können, sind die Petrischalen mit einem gasdurchlässigen Gewebeband verschlossen. Eine Woche nach dem Auskeimen wurde der Wurzelbereich mit Tonpapierhüllen vor UV-Strahlung geschützt. Die *A. thaliana*-Pflanzen zeigen in dem *in vitro*-System unter Langtag-Bedingungen während der ersten vier Wochen ein normales Wachstum. Für Untersuchungen, welche über diesen Zeitrahmen hinausgehen, ist das System nicht geeignet, da die Pflanzen nach ca. vier Wochen Stresssymptome entwickeln und das Kulturmedium eintrocknet. Für die Infektion werden die *Verticillium*-Sporen in den dafür vor dem Aussäen der Pflanzen in den Agar geschnittenen Infektionskanal pipettiert. Hierdurch entstehen keine Verletzungen der Wurzeln und es kommen ausschließlich die Wurzeln in Kontakt mit der Infektionslösung. Für die Infektion wurden Konidiosporen aus Gefrierkultur verwendet. Dies vereinfacht die Handhabung und sorgt für gleichbleibende Sporenqualität. Bei der Applikation von 500  $\mu$ l Sporensuspension mit einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  Sporen/ml je Kulturplatte wurde eine gleichmäßige Infektion erzielt, ohne dass die Wurzeln völlig

von Mycel überwachsen wurden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte das Pilzwachstum 24 und 48 Stunden nach der Applikation der Sporensuspension kontrolliert werden. Um das Pilzwachstum fluoreszenz-mikroskopisch zu verfolgen, wurde ein *GFP*-markierter *VI43*-Stamm und eine Färbung mit saurem Fuchsin angewandt (Eynck et al. 2007). In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass die Konidiosporen 24 Stunden nach der Applikation auf der Wurzeloberfläche einen Keimschlauch gebildet haben. 48 Stunden nach Infektion ist auf der Wurzel schon ein verzweigtes Hyphensystem des *GFP*-markierten *VI43*-Stammes zu erkennen. Zu späteren Zeitpunkten ist die Wurzel von einem ausgeprägten Hyphennetz besiedelt. Drei Tage nach der Infektion lässt sich mit bloßem Auge Pilzmycel an den Wurzeln erkennen. Innerhalb von weiteren fünf Tagen breitet sich das Pilzmycel entlang der Wurzeln von dem Infektionskanal bis zum Spross aus.

Die Kinetik der Mycelentwicklung wurde nur für Konidiosporen aus Gefrierkultur mikroskopisch ermittelt. Beobachtungen des Mycelwachstums bei Infektionen mit frisch geernteten Konidiosporen zeigten eine schnellere Entwicklung.

### **3.1.2 Ausprägung des *VI43*-Pathophänotyps von *A. thaliana* in einem erdbasierten Infektionssystem**

Um den Pathophänotyp von *V. longisporum*-inokulierten Pflanzen mit *Arabidopsis*-Mutanten zu vergleichen, wurde zunächst der *Verticillium*-Pathophänotyp von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp (*Col-0*) unter Langtag- und Kurztag-Regime charakterisiert. Im Langtag (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) kultivierte Pflanzen wurden 16 Tage nach der Aussaat mit *VI43*-Sporen infiziert. Dazu wurden die Pflanzen in einem Erd/Sand-Gemisch angezogen und die Wurzeln für die Infektion mit Wasser ausgewaschen. Die Infektion erfolgte durch Einhängen der Wurzeln in eine Infektionslösung. Nach der Infektion wurden die Pflanzen in Pflanzerde eingetopft und die Entwicklung des *VI43*-induzierten Schadbildes verfolgt (Abbildung 6). Die erste sichtbare Veränderung der infizierten Pflanzen in Form einer Wuchsdepression trat nicht früher als acht Tage nach der Infektion auf. In Abbildung 6 sind die projizierte Blattfläche und die Pflanzenhöhe von *VI43*-infizierten und *mock*-inokulierten Pflanzen gegeneinander aufgetragen. Um die Veränderungen zu quantifizieren wurden Fotos von Blattrosetten infizierter und nicht-infizierter Pflanzen gemacht und mit Hilfe einer Bildbearbeitungs-Software die projizierte Blattfläche vermessen. Zwölf Tage nach

Infektion wurde eine verringerte Blattfläche der infizierten Pflanzen im Vergleich zu dem *mock*-inokulierten Wildtyp gemessen (Abbildung 6E). Dieser Unterschied vergrößerte sich bis 20 Tage nach Infektion, so dass die *VI43*-infizierten Pflanzen nur noch 50%-60% der Blattfläche der *mock*-inokulierten Pflanzen aufwiesen. Auch bei der Sproßlänge wurde eine deutliche, ca. 50%ige Reduktion („*stunting*“) durch die Infektion ausgelöst (Abbildung 6D + F).

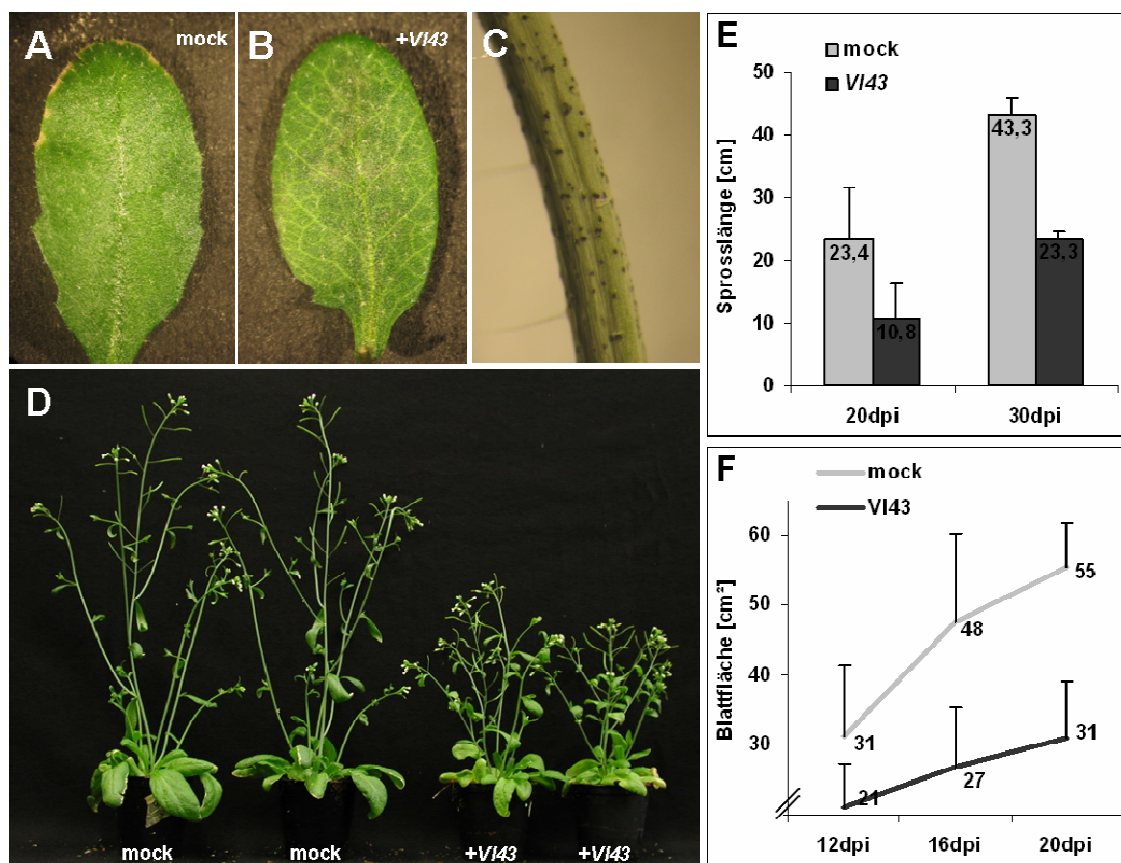


Abbildung 6: Symptomausprägung von *VI43*-infizierten *Col-0* Wt-Pflanzen im Langtag. Chlorotisches Ausbleichen der Blattnervatur 12 Tage nach Infektion (B) im Vergleich zu *mock*-inokuliertem Wt (A); (C) *VI43*-Mikrosklerotien an einem *Arabidopsis* Infloreszenzstängel 35 Tage nach Infektion; (D) Vergleich von zwei repräsentativen *mock*-inokulierten *Col-0* Pflanzen (links) zu zwei *VI43*-infizierten Pflanzen (rechts), 28 Tage nach Infektion. (E+F) Vergleichende Sproßlängenmessung (E) und Blattflächenanalyse (F) von *mock*-inokulierten und *VI43*-infizierten *Arabidopsis* Pflanzen unter Langtag-Regime. In den drei Replikaten ( $n=3$ ) wurde jeweils der Mittelwert aus 18 infizierten und 18 *mock*-inokulierten Pflanzen ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei Replikate.

Neben der quantitativ messbaren Veränderung der Blattfläche und der Sproßlänge zeigte sich ab zwölf Tagen nach Infektion eine chlorotische Aufhellung der Blattnervatur (Abbildung 6A + B). Bei einem Teil der Blätter breitete sich diese Vergilbung im Infektionsverlauf auf das ganze Blatt aus. 30-45 Tage nach Infektion konnte an den Stängeln von seneszenten Pflanzen die Ausbildung von Mikrosklerotien

beobachtet werden (Abbildung 6C). Diese waren jedoch nicht gleichmäßig über die Pflanze verteilt, sondern traten vorwiegend an dem primären Infloreszenzstängel auf. Auch die durch die Infektion auftretende Stauchung war in dem Primärspross am deutlichsten ausgeprägt. Sekundär austreibende Sprosse zeigten geringere Symptomatik.

Im Kurztag (8 Stunden Licht / 16 Stunden Dunkelheit) wurden die Pflanzen aufgrund ihrer langsameren Entwicklung erst 28 Tage nach Aussaat infiziert. Auch hier war der durch *VI43* ausgelöste Kümmerwuchs nicht früher als acht Tage nach Infektion sichtbar. Die projizierte Blattfläche war aufgrund der im Kurztag kräftig ausgebildeten Blattrosette gut zu quantifizieren. Hier zeigte sich ab zwölf Tagen nach Infektion eine messbare Reduktion der Blattfläche infizierter Pflanzen. 20 Tage nach Infektion betrug die Blattfläche der infizierten Pflanzen noch 35-45% der *mock*-inokulierten (Abbildung 7 A). Als weiteres Merkmal wurde das Frischgewicht 22 Tage nach Infektion bestimmt. Auch hier zeigte sich durch die *Verticillium*-Infektion eine deutliche Reduktion von 67% (Abbildung 7 B).

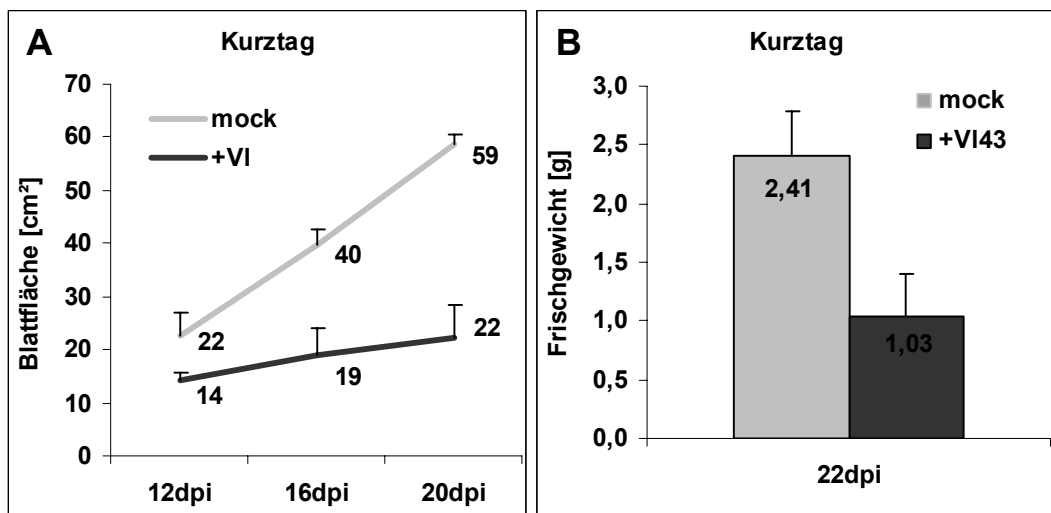


Abbildung 7: Vergleichende Blattflächenanalyse (A) und Frischgewichts-Messung (B) von *mock*-inokulierten und *VI43*-infizierten *Arabidopsis*-Pflanzen unter Kurztag-Regime. In den zwei Replikaten wurde bei der Blattflächenmessung jeweils der Mittelwert aus 18 infizierten und 18 *mock* inokulierten Pflanzen ermittelt. Das Frischgewicht wurde nur in einem einmal durchgeführten Experiment ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen entsprechend die Standardabweichung zwischen den zwei Replikaten oder der gewogenen 18 Einzelpflanzen.

## 3.2 Analyse der frühen, transkriptionellen Reaktion der Wurzel auf *Verticillium longisporum*-Infektion

### 3.2.1 Erstellung eines Transkriptionsprofils von *Arabidopsis*-Wurzeln ein und drei Tage nach *V. longisporum*-Infektion

Um die bei *Arabidopsis thaliana* durch die Infektion mit *V. longisporum* in der Wurzel auftretende transkriptionelle Reaktion zu untersuchen, wurde ein Microarray-Experiment durchgeführt. Die Probennahme des Wurzelgewebes erfolgte einen und drei Tage nach der Infektion mit *Verticillium*, da aus den mikroskopischen Untersuchungen hervorging, dass in diesem Zeitrahmen ein enger Kontakt zwischen der Wurzel und dem Pilz entsteht. Die Annahme war, dass dann auch die ersten transkriptionellen Reaktionen stattfinden. In einem „2x2 loop“-Design (Abbildung 8A) wurden vier verschiedene Transkriptionsprofile verglichen. Die vier Bedingungen umfassten *Vl43*-infiziertes Wurzelgewebe einen Tag und drei Tage nach Infektion, sowie die Proben von entsprechendem *mock*-inokuliertem Wurzelgewebe. Zur Anwendung kamen *Arizona*-Oligonucleotidarrays, welche mit dem *Qiagen*-Oligo-Set Version 3.0 gespottet sind (<http://ag.arizona.edu/microarray>). Diese Oligonucleotide repräsentieren 28.964 proteinkodierende Transkripte und 87 microRNAs (Operon 2008).

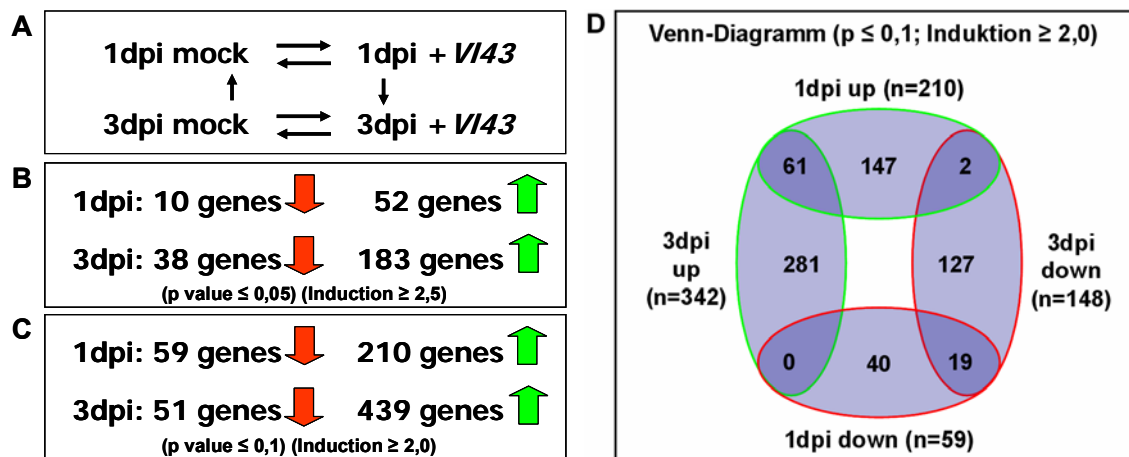


Abbildung 8: Übersicht über die Durchführung und die Ergebnisse des Microarray Experimentes. (A) „2x2 loop“-Design des Microarray-Experimentes. Die Pfeile zwischen den Bedingungen symbolisieren die sechs verwendeten Array-Slides. Die Pfeilspitzen symbolisieren jeweils das eine (Cy3), die Pfeilenden jeweils das zweite eingesetzte Fluoroför (Cy5). (B + C) Darstellung der einen (1 dpi) und drei (3 dpi) Tage nach Infektion hoch- (grüne Pfeile) und runterregulierten (rote Pfeile) Transkripte der kurzen (B) und der langen Ergebnislisten (C). (D) Schnittmengendiagramm (Venn-Diagramm) der nach *Vl43*-Infektion in Wurzeln differenziell regulierten Gene. Dargestellt sind die Schnittmengen der in der langen Ergebnisliste zusammengefassten Gene  $p \leq 0,1$ ; Induktion  $\geq 2,0$ . Die Kreise symbolisieren die einen (1 dpi) und drei (3 dpi) Tage nach Infektion hochregulierten (up) und runterregulierten (down) Transkripte.

Die differentiell exprimierten Gene der zwei Zeitpunkte wurden unter Anwendung der Grenzwertkriterien für den maximalen Signifikanzwert ( $p$ ) und die minimale differentielle Expression (Induktion) in einer langen ( $p \leq 0,1$ ; Induktion  $\geq 2$ ) und einer kurzen Liste ( $p \leq 0,05$ ; Induktion  $\geq 2,5$ ) zusammengefasst (Anhang Tabelle 7 & Tabelle 8, Seiten 114-118). Die kurzen Listen für einen und drei Tage nach *Vl43*-Infektion umfassen entsprechend 62 und 241 differentiell exprimierte Transkripte, während die lange Liste für den Ein-Tages-Zeitpunkt 269 und die für den Drei-Tages-Zeitpunkt 490 Transkripte umfasst. Der Anteil der durch *Vl43* reprimierten und induzierten Gene ist in Abbildung 8 dargestellt. Drei Tage nach Infektion findet eine deutlich ausgeprägtere Veränderung des Transkriptionsprofils als einen Tag nach Infektion statt. Vergleicht man die Überschneidungen der differentiell exprimierten Transkripte einen und drei Tage nach *Vl43*-Infektion der langen Ergebnislisten (Abbildung 8 D), zeigt sich nur eine kleine Schnittmenge. 61 der Transkripte sind sowohl einen wie auch drei Tage nach Infektion hochreguliert, während 19 Transkripte zu beiden Zeitpunkten herunterreguliert sind (Abbildung 8 D).

Um einen Eindruck von der biologischen Relevanz der *Verticillium*-induzierten Gene zu erhalten, wurden für den Drei-Tages-Zeitpunkt die hochregulierten Gene in Genfamilien sortiert. Die besonders häufig repräsentierten Genfamilien sind in Tabelle 2 aufgeführt. Besonders Transkriptionsfaktoren und mit der Pathogenabwehr assoziierte Gene wie die Glutathion-S-Transferasen, P450-Monooxygenasen, Peroxidasen, Chitinasen und Germin-ähnlichen Proteine werden durch *Vl43* induziert. Zusätzlich wurde eine Gruppierung der Gene in Funktionszusammenhänge durchgeführt (Tabelle 2). Dabei wurde deutlich, dass besonders Gene der Calcium-vermittelten Signalweiterleitung, Gene des Calalexin-Syntheseweges und Gene des Zellwandmetabolismus durch *Vl43* induziert wurden.

Die im Microarray induzierten Transkripte wurden auch mit Hilfe einer *Genevestigator*-Analyse (Zimmermann et al. 2004) mit Transkriptionsprofilen anderer Gesamt-Genom Arrays verglichen. Auf der *Genevestigator*-Internetseite der ETH-Zürich (<https://www.genevestigator.ethz.ch>) lässt sich eine umfangreiche Arraydatenbank nach verschiedenen Kriterien durchsuchen. Durch den Vergleich wurde bei einigen Stimuli, wie Salzstress, *Botrytis*- und *Pseudomonas*-Infektion, eine besonders deutliche Koregulation festgestellt (Tabelle 3, Seite 63).

**Tabelle 2: Auflistung der Anzahl von gehäuft auftretenden Genfamilien (oberer Tabellenteil) und Genen spezieller Funktionszusammenhänge (unterer Tabellenteil) unter den 439 *Vl43*-hochregulierten (up) Transkripten der langen Ergebnisliste drei Tage nach Infektion (3dpi). Unter Schwefel-Aktivierung sind die Enzyme zusammengefasst, welche an der Bereitstellung des Schwefel Donors 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) beteiligt sind**

Genfamilie	lange Liste 3dpi up
<b>Trankriptionsfaktoren<sup>1</sup></b>	<b>33</b>
<b>Glutathione S-Transferasen</b>	<b>11</b>
<b>Cytochrom P450 Monooxygenasen</b>	<b>11</b>
<b>Peroxidasen</b>	<b>10</b>
<b>Germin ähnliche Proteine</b>	<b>9</b>
<b>Chitinasen</b>	<b>6</b>
<b>Protease Inhibitoren</b>	<b>5</b>
<b>Resistenz Proteine der TIR-NBS Klasse</b>	<b>4</b>
<b>Glycosyl Hydrolasen</b>	<b>5</b>
<b>UDP-Glycosyltransferasen</b>	<b>4</b>
<b>Funktionszusammenhänge</b>	
<b>Calcium Signaltransduktion</b>	<b>12</b>
<b>Camalexin/Tryptophan Synthese</b>	<b>7</b>
<b>Zellwand verändernde Enzyme</b>	<b>8</b>
<b>Schwefel Aktivierung (PAPS)</b>	<b>4</b>

Um die Induktion der in dem Array-Experiment identifizierten Gene zu verifizieren und den zeitlichen Verlauf der Induktion zu ermitteln, wurden *quantitative Reverse Transkriptase-PCRs* (qRT-PCRs) durchgeführt. Für 29 Abwehr-assoziierte Gene, welche auch jeweils Vertreter der in Tabelle 2 aufgeführten Genfamilien einschlossen, wurde die *Vl43*-vermittelte Induktion in einem Zeitreihen-Experiment verifiziert (Siehe Anhang, Tabelle 10, Seite 127). Dazu wurden zwei unabhängige Replikate durchgeführt und jeweils 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach Infektion Wurzelgewebe geerntet. In Abbildung 9 (Seite 64) ist an drei Beispiel-Genen der zeitliche Verlauf der Induktion in  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werten dargestellt.  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte bedeuten hier die relative *Vl43*-elicitierte Induktion der Transkripte gegenüber den *mock*-inokulierten Proben. Die Transkripte des Glycosyl-Hydrolase-Gens *DIN2*, eines Serin-Protease-Inhibitors und eines TIR-NBS Membran-Rezeptors zeigt in dem Zeitreihenexperiment bis zum Acht-Tages-Zeitpunkt eine im

<sup>1</sup> Die induzierten Transkriptionsfaktoren sind in Tabelle 6 (Seite 84) in die einzelnen Genfamilien aufgeschlüsselt.



Zeitverlauf ansteigende Transkriptmenge. Diese Kinetik wurde allgemein für die mittels qRT-PCR verifizierten Transkripte beobachtet. Durch die qRT-PCR Untersuchung der 29 repräsentativen Transkripte konnte die Qualität der Arraydaten verifiziert werden, da sie eine gute Reproduzierbarkeit der durch *Vl43*-Infektion induzierten Transkription zeigten.

**Tabelle 3: Auflistung von Array-Experimenten, die eine besonders große Überschneidung der induzierten Transkripte mit den 183 *Vl43*-induzierten Transkripten der kurzen Ergebnisliste des Drei-Tage-Zeitpunktes zeigen. 21 der *Vl43*-induzierten Transkripte wurden nicht in den Vergleich mit einbezogen, da diese nicht in dem Genevestigator-Datensatz enthalten sind (daher  $n=162$ ). Die in den Genevestigator-Datensätzen annotierten Transkripte wurden bei einem  $\log_2$  *Signal Ratio*  $\geq 0,5$  als induziert gezählt, während das Grenzwertkriterium der *Vl43*-induzierten Transkripte bei einer Induktion  $\geq 2,5$  lag.**

Micro-Array Experiment	Induktion	Gene-vestigator Referenz	Koregulierte Gene aus $n=162$	% Koregulation
Salzstress	Wurzeln 24h	At-120	134	89
<i>Botrytis cinerea</i>	Blatt 18h	At-147	133	82
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> (avrRpm1)	-	At-211	129	80
AgNO <sub>3</sub>	10µM 3h	At-113	127	78
Hypoxia	12h	At-171	115	71
TIBA (Auxin Transport Inhibitor)	10µM 3h	At-113	114	70
Cycloheximid (Proteinbiosynthese Inhibitor)	10µM 3h	At-113	111	69
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> (avrRps4)	-	At-211	109	67
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20mM 1h	At-185	105	65
Syringolin ( <i>Pseudomonas</i> Effektor)	20µM	At-086	103	64
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (avrRPT2)	48h	At-204	100	62
Salizylsäure (SA)	10µM 3h	At-113	93	57
<i>E. cichoracearum</i>	3 Tage	At-085	90	56
Chitin	30min	At-169	90	56
EF-Tu elf18 (PAMP)	30, 60min	At-128	86	53
EF-Tu elf26 (PAMP)	30, 60min	At-128	83	51

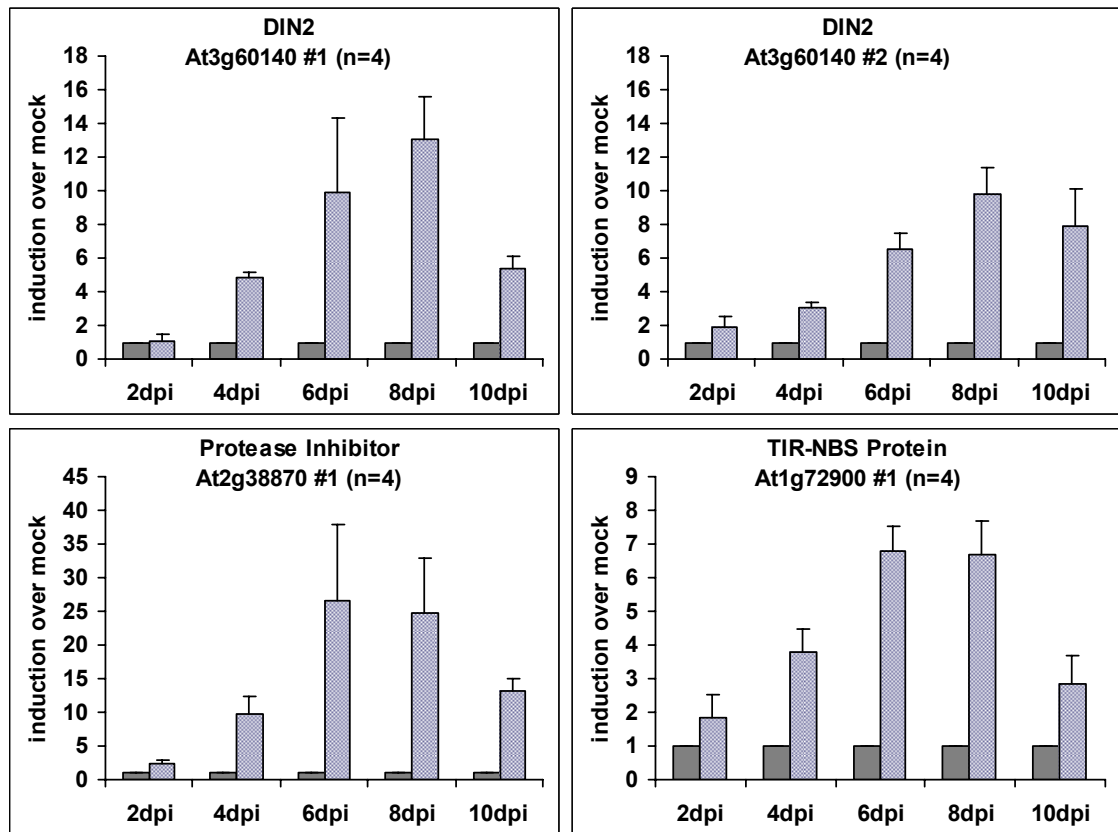


Abbildung 9: Quantitative RT-PCR von *V143*-induzierten Genen im *time course*-Experiment 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach Infektion (dpi). Aufgetragen sind  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte. Die grauen Balken repräsentieren die auf eins gesetzten Werte der *mock*-induzierten Proben, die schraffierten, hellen Balken zeigen die auf *mock* normierte Induktion der *V143*-inokulierten Proben. Für DIN2 sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten gezeigt (#1 und #2). DIN2 (*At2g38870*) kodiert für eine Glycosyl-Hydrolase, *At2g38870* für ein Serin-Protease-Inhibitor und *At1g72900* für ein TIR-NBS-Resistenzprotein. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von n technischen Replikaten

Das sich die Pathogenantwort im Verlauf der frühen *Verticillium - Arabidopsis*-Interaktion zwischen einem und drei Tagen nach Infektion sehr dynamisch entwickelt, wird durch den Vergleich der zwei Wurzelzeitpunkte deutlich. Die Überschneidung der zu beiden Zeitpunkten induzierten Transkripte ist gering. Auch bei dem Vergleich der *Verticillium Induced Genes (VLIGs)*, welche 5 und 18 Tage nach Infektion entsprechend in Petiolen oder in *Arabidopsis*-Blattrosetten induziert sind (Tappe 2008), zeigt sich nur eine geringe Überschneidung mit den in der Wurzel 3 dpi induzierten Transkripten (Abbildung 10). Bei den Array-Experimenten von Hella Tappe, in denen die *VLIGs* identifiziert wurden, kamen die gleichen auch in dieser Arbeit eingesetzten *Arizona*-Arrays zur Anwendung. Die sich in den drei Array-Experimenten überschneidenden Transkripte sind im Anhang in Tabelle 9 (Seite 126) aufgelistet. Das in allen drei Arrays induzierte Transkript *At4g33550* kodiert für ein nicht näher charakterisiertes Lipid-

Transfer-Protein. Die geringe Überschneidung zwischen den in diesen drei Microarrays differentiell exprimierten Transkripten ist nicht überraschend, da sich die Interaktion bei einer bereits etablierten Pilzinfektion in den Blättern deutlich von frühen Pilzinteraktionen in den Wurzeln unterscheidet.

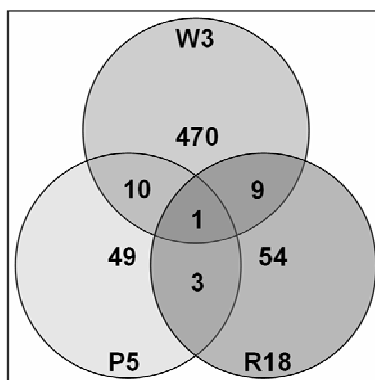


Abbildung 10: Schnittmengendiagramm der nach *V143*-Infektion differentiell regulierten Gene aus drei unterschiedlichen Microarray-Versuchen. Kreis W3 umfasst die 490 regulierten Gene aus Wurzeln 3 dpi ( $p \leq 0,1$ ; Induktion  $\geq 2,0$ ), Kreis P5 umfasst die 67 in Petiolen regulierten *V143*s 5 dpi ( $p \leq 0,1$ ; Induktion  $\geq 2,0$ ), Kreis R18 umfasst die 63 regulierten *V143*s aus der Blattrosette 18 dpi ( $p \leq 0,1$ ; Induktion  $\geq 2,0$ ). Die in den Schnittmengen auftretenden Transkripte sind im Anhang in Tabelle 9 (Seite 126) aufgelistet.

### 3.2.2 Vergleich der durch die *Verticillium longisporum*-Pathovare *V143* und *V118* induzierten Genexpression

Von *V. longisporum* sind verschiedene Pathovaren bekannt, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus verschiedenen Pflanzenbeständen weltweit isoliert wurden (Zeise und Tiedemann 2002). Diese unterscheiden sich in ihrer Pathogenität; das Kultivar *V143* wurde als besonders aggressiv klassifiziert und daher in den Versuchen dieser Arbeit angewendet (persönliche Mitteilung Meik Dilcher). Daneben wurde das als weniger aggressiv eingestufte Kultivar *V118* in einige Untersuchungen einbezogen. Mit *V118* infizierte *Arabidopsis*-Pflanzen zeigten nicht die durch das *V143*-Kultivar ausgelösten Symptome und ließen sich optisch nicht von *mock*-inokulierten Kontrollpflanzen unterscheiden. In Stängelsterilisations-Versuchen wurde die Propagation des Pilzes in den Blütenstängel für *V143* und *V118* vergleichend analysiert. Dabei zeigte sich zwar eine geringere Besiedelung durch das Kultivar *V118*, jedoch hatte *Verticillium* auch in den mit *V118* infizierten Pflanzen, welche keine Symptome zeigten, die Pflanze systemisch besiedelt (Abbildung 11).

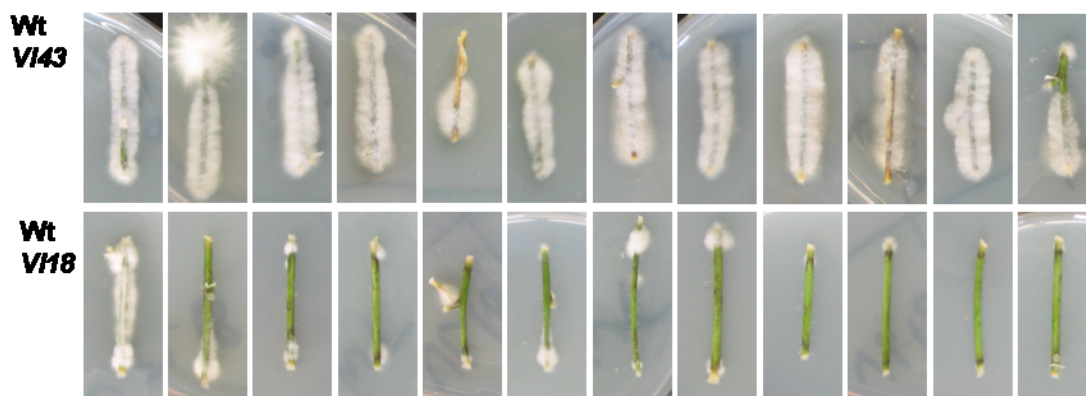


Abbildung 11: Vergleich der systemischen Kolonisierung von *A. thaliana* Wt durch die *V. longisporum* Kultivare *VI43* (obere Reihe) und *VII8* (untere Reihe) anhand eines Stängelkolonisations-Assays. Oberflächensterilisierte Stängelsegmente von infizierten Pflanzen wurden 30 Tage nach Infektion auf Pilzmedium ausgelegt und nach vier Tagen wurde das auswachsende *V. longisporum*-Mycel fotografiert.

Um zu untersuchen, ob die verschiedenen Kultivare unterschiedliche transkriptionelle Reaktionen in *Arabidopsis* auslösen, wurden bei dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Zeitreihenexperiment parallel auch mit *VII8* infizierte Wurzelproben untersucht. Die Induktion der 29 ausgewählten Zielgene wurde vergleichend durch qRT-PCR ermittelt. Bei den untersuchten Genen konnte im Zeitraum 2-10 Tage nach Infektion kein deutlicher Unterschied in der transkriptionellen Induktion zwischen den Kultivaren *VII8* und *VI43* festgestellt werden. Die qRT-PCR Daten sind im Anhang zusammengefasst (Abbildung 33, Seite 128). Die Unterschiede in der Besiedelungseffizienz und dem Auslösen von Krankheitssymptomen lässt sich also nicht auf eine deutlich veränderte transkriptionelle Reaktion der Pflanze zurückführen. Zumindest nicht bei den 29 untersuchten Transkripten.

### 3.3 Die *V. longisporum*-induzierte transkriptionelle Aktivierung des Sekundärmetabolismus

Die Analyse der Transkriptionsprofile lässt auf die Induktion von Genen des Phenylpropanoid-Stoffwechsels, dem Indol-Glucosinolat-Stoffwechsels, des Auxin-Metabolismus, der Camalexin-Biosynthese und der Monoterpen-Synthese schließen. Eine schematische Übersicht der vom Chorismat ausgehenden Synthese von Camalexin, Auxin, Phenylpropanoiden und Indol-Glucosinolaten ist in Abbildung 12 dargestellt.

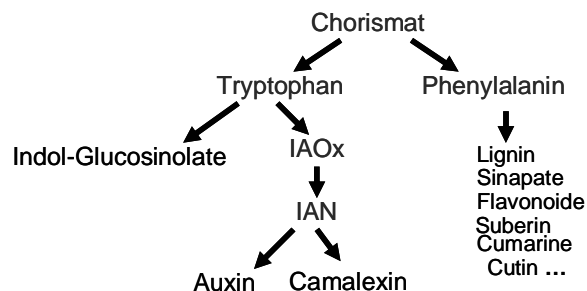


Abbildung 12: Schema der in den Transkriptionsprofilen ein oder drei Tage nach *Vl43*-Infektion induzierten Biosynthesewege der Chorismat-abstammenden Sekundärmetabolite. Indol-3-acetaldoxim (IAOx), Indol-3-Acetonitril (IAN)

In Tabelle 4 sind die in dem Arrayexperiment durch *Vl43* induzierten Gene des Sekundärmetabolismus aufgelistet. Die drei Gene, welche für Enzyme des Syntheseweges von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) kodieren, wurden mit dem Sekundärmetabolismus assoziiert, da PAPS wahrscheinlich als Donor von aktiviertem Schwefel beispielsweise für die Synthese von Glucosinolaten aber auch für die Reaktion von IAN zu Dihydrocamalexat bei der Camalexin-Synthese benötigt wird. Des Weiteren wurden durch *Vl43* zwei Gene des Phenylpropanoid-Stoffwechsels induziert. Dies deutet auf eine mögliche Synthese von Lignin hin.

Tabelle 4: Auflistung der einen und drei Tage nach *Vl43*-Infektion induzierten Gene, welchen bereits eine Funktion in der Sekundärmetabolit-Synthese nachgewiesen wurde. Die Transkripte der zwei *AtTPS-CIN* Gene sind einen Tag nach Infektion induziert, die übrigen 15 Transkripte sind drei Tage nach Infektion induziert.

AGI	Gen	3dpi	1dpi	Syntheseweg
At4g04610	APS Reductase 1 (APR1)	2,6	-0,9	PAPS
At3g22890	ATP-sulfurylase 1 (APS1)	2,1	-0,6	PAPS
At4g14680	ATP-sulfurylase 3 (APS3)	2,6	-0,5	PAPS
At5g19440	Cinnamyl-Alcohol Dehydrogenase	2,0	-0,5	Phenylpropanoide
At1g67980	Caffeoyl-CoA 3-O-Methyltransferase (CCOAMT)	3,3	1,7	Phenylpropanoide
At5g57220	CYP81F2	6,8	3,8	Indolglycosinolate
At3g60120	Glycosyl Hydrolase (BGLU27), similar to PEN2	2,5	-0,1	Indolglycosinolate
At3g44300	Nitrilase 2 (NIT2)	2,9	0,5	Auxin
At5g22300	Nitrilase 4 (NIT4)	4,0	0,7	Auxin
At5g17990	Phosphoribosylanthranilate Transferase 1	2,4	0,5	Tryptophan
At5g05730	Anthranilate Synthase Alpha Subunit (ASA1)	2,3	1,6	Tryptophan
At1g24909	Anthranilate Synthase Beta Subunit (ASA2)	2,1	1,7	Tryptophan
At3g54640	Tryptophan Synthase Alpha Subunit (TSA1)	3,4	2,8	Tryptophan
At2g30770	CYP71A13	9,2	4,6	Camalexin
At3g26830	CYP71B15, PAD3	6,5	-0,8	Camalexin
At4g39950	CYP79B2	4,0	0,7	Camalexin
At3g25820	Terpene Synthase-Like Sequence-1,8-Cineole	-1,6	2,5	Monoterpen
At3g25830	(AtTPS-CIN)	-1,9	2,1	

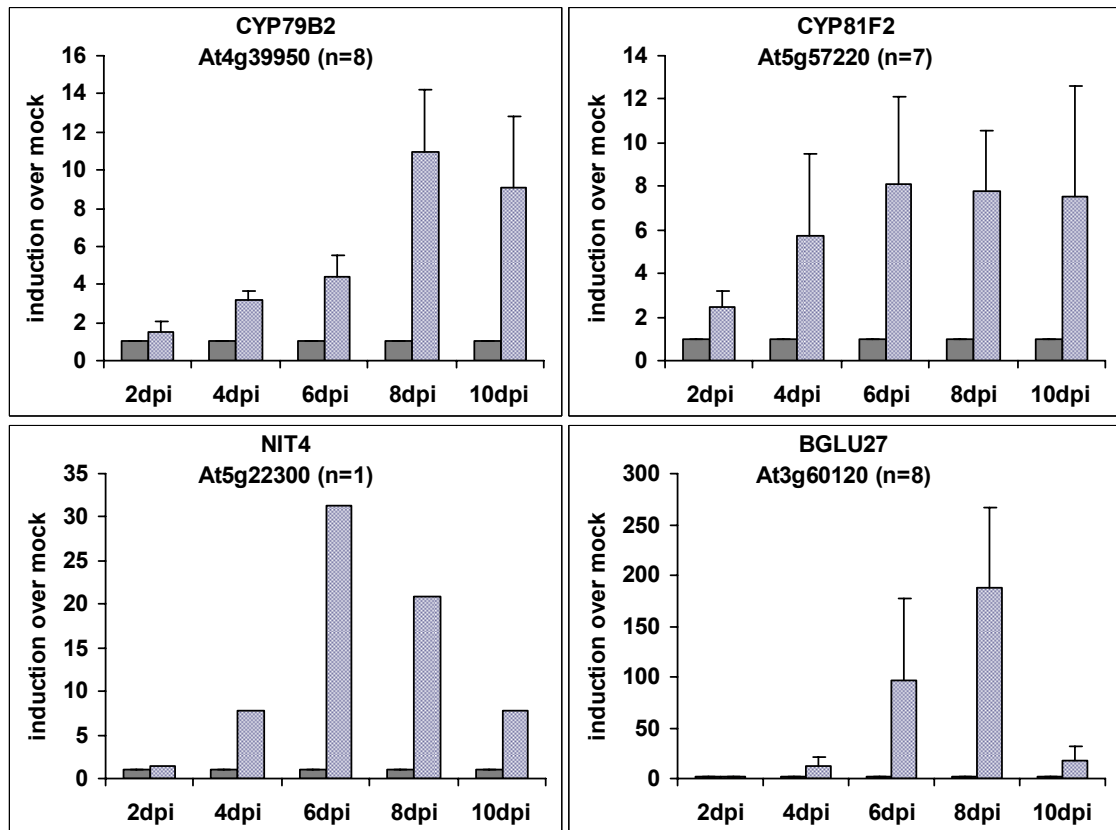


Abbildung 13: Quantitative real time PCR von *VI43*-induzierten Genen des Sekundärmetabolismus im *time course*-Experiment 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach Infektion (dpi). Aufgetragen sind  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte. Die grauen Balken repräsentieren die Werte der *mock*-induzierten Proben, die schraffierten Balken zeigen die auf *mock* normierte Induktion der *VI43*-inokulierten Proben. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von n technischen Replikaten.

Zudem wurden mit CYP81F2 und BGLU27 zwei Gene durch *VI43* induziert, welche eine Funktion in dem Metabolismus von Indol-Glucosinolaten haben. Kürzlich wurde ein Myrosinase unabhängiger Mechanismus publiziert, der eine durch Pilzbefall induzierbare Bildung von Phytoalexinen und Signalkomponenten der Abwehrreaktion über die hydrolytische Spaltung von Glucosinolaten katalysiert (Clay et al. 2009; Bednarek et al. 2009). Dabei wird Indol-3-ylglucosinolat (I3G) unter Beteiligung der Enzyme PEN2 und CYP81F2 über das Zwischenprodukt 4-methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat (4MI3G) in noch nicht weiter charakterisierte Produkte umgesetzt. Da BGLU27 (At3g60120) eine zu PEN2 homologe Glycosyl-Hydrolase ist, könnte nach *Verticillium*-Infektion ein PEN2/CYP81F2-homologer Mechanismus in den Wurzeln induziert werden. Als weitere Gene wurden die Nitrilasen NIT2 und NIT4 induziert, welche wahrscheinlich eine Rolle bei der Bildung von Auxin einnehmen (Vorwerk et al. 2001). Die Induktion von NIT4, CYP79B2, BGLU27 und CYP81F2 wurde mittels

qRT-PCR verifiziert (Abbildung 13). Das Transkript der PEN2-homologen Glycosyl-Hydrolase BGLU27 war mit einer 200-fachen Induktion außergewöhnlich stark reguliert. Bei der Arrayauswertung war die koordinierte Induktion des Camalexin-Biosyntheseweges besonders auffällig und wird im Folgenden Kapitel detailliert beschrieben.

### 3.3.1 *Vl43*-Infektion führt in den Wurzeln zu einer koordinierten Induktion des Camalexin-Biosyntheseweges

Bei der Analyse der *Vl43*-induzierten Transkription trat besonders die Induktion von Transkripten der Camalexin-Biosynthese hervor (zur Übersicht siehe Glawischnig 2007). Camalexin wird in *Arabidopsis* ausgehend von Tryptophan, über die

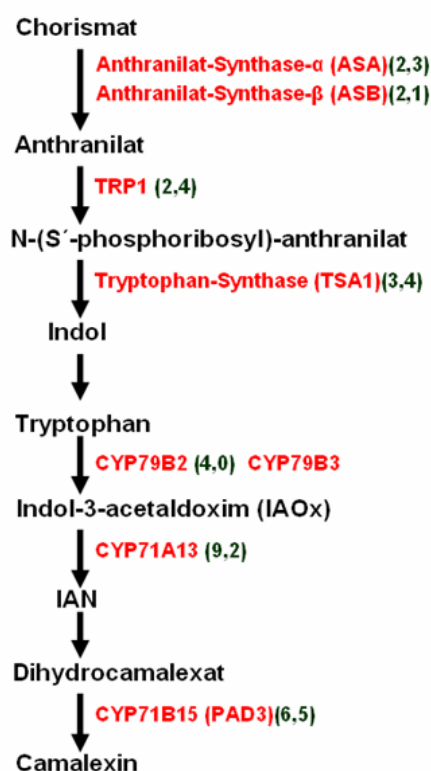


Abbildung 14: Flussdiagramm der Camalexin-Synthese. In Klammern stehen die im Microarray drei Tage nach Infektion ermittelten Induktionswerte der Enzym-Transkripte.

Zwischenprodukte Indol-3-Acetaldoxim (IAOx), Indole-3-Acetonitrile (IAN) und Dihydrocamalexat gebildet (Abbildung 14). Auch die Synthese von Tryptophan als Ausgangssubstrat der Camalexin-Synthese scheint durch *Vl43*-Infektion stimuliert zu werden, da die Transkripte von vier wichtigen Tryptophan-Synthesegenen deutlich induziert wurden. Die folgende Umsetzung von Tryptophan zu Camalexin vermitteln drei Cytochrom-P450-Monooxygenasen, welche im Array stark induziert wurden. Transkriptionell wurden durch die Infektion in den Wurzeln alle der bisher bekannten Camalexin-Syntheseenzyme elicitiert. Der letzte Schritt der Camalexin-Synthese, die

Umsetzung von Dihydro-Camalexat zu Camalexin, wird durch CYP71B15 geleistet (Schuhegger et al. 2006). Für CYP71B15 ist die Mutante *phytoalexin deficient 3* (*pad3*) beschrieben, welche kein Camalexin mehr bilden kann (Glazebrook und Ausubel 1994). Eine verstärkte Transkription des *CYP71B15*-Gens konnte durch qRT-PCR verifiziert

werden (Abbildung 15). Die Induktion wurde in zwei unabhängigen Experimenten überprüft, welche sich in der Induktionskinetik etwas unterscheiden. In dem ersten Experiment erreicht die Induktion acht Tage nach Infektion das Maximum von einer ca. 13-fachen Induktion, während die Induktion im Replikate erst zehn Tage nach Infektion dieses Maximum erreichte. Diese Induktionsschwankungen wurden auch bei dem Vergleich anderer Transkripte beobachtet und zeigen die Varianz zwischen unabhängigen Infektionen.

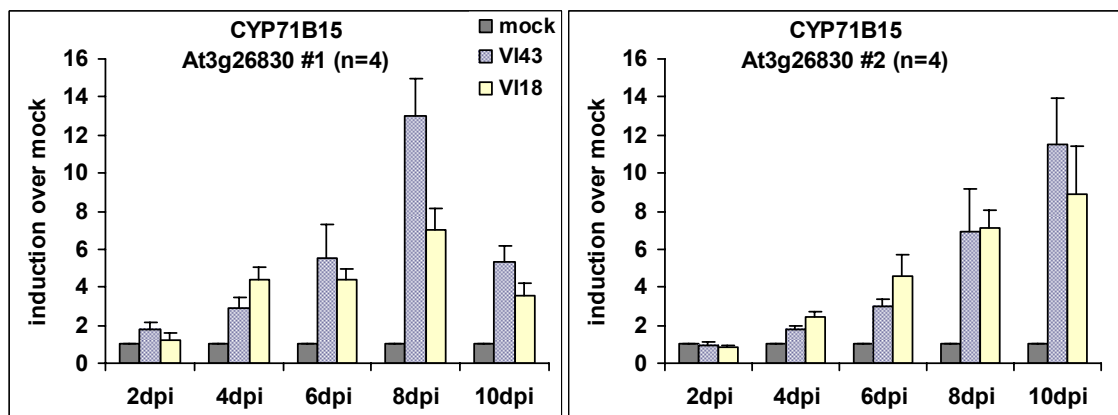


Abbildung 15: qRT-PCR zum Nachweis der CYP71B15-Transkripte (PAD3) im *time course*-Experiment 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach Infektion (dpi). Aufgetragen sind  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte. Die grauen Balken repräsentieren die auf 1 genormten Werte der mock induzierten Proben, die schraffierten Balken zeigen die auf *mock* normierte Induktion der *VI43*-inokulierten Proben. Die hellen Balken zeigen die Induktion der *VI18*-inokulierten Proben. Es sind die Ergebnisse aus zwei biologischen Replikaten gezeigt (#1 und #2). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von (n) technischen Replikaten.

Um die lokale Induktion der *VI43*-responsiven Transkripte aufzuklären, wurde die Herstellung von Promotor-Luciferase-Fusionen initiiert. Dazu wurden Gateway-*attB*-Primer konstruiert, unter deren Anwendung von einigen ausgewählten, im Array induzierten Transkripten jeweils der 2000 bp 5'-Promotorbereich aus genomischer *Arabidopsis*-DNA amplifiziert wurde. Die erhaltenen *attB*-PCR Produkte wurden anschließend in einer BP-Reaktion in den *pDONR201* Entry-Vektor übertragen. In einer folgenden LR-Reaktion, in welcher der für Luciferase-Promotorfusionen vorgesehene Gateway-Destination-Vektor *pBGWL7.0* und der den Promotor-tragende *pDONR201* Donor-Vektor eingesetzt wurden, konnten Promotor-Luciferase-Fusionen tragende Expressionsvektoren generiert werden. Diese Promotor-Reporter-Konstrukte wurden anschließend durch *Agrobakterien*-vermittelte Transformation stabil in *Arabidopsis*-WT übertragen.



Die *Prom<sub>CYP79B2</sub>:LUC*-Reporterlinien wurden für Untersuchungen der *V. longisporum* induzierten lokalen Reporterinduktion eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass drei Tage nach Infektion die Luciferaseaktivität der *Prom<sub>CYP79B2</sub>:LUC*-Pflanzen nur in einem sehr lokalen Bereich an dem Infektionskanal auftrat (Abbildung 16). Die Luciferaseaktivität war auf den Bereich beschränkt, welcher drei Tage nach Infektion mit *V. longisporum*-Hyphen bewachsen war. Die Kolo-kalisation von Luciferaseinduktion und Pilzbewuchs zeigt die sehr lokale Induktion des CYP79B2 Promotors durch *Vl43*. Die Erstellung von weiteren Reporterlinien der Gene At2g30770 (CYP71A13), At2g38870 (Protease-Inhibitor) und At1g14550 (Peroxidase) befindet sich im Stadium der Selektion der transgenen Pflanzen.

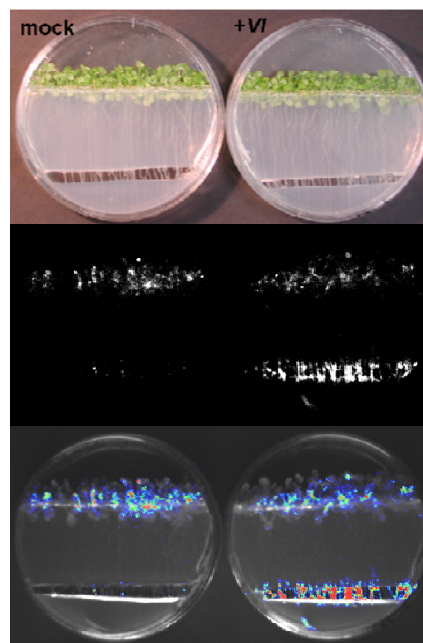


Abbildung 16: Lokale Induktion der Luciferase-Aktivität in Wurzeln von *Vl43* infizierten *Prom<sub>CYP79B2</sub>* Luciferase-Reporterpflanzen drei Tage nach Infektion. Von den in den verschiedenen Aufnahmen abgebildeten zwei *Arabidopsis in vitro*-Kulturplatten ist die linke jeweils mock inokuliert (mock) und die rechte *Vl43*-infiziert (+*Vl*). Die obere Aufnahme ist ein normales Farbbild, das mittlere zeigt das Rohbild der Luciferase-Aufnahme, welches mit einer Belichtungszeit von 20 min aufgenommen wurde. Das untere Bild zeigt ein falschfarbenes Überlagerungsbild, um die Luciferase-Aktivität besser lokalisieren zu können.

### 3.3.2 Biochemischer Nachweis der durch *Verticillium*-Infektion induzierten Camalexin-Biosynthese

Da bei Pilzinteraktionen, beispielsweise der Interaktion von *Arabidopsis* mit *Alternaria brassicicola* oder *Botrytis cinerea* (Thomma et al. 1999; Ferrari et al. 2007), dem Phytoalexin Camalexin eine bedeutende Funktion in der Pilzabwehr nachgewiesen wurde, wurden die Camalexin-Konzentrationen in *Verticillium*-infizierten Wurzeln gemessen. Dazu wurden Wurzelproben der zwei schon durch qRT-PCR untersuchten Zeitreihenexperimente (Kapitel 3.2.1) und die eines dritten biologischen Replikates auf Camalexin-Akkumulation untersucht (Abbildung 17). Die HPLC-Messungen wurden von Stefanie Goetze (Abteilung Biochemie der Pflanze, Göttingen, Prof. Feußner) durchgeführt. Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, kommt es durch die Infektion mit den *V. longisporum*-Kultivaren *VL43* und *VL18* in den Wurzeln zu der Synthese und Akkumulation von Camalexin. Die Akkumulation in Pflanzen welche mit *VL18* infiziert wurden ist etwas geringer.

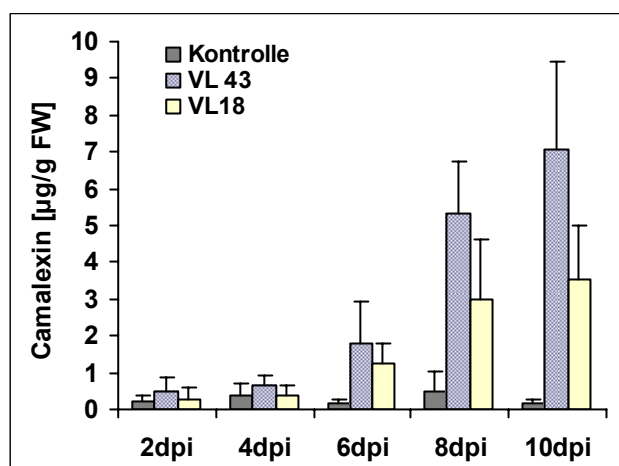


Abbildung 17: Camalexin-Konzentrationen in mit *V. longisporum* infizierten *Arabidopsis thaliana*-Wurzelproben. Die Camalexin-Konzentration wurde 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach *VL43*- und *VL18*-Inokulation (dpi) mittels HPLC gemessen. Die Camalexin-Konzentrationen pro Gramm Wurzelfrischgewicht [ $\mu\text{g/g FW}$ ] der *mock*-inokulierten Kontrollen (grauer, linker Balken), der *VL43*-inokulierten Pflanzen (schraffierter, mittlerer Balken) und der *VL18*-inokulierten Pflanzen (heller, rechter Balken) sind im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zwischen den drei biologischen Replikaten. Die Analysen wurden von Stefanie Goetze (Abteilung Biochemie der Pflanze, Göttingen, Prof. Feußner) durchgeführt.

Im Zeitreihenexperiment wurde eine ansteigende Camalexin-Konzentration zwischen zwei und zehn Tagen nach Infektion gemessen. Die *VL43*-infizierten Pflanzen akkumulierten zehn Tage nach Infektion im Mittel  $7 \mu\text{g}$  Camalexin pro Gramm

Wurzelgewebe, während die mit dem *Vl18* Kultivar infizierten Pflanzen zehn Tage nach Infektion im Mittel 3,5 µg Camalexin pro Gramm Wurzelgewebe akkumulierten. Eine Konzentration von 7 µg Camalexin pro Gramm Frischgewicht bedeutet eine mittlere Konzentration von 35 µM Camalexin in dem Wurzelgewebe.

### 3.3.3 Entwicklung der durch *Verticillium* ausgelösten Krankheitssymptome in Camalexin-Biosynthese-Mutanten

Um der *Verticillium*-induzierten Akkumulation von Camalexin eine Funktion in der Pathogenabwehr von *Arabidopsis* nachzuweisen, wurde die Ausprägung des *Verticillium*-induzierten Pathophänotypen in den *Arabidopsis*-Mutanten *pad3* und *cyp79b2/b3* untersucht. Diese können kein Camalexin mehr bilden. Die *cyp79b2/b3*-Mutante ist die Kreuzung von T-DNA-Insertionsmutanten der Gene CYP79B2 und CYP79B3 (Mikkelsen et al. 2003). In der Doppelmutante ist die von diesen Enzymen vermittelte Umsetzung von Tryptophan zu IAOx gestört (Abbildung 29, Seite 96). Die *pad3*- und die *cyp79b2/b3*-Mutante zeigten unter Langtag-Regime in uninfiziertem Zustand schwache pleiotrophe Phänotypen. Die *pad3*-Mutante wies im Vergleich zum Wildtyp etwas stärkeres Wachstum auf, während die *cyp79b2/b3*-Mutante ein etwas geringeres Wachstum und leicht verformte Blätter zeigte. Unter Kurztag-Regime waren diese Unterschiede weniger stark ausgeprägt.

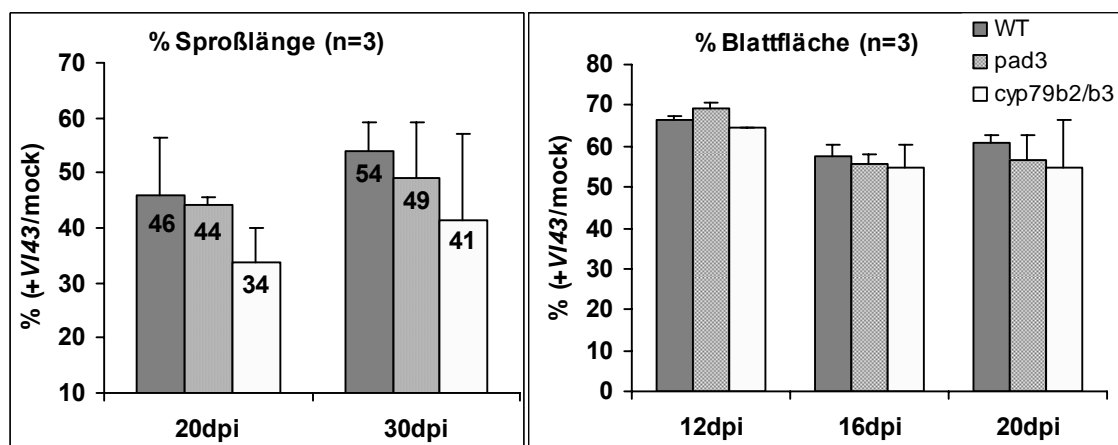


Abbildung 18: Darstellung der relativen Sproßlänge und Blattfläche von *Vl43*-infizierten, Langtag-kultivierten Pflanzen (LT) im Vergleich zu *mock*-inokulierten Kontrollpflanzen. Dargestellt sind die Werte für den *Col-0*-Wt (grauer, linker Balken), die *pad3*-Mutante (schraffierter, mittlerer Balken) und die *cyp79b2/b3*-Doppelmutante (hellgrauer, rechter Balken). Die Ergebnisse stammen aus drei biologischen Replikaten (n=3), in denen pro Linie die mittlere Blattfläche von jeweils 18 *Vl43*-infizierte Pflanzen zu der von 18 *mock* inokulierten Pflanzen ins Verhältnis gesetzt wurde.

Aufgrund dieser Unterschiede wurde jeweils die relative Veränderung zwischen *Vl43*-infizierten und *mock*-inokulierten Kontrollpflanzen ermittelt. Der Vergleich der Krankheitssymptome beider Mutanten erfolgte anhand der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Merkmale. Im Langtag zeigten die infizierten Mutanten eine deutlich stärkere Reduktion der Sproßlänge als der Wildtyp (Abbildung 18). Während die infizierten Wildtyp-Pflanzen 30 Tage nach Infektion im Mittel eine Sproßlänge von 54% der Kontrollpflanzen erreichten, zeigten die *pad3*-Mutante mit 49% und die *cyp79b2/b3* Doppelmutante mit 41% eine stärkere infektionsbedingte Reduktion der Sproßlänge. Die Messung der Blattfläche zeigte im Langtag keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien.

Im Kurztag konnte bei der *pad3*-Mutante in zwei Replikaten keine Veränderung der Symptomatik im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 19). Für die *cyp79b2/b3*-Mutante wurde im Kurztag durch *Vl43*-Infektion eine deutlich stärkere Beeinträchtigung der Blattfläche ermittelt. Als zusätzliches Maß für die durch *Vl43* ausgelöste Wachstumsdepression wurde das Frischgewicht 22 Tage nach Infektion ermittelt. Auch dabei zeigte sich, dass sich die *pad3*-Mutante wie der Wildtyp verhielt, während bei *cyp79b2/b3* ein deutlich stärkerer Verlust des relativen Frischgewichtes gemessen wurde.

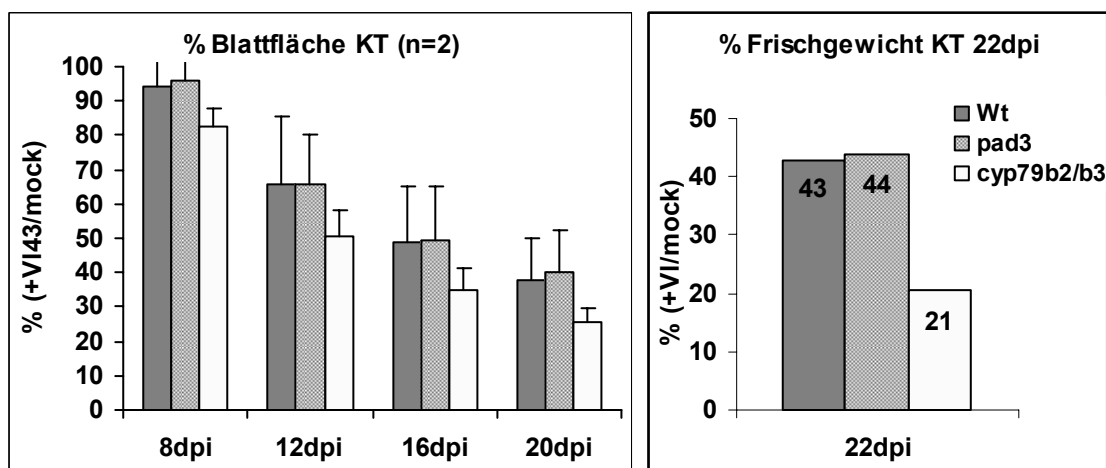


Abbildung 19: Darstellung der relativen Blattfläche und des Frischgewichts von *Vl43*-infizierten Kurztag-kultivierten Pflanzen (KT) im Vergleich zu *mock* inokulierten Kontrollpflanzen. Dargestellt sind die Werte für den *Col-0* Wt (grauer, linker Balken), die *pad3*-Mutante (schraffierter, mittlerer Balken) und die *cyp79b2/b3*-Doppelmutante (hellgrauer, rechter Balken). Die Ergebnisse stammen aus zwei biologischen Replikaten (n=2) in denen pro Linie die mittlere Blattfläche von jeweils 18 *Vl43*-infizierten Pflanzen zu der von 18 *mock* inokulierten Pflanzen ins Verhältnis gesetzt wurde.

Die Ergebnisse der *cyp79b2/b3*-Mutantenanalyse konnten mittlerweile in einem unabhängigen Experiment innerhalb der DFG-Forschergruppe 564 reproduziert werden (persönliche Mitteilung Stefanie Goetze). Die Untersuchung zeigt, dass die Unterschiede in der Blattfläche zwischen dem WT und der *cyp79b2/b3*-Mutante im Kurztag deutlich stärker ausgeprägt sind als im Langtag und dass die Krankheitssymptome in der *pad3*-Mutante unter beiden Kulturbedingungen keinen signifikanten Unterschied zu Wildtyp-Pflanzen zeigen. Der Unterschied in der Wirkung von *cyp79b2/b3* und *pad3* auf die Ausprägung der Krankheitssymptome lässt auf Camalexin unabhängige Prozesse der *Verticillium*-Toleranz schließen, welche nur in der *cyp79b2/b3*-Doppelmutante nicht aber in der *pad3*-Mutante betroffen sind.

### **3.4 Identifizierung von *Vl43*-responsiven Promotoren mittels Luciferase-Promoter-trap-Screening**

Bei dem Luciferase-Promoter-trap-Screening wurde eine *Arabidopsis*-Luciferase-Promoter-trap-Samenbank durchmustert, um *Verticillium*-responsive Promotoren zu identifizieren. Die Promoter-trap-Bank beinhaltet 20.211 individuelle T-DNA-Insertionslinien, welche auf 210 Pools mit je ca. 100 individuellen T-DNA-Insertionslinien aufgeteilt sind (Alvarado et al. 2004). Die Promoter-trap-Linien tragen eine T-DNA, welche direkt angrenzend an die *left-border*-Sequenz die promotorlose cDNA-Sequenz der Glühwürmchen-Luciferase (*Photinus pyralis*) enthält. Führt die Integration der T-DNA zu einer Translationsfusion oder zu einer Transkriptionsfusion der Luciferase mit einem endogenen Transkript, kann die Luciferase als Reporter für dessen Promotoraktivität dienen. In dem Promoter-trap-Screening wurden über 40.000 individuelle Pflanzen der Luciferase Promoter-trap-Kollektion nach *Verticillium*-spezifischer Luciferaseaktivität durchmustert (Abbildung 20). Aus technischen Gründen wurde das Screening in zwei Schritten durchgeführt. In dem ersten Durchmusterungsschritt wurden zunächst aus den 100 Linien umfassenden Pools individuelle Linien aussortiert, welche unter den Anzuchtbedingungen des sterilen *in vitro*-Kultursystems (Kapitel 3.1.1) drei Tage nach *Vl43*-Infektion Luciferase-Reporteraktivität zeigten. Pro Pool wurden ca. 200 Pflanzen untersucht. Die Luciferase Aktivität wurde mit einem hoch sensitiven CCD-Kamerasystem (Hamamatsu) detektiert. Ein Großteil der im ersten Schritt selektionierten Linien umfasst Pflanzen, bei denen die Reporteraktivität nicht spezifisch durch *Vl43* induziert ist, sondern durch die Aktivität eines konstitutiv aktiven

Gens ausgelöst wird. Daher wurde in einem zweiten Durchmusterungsschritt die *Vl43*-spezifische Luciferase-Induktion der im ersten Schritt selektionierten, individuellen Linien untersucht. Dazu wurde für jede Linie die Luciferaseaktivität von *mock*-inokulierten Pflanzen mit der von *Vl43*-infizierten Pflanzen drei Tage nach Infektion verglichen.

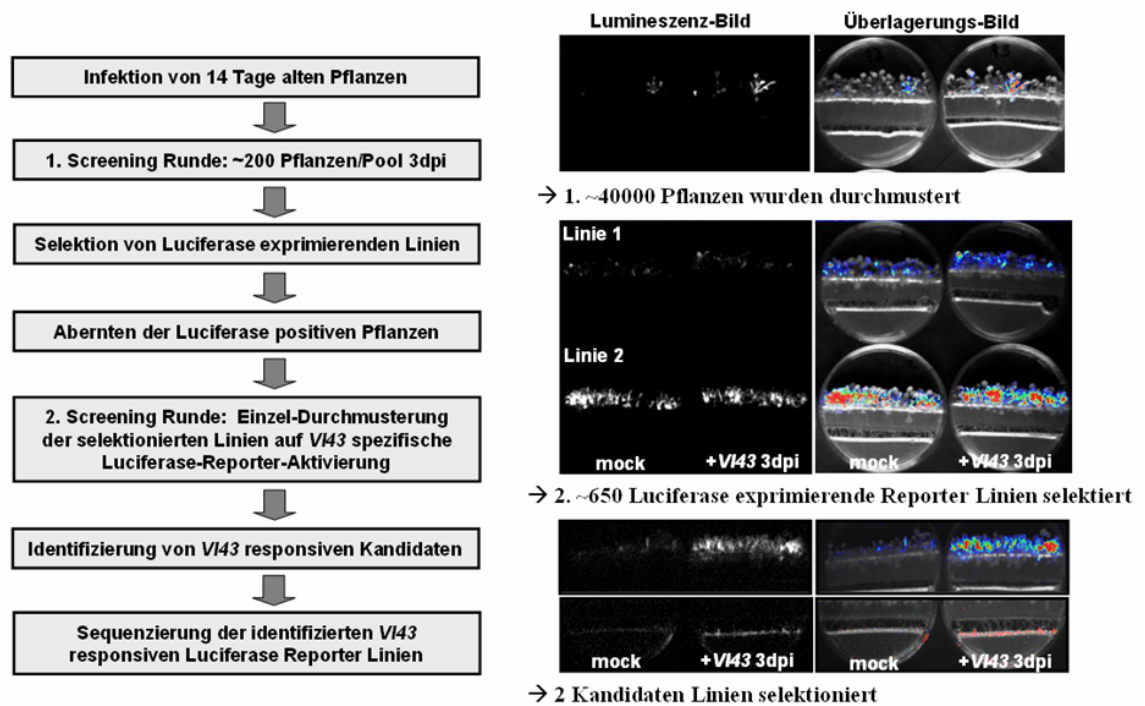


Abbildung 20: Übersichtsschema des Luciferase-Promoter-trap-Screening. Links ist ein Fluss-Schema des Screening-Verfahrens abgebildet. Rechts sind beispielhaft Bilder der drei Stufen des Screening-Verfahrens, sowie Zwischenergebnisse der einzelnen Screeningstufen dargestellt. Die Photos zeigen jeweils zwei Kulturplatten, von denen die linke die uninferzierte Kontrollplatte (*mock*) und die rechte die *Verticillium*-inokulierte Kulturplatte (*+Vl43*) darstellt. Die Aufnahmen wurden drei Tage nach Inokulation gemacht (3dpi). Es ist jeweils das Lumineszenz-Rohbild (links) und die Überlagerung des Falschfarben-eingefärbten Rohbildes mit einer schwarzweiß Aufnahme (rechts) abgebildet. Das obere Bild zeigt ein Beispiel des Primär-Screening der Promoter-Trap-Pools, das mittlere Bild zeigt den zweiten Screeningschritt der selektionierten individuellen Kandidatenlinien und das untere Bild zeigt zwei Kandidaten, welche *Vl43*-spezifische Reporteraktivität zeigten.

Es konnten aus ca. 650 individuellen Linien zwei Linien selektioniert werden (*Pt-LUC1* und *Pt-LUC2*), welche eine schwache, *Vl43*-spezifische Reporteraktivität zeigten. Diese Reporteraktivität ließ sich in folgenden Experimenten nicht zuverlässig reproduzieren; sie war sehr schwach und konnte nur in zwei von fünf Replikaten gezeigt werden.

Durch *long range inverse*-PCR wurden die T-DNA-Integrationsorte dieser zwei Linien bestimmt. Bei *Pt-LUC1* ist die T-DNA auf Chromosom 1 in *antisense* Orientierung in den codierenden Bereich einer Carotinoid-Isomerase (*At1g06820*) integriert. Eine Transkriptionseinheit mit gleicher Orientierung ließ sich in der Nähe der T-DNA-

Insertion nicht identifizieren (siehe Anhang, Abbildung 36). Daher ist die Reporteraktivität wahrscheinlich ein Artefakt. Bei der zweiten Linie (*Pt-LUC2*) ist die T-DNA im Thaumatin-ähnlichen Protein At1g75800 integriert.

Statistische Überlegungen zeigen, dass die Stichprobe von 40.000 durchmusterten Pflanzen nicht zu einem saturierten Screening führt. Die Luciferase-*Promoter-trap*-Kollektion umfasst 20.261 individuelle transgene Linien, welche laut Alvarado et al. (2004) im Durchschnitt eine T-DNA-Insertionsrate von ca. 1,6 Insertionen pro Linie aufweisen. Daher kann angenommen werden, dass die Kollektion über 32.000 T-DNA-Insertionen beinhaltet. Damit eine funktionelle Insertion des Luciferasegens erfolgt, muss es entweder zu einer Translationsfusion der Luciferase mit einem endogenen Protein oder zu einer Transkriptionsfusion durch die Integration des Reporters in einen 3'- oder 5'-regulatorischen Bereich kommen (Alvarado et al. 2004). Für den ersten Fall nimmt Alvarado et al. (2004) aufgrund von experimentellen Erkenntnissen eine Häufigkeit von 35% ( $p = 0,35$ ), für den zweiten Fall von 20% ( $p = 0,2$ ) an. Damit ergibt sich für eine Translationsfusion, bei welcher der Luciferase-Reporter im Leseraster ( $p = 0,33$ ) und in richtiger Orientierung ( $p = 0,5$ ) integrieren muss, eine Häufigkeit von 5,8% ( $0,5 \times 0,33 \times 0,35 = 0,058$ ). Für eine Transkriptionsfusion ergibt sich eine Häufigkeit von 10% ( $0,5 \times 0,2 = 0,1$ ). Damit erhält man für die Kollektion rechnerisch eine Rate von 15,8 % funktioneller T-DNA-Integrationen. Bei 32.000 T-DNA-Insertionen in der *Promoter-trap*-Kollektion bedeutet das, dass die Kollektion ca. 5.000 funktionelle Reporterfusionen enthält. Ein Teil dieser 5.000 funktionellen Insertionen werden jedoch Mehrfachinsertionen in einem Gen beinhalten, wodurch die tatsächliche Zahl der „getagten“ individuellen Gene deutlich unter 5.000 liegen wird. In der TAIR8-Annotation sind für *A. thaliana* 27.235 Protein-kodierende Gene annotiert (<http://www.arabidopsis.org>). Die Luciferase-*Promoter-trap*-Kollektion deckt damit deutlich unter einem Fünftel der annotierten *Arabidopsis*-Gene ab.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von dieser Kollektion ca. 40.000 Pflanzen nach *V. longisporum*-spezifischer Luciferase-Reporteraktivierung durchmustert. Für eine zu 90% saturierte Durchmusterung der Kollektion, also bei der Annahme, dass in dem Versuchsansatz 90% der 20.261 T-DNA-Insertionslinien durchmustert werden, wäre statistisch nach einer einfachen Binomialfunktion die Durchmusterung von 46.654 Pflanzen der Kollektion nötig. Da bei 40.000 durchmusterten Pflanzen die

Wahrscheinlichkeit für jede der 20.261 transgenen Linien, nicht in der Stichprobe enthalten zu sein, durch eine statistische Annäherung mittels Poisson-Verteilung 13,89% beträgt, ergibt sich eine Sättigung des Screenings von ca. 86%.

Es zeigte sich, dass das Screening technisch durchführbar ist, jedoch nicht die Sensitivität eines Microarray-Experimentes hat und leider nicht zu der Identifizierung von *Verticillium*-induzierbaren *Promoter-trap*-Linien führte.

### **3.5 Die *AtTORF-EX*-Bank: Durchmusterung einer *A. thaliana* Transkriptionsfaktor-Überexpressionskollektion nach *V. longisporum* resistenten Linien**

Transkriptionsfaktoren sind integrale Bestandteile von Signaltransduktions-Kaskaden. Von der Regulation eines Transkriptionsfaktors kann die Expression vieler Gene abhängig sein und die koordinierte Expression einer spezifischen Gen-Ausstattung induziert werden. Durch das in Kapitel 3.2.1 beschriebene Microarray-Experiment wurde deutlich, dass besonders Transkriptionsfaktoren durch die Infektion mit *Vl43* induziert werden. In Kooperation mit Christoph Weiste wurde eine *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktor ORF Überexpressions (*AtTORF-EX*) Samenbank erstellt (Weiste et al. 2007). Die Kollektion der ERF-Transkriptionsfaktoren („Ethylen-Responsive-Element-Binding-Factor“) dieser Bank wurde auf eine erhöhte Resistenz gegenüber Infektion mit *Vl43* durchmustert. Die grundlegende Annahme dabei war, dass die Überexpression eines Transkriptionsfaktors zu einer koordinierten, konstitutiven Expression von Abwehrgenen führt, wodurch die Pflanze in der Lage wäre, eine Pilzinfektion besser abzuwehren.

#### **3.5.1 Herstellung der *AtTORF-EX* Samenbank**

Bei der Herstellung der Bank wurde ein *batch*-Verfahren angewandt, bei dem die in Abbildung 21 dargestellte und im Rahmen der Arbeit entwickelte Transformations-Routine für Pools von ca. 30 Transkriptionsfaktoren (TF) angewandt wurde. Das *batch*-Verfahren wurde der Einzeltransformation vorgezogen, da die Transformation der insgesamt über 1200 verfügbaren Transkriptionsfaktor-Gene nur im *batch*-Verfahren mit einem akzeptablen Kosten- und Arbeitsaufwand zu leisten ist. Die entwickelte



Transformations-Routine bedient sich der Gateway<sup>®</sup>-Klonierungstechnik (Invitrogen). Im Rahmen des REGIA-Konsortiums wurden über 1200 Transkriptionsfaktor „Open-Reading-Frame“-Sequenzen (ORFs) in Gateway<sup>®</sup>-kompatible pDONR-Vektoren inseriert (Paz-Ares und The Regia Consortium 2002). Diese Gateway<sup>®</sup>-kompatible Transkriptionsfaktor-DONR-Vektor-Bank diente als Ausgangsmaterial zur Herstellung der *AtTORF-EX*-Bank.

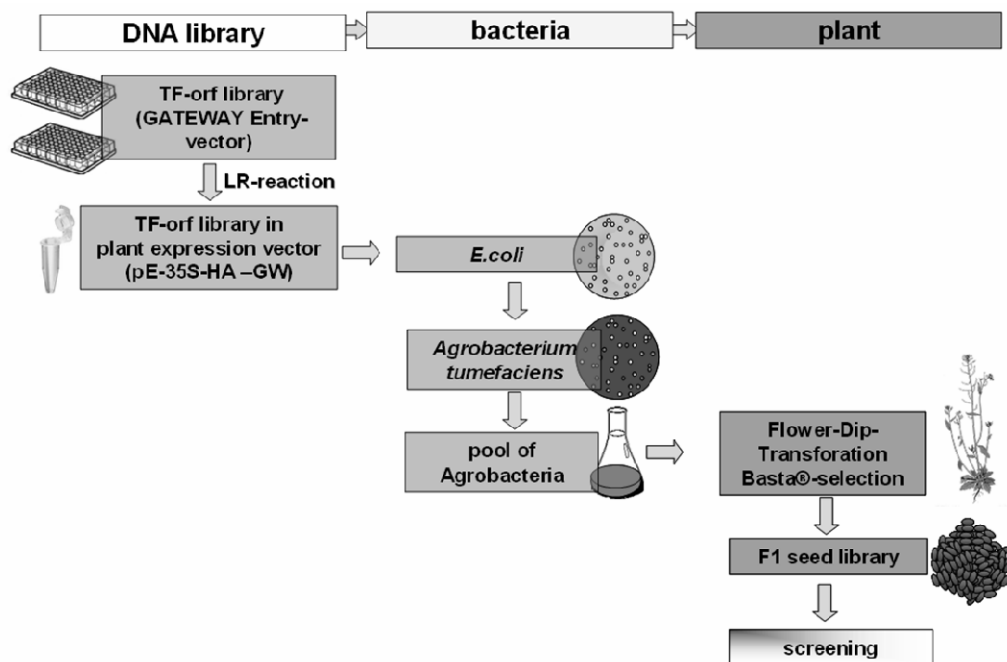


Abbildung 21: Transformationsroutine des *batch*-Verfahrens zur Herstellung der *AtTORF-EX* Samenbank (nähere Erläuterungen siehe Text).

Jeweils ca. 30 DONR-Vektoren wurden zu einer Kollektion gemischt und dann in einer LR-Reaktion in den Expressions-Vektor *pE-35S-HA-GW* übertragen. In dem *pE-35S-HA-GW*-Vektor stehen die einklonierten Transkriptionsfaktor-Sequenzen unter der Kontrolle des konstitutiven *CaMV35S*-Promotors. Ein angefügtes HA-Epitop ermöglicht eine Überprüfung der Proteinexpression mittels Western-Blott-Analyse. Der erhaltene Mix aus Expressionsvektoren wurde zunächst zur Amplifikation in *E. coli*, anschließend in *Agrobacterium tumefaciens* und schließlich die *T-DNA* durch *flower-dip* Transformation in *Arabidopsis thaliana* übertragen. Die erfolgreich transformierten Pflanzen wurden durch Behandlung mit dem Herbizid BASTA<sup>®</sup> selektioniert und die Samen der Transkriptionsfaktor-Überexpressionskollektionen gemeinsam abgeerntet. Die Anwendbarkeit der *batch*-Transformationsroutine wurde auf jeder Stufe der Transformation molekularbiologisch überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass alle

eingesetzten Transkriptionsfaktoren in der erzeugten Samenbank enthalten sind und mittels Western-Blott konnte die Expression der Transkriptionsfaktoren in den Pflanzen der Kollektion nachgewiesen werden. 4% der Transformanten der *AtTORF-EX*-Kollektion weisen eine mehrfache T-DNA-Insertion auf. Auf RNA- bzw. Proteinebene zeigten 60% bzw. 30% der Transformanten eine deutliche Expression des Transgens und 4% der Kollektion wiesen einen pleiotrophen Phänotyp auf (Weiste et al. 2007). Die *AtTORF-EX*-Kollektion ist nach Transkriptionsfaktor-Familien in kleinere Kollektionen aufgeteilt. Da für die „Ethylene-Responsive-Element-Binding“-Transkriptionsfaktoren (ERF) bei verschiedenen pilzlichen Pathosystemen eine Funktion in der Abwehr beschrieben wurde, sollte diese ERF-Kollektion der *AtTORF-EX*-Bank auf eine erhöhte Resistenz gegenüber *Verticillium* durchmustert werden (Oñate-Sánchez und Singh 2002; Libault et al. 2007).

### **3.5.2 Durchmusterung der *AtERF*-Überexpressionskollektion auf Resistenz gegen systemische Besiedelung durch *Vl43***

Das gemeinsame Merkmal der Gruppe der ERF-Transkriptionsfaktoren ist die konservierte, 60-70 Aminosäuren umfassende AP2/ERF-DNA-Bindedomäne (Nakano et al. 2006). Die 115 ERF-Überexpressionslinien umfassende Untergruppe der *AtTORF-EX*-Bank sollte auf *Arabidopsis*-Linien mit einer verbesserten Resistenz gegenüber der systemischen Kolonisation durch *Vl43* durchmustert werden. Für die Durchmusterung wurden Pflanzen unter Langtag-Regime auf Erd/Sand-Gemisch kultiviert und mittels „Wurzel-Dip“-Inokulation mit *Vl43* infiziert. Nach der Infektion wächst der Pilz in das Leitgewebe und kolonisiert von der Wurzel aus oberirdische Pflanzenteile. Durch einen Stängelkolonisations-Assay wurde die Propagation des Pilzes in den Infloreszenzstängel nachweisen (Abbildung 22). Bei dem Assay wurden 30 Tage nach Infektion *Arabidopsis*-Stängelsegmente oberflächensterilisiert und auf Pilzmedium ausplattiert. Bei Versuchen mit *Col-0* Wt-Pflanzen konnte nach 3-5 Tagen bei annähernd 100% der ausplattierten Stängelsegmente das Auswachsen von *Verticillium*-Mycel beobachtet werden. Durch die Verwendung eines *Gaussia*-Luciferase markierten *Vl43*-Reporterstamms konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem auswachsenden Mycel um

*Verticillium*-Mycel handelt (Abbildung 22). Der *Gaussia*-Luciferase-Reporterstamm wurde von Jan Utermark (Abteilung Molekulare Phytopathologie, Prof. Petr Karlovsky) zur Verfügung gestellt.

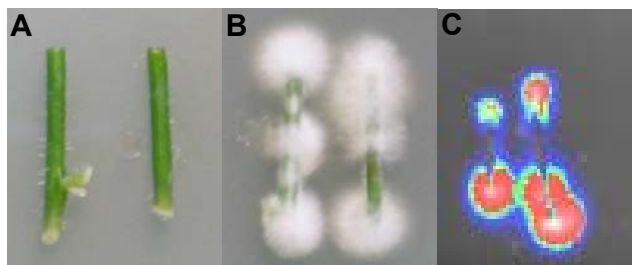


Abbildung 22: Stängelkolonisations-Assay. Ausplattierte, oberflächensterilisierte Stängelsegmente von (A) *Col-0* mock-inokulierten Pflanzen, (B) *Col-0 V143*-inokulierten Pflanzen und (C) mit einem *Gaussia*-Luciferase markierten *gLUC-V143*-Reporterstamm vier Tage nach dem Ausplattieren. Die Stängelsegmente wurden 30 Tage nach Inokulation sterilisiert und ausplattiert. Das Bild C zeigt ein Überlagerungsbild der in Falschfarben dargestellten Luciferase-Aktivität mit einem schwarz-weiß Bild. (Der *gLUC-V143*-Stamm wurde von Jan Utermark, Abteilung Molekulare Phytopathologie, Prof. Petr Karlovsky zur Verfügung gestellt)

Die ERF-Überexpressionslinien wurden mit diesem Assay nach *Arabidopsis*-Linien durchmustert, bei denen der Pilz in 30 Tagen nicht bis in den Stängel einwachsen konnte und demzufolge kein Auswachsen von *V143* Pilzmycel aus den ausplattierten Stängelsegmenten erkennbar war (Tabelle 5).

Die Samen dieser Linien wurden einzeln abgeerntet und die in diesen Linien überexprimierten ERF-Transkriptionsfaktoren mittels PCR und Sequenzierung identifiziert; diese ERF-Transkriptionsfaktoren wurden als Resistenz vermittelnde Kandidaten eingestuft. Insgesamt wurden 1288 ERF-Überexpressionslinien durchmustert. Davon zeigten 42 (3,3 %) kein Auswachsen von *Verticillium*-Mycel im Stängelsegment-Assay (Tabelle 5). Viele ERF-Gene waren unter den Kandidaten nur einfach vertreten. Trat ein Kandidat nur einmal in dem Screening auf, wurde ihm keine besondere Funktion in der Resistenz zugeschrieben, da bei dem Screening-Verfahren auch eine gewisse Anzahl an falsch positiven Kandidaten auftreten können. Traten ERF-Gene jedoch gehäuft in der Gruppe der resistenten Kandidaten auf, wurde dies als Indiz für eine Resistenz-vermittelnde Rolle dieses Transkriptionsfaktors gedeutet (Tabelle 5). Sechs der ERF-Transkriptionsfaktor-Gene tauchten zweifach oder häufiger auf. *AtERF #096 (At5g43410)* wurde sechsmal unter den resistenten Kandidaten identifiziert. *AtERF #096* gehört nach der phylogenetischen Einordnung durch *Nakano* zur Gruppe IX der ERF-Transkriptionsfaktor-Familie.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Durchmusterung der *AtERF*-Überexpressionskollektion. In der ersten Spalte ist die Häufigkeit aufgelistet, mit der ein Transkriptionsfaktor unter den resistenten Kandidaten gefunden wurde. Die Tabelle ist nach der phylogenetischen Gruppierung von Nakano sortiert (Nakano u. a. 2006). Im Screening mehrfach gefundene ERFs wurden in der Tabelle grau unterlegt.

resistente Kandidaten		Nakano <i>AtERF</i> #	Nakano Gruppe
2x	At5g13330	#113	10a
1x	At3g23220	#095	9c
6x	At5g43410	#096	9c
3x	At5g07580	#106	9b
3x	At5g51190	#105	9b
2x	At5g61590	#107	9b
1x	At5g61600	#104	9b
1x	At5g47220	#101	9a
1x	At1g80580	#084	8b
1x	At1g28160	#087	8b
1x	At5g18560	#086	8b
1x	At5g13910	#085	8b
1x	At3g20310	#083	8a
1x	At3g16770	#072	7a
1x	At1g72360	#073	7a
1x	At4g32800	#043	3e
1x	At4g25480	#031	3c
1x	At5g52020	#025	3b
1x	At4g31060	#015	2b
1x	At4g36900	#009	2a
1x	At4g06746	#007	2a
3x	At4g39780	#060	1b
1x	AT5g65130	#057	1b
1x	At3g61630	#067	6
1x	2x At4g23750	#064	6
1x	At2g40340+At5g13910	#48 + #85	4a+8b
1x	At3g60490+At5g44210	#35 + #80	3d+8a
1x	At3g60490+At4g25480	#35 + #31	3d+3c
<b>Summe resistente Pflanzen</b>		<b>% resistente Pflanzen</b>	
<b>42</b>		<b>3,3</b>	

Die resistenten Kandidaten wurden nach ihrer Zugehörigkeit zu den phylogenetischen Gruppen sortiert. Dabei wurde deutlich, dass ERF-Transkriptionsfaktoren der Gruppe IX unter den resistenten Kandidaten gehäuft vorkommen. Obwohl diese Gruppe mit 17 ERF-Genen nur 14 % der von Nakano klassifizierten 122 ERF-Gene umfasst, ist ihr Anteil an den 42 Resistenz-vermittelnden Kandidaten 40% (Abbildung 23). Dies deutet auf eine besondere Rolle dieser Gruppe bei der Resistenz gegen *V. longisporum* hin.

### J Group IX (B-3) (17 ERF)

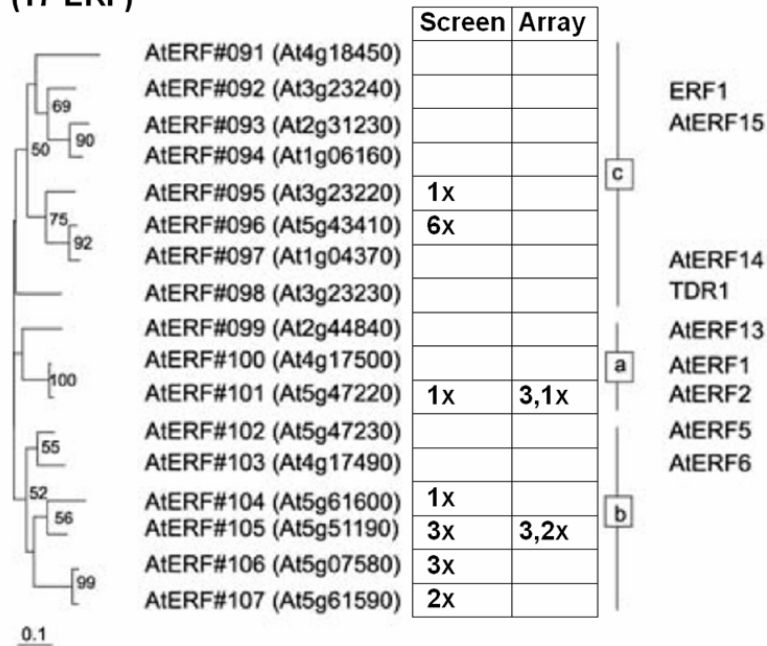


Abbildung 23: Zugehörigkeit der Resistenz-vermittelnden ERF-Kandidaten-Gene zu der phylogenetischen Gruppe IX der ERF-Transkriptionsfaktoren. In der Grafik ist unter der Spalte Screen die Anzahl der sequenzierten Kandidaten des entsprechenden AtERF-Gens aufgelistet. In der Spalte Array ist die x-fache Induktion des Transkriptionsfaktors im in dieser Arbeit durchgeführten Microarray 3 dpi (*days post infection*) aufgelistet.

### 3.6 Funktionelle Analyse von Transkriptionsfaktor-Überexpressionslinien

Anhand der großen Anzahl von 33 durch *V. longisporum* drei Tage nach Infektion in den Wurzeln differentiell exprimierten Transkriptionsfaktoren wird deutlich, dass diese maßgeblich in der Pathogenreaktion involviert sind. Neben ihrer in den Transkriptionsprofilen beobachteten Induktion, zeigten sich einige der Transkriptionsfaktor-Überexpressionslinien im *AtTORF-EX*-Screening resistent gegenüber systemischer Besiedelung durch *V. longisporum*. Um die Funktion von den im Array transkriptionell induzierten Transkriptionsfaktoren näher zu charakterisieren, wurden von einigen der induzierten Transkriptionsfaktoren Überexpressionslinien erzeugt (Tabelle 6). Für AtERF#105 und ANAC042 konnten homozygote Überexpressionslinien identifiziert werden.

**Tabelle 6: Liste der in den Wurzeln drei Tage nach VI43-Infektion differentiell exprimierten Transkriptionsfaktoren. AGI (Arabidopsis Gene Identifier), 3dpi (3 days post infection), OEX-Linien (Überexpressionslinien)**

AGI	Beschreibung/Name	3dpi	OEX-Linien	AGI	Beschreibung/Name	3dpi	OEX-Linien
<b>Zink Finger Transkriptionsfaktoren</b>				<b>ERF Transkriptionsfaktoren</b>			
At1g10170	zinc finger AtNFXL1	2,6		At1g71520	AtERF#020	2,3	
At1g14200	zinc finger	3,2	heterozygot	At5g05410	AtERF#045 DREB2A	3,7	heterozygot
At1g27730	zinc finger ZAT10	2,8		At2g40340	AtERF#048 DREB2C	3,5	heterozygot
At2g44580	zinc finger	5,6		At4g27950	AtERF#066	2,2	
At3g10815	zinc finger	2,3		At2g47520	AtERF#071	5,5	
At3g17611	zinc finger	2,5		At3g23230	AtERF#098 TDR1	2,1	
At3g18290	zinc finger EMB2454	2,8		At5g47220	AtERF#101 ERF2	3,1	heterozygot
At3g28210	zinc finger	7,1		At5g51190	AtERF#105	3,2	homozygot
At3g46080	zinc finger ZAT7	6,9		<b>WRKY Transkriptionsfaktoren</b>			
At3g46090	zinc finger ZAT7	5,3		At1g80840	WRKY40	2,3	
At4g14365	zinc finger	2,4		At3g01970	WRKY45	2,6	
At4g25380	zinc finger SAP10	4,8		At1g66600	WRKY63	3,0	
At5g04340	zinc finger CZF2	2,5		At5g13080	WRKY75	2,6	
At5g59820	zinc finger ZAT12	6,0	heterozygot	<b>NAC Transkriptionsfaktoren</b>			
At1g62975	zinc finger	-2,7		At1g01720	ANAC002 TAF1	2,5	heterozygot
<b>MYB Transkriptionsfaktoren</b>				At1g77450	ANAC032	2,1	
At1g74080	MYB122	2,3		At2g43000	ANAC042	4,2	homozygot
At3g23250	MYB15	4,8		At5g08790	ANAC081 TAF2	2,6	

### 3.6.1 Analyse von *ERF* #105 Überexpressionslinien

Der *AtERF*-Transkriptionsfaktor At5g51190 (*AtERF*#105 nach Nakano) fällt phylogenetisch in die Gruppe IXb der ERF-Transkriptionsfaktoren (Abbildung 23) und war bei der *AtTORF-EX*-Durchmusterung dreifach unter den resistenten Kandidaten vertreten. Zusätzlich zeigte das Microarray-Experiment drei Tage nach Infektion für *AtERF* #105 in den Wurzeln eine 3,2-fache Induktion der Transkription. Daher wurden unter Verwendung des pE-35S-HA-GW Destinationvektors *Arabidopsis thaliana*-Überexpressionslinien von *ERF* #105 hergestellt. Durch Segregationsanalyse der T3-Generation, bei welcher die Verteilung der BASTA<sup>®</sup>-resistenten Nachkommen analysiert wurde, konnten für die zwei unabhängigen, transgenen Linien *ERF*-105-8 und *ERF*-105-10 homozygote T2-Linien identifiziert werden.. Die Überexpressionslinien von *AtERF* #105 wiesen einen spezifischen Phänotypen auf (Abbildung 24). Dabei gab es zwischen den individuellen Linien eine Abstufung in der Ausprägung des Phänotyps. Die transgenen Linien zeigten im Vergleich zu dem WT ein etwas verringertes Wachstum. Die Blätter wiesen eine dunklere Grünfärbung auf. Als besonders auffällige Veränderung zum *Wt* wurde das Auftreten einer zelltodähnlichen Reaktion von

Blattbereichen ab 20 Tage nach Aussaat der AtERF #105-Überexpressionslinien beobachtet.

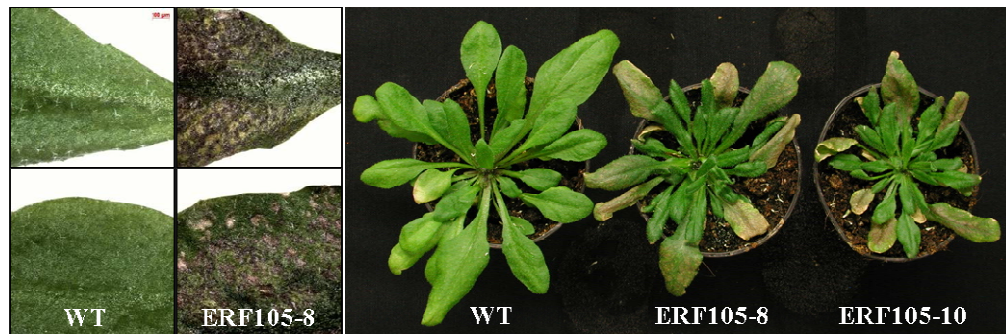


Abbildung 24: Phänotyp der Überexpressionslinien von AtERF #105. Links: stereomikroskopische Aufnahmen von nekrotischen Blättern von 35 Tage alten *ERF105-8* Überexpressionslinien im Vergleich zu Wt-Blättern. Rechts: Vergleichende Darstellung von einer Wt-Blattrosette und den Blattrosetten der zwei homozygoten Überexpressionslinien *ERF105-8* und *ERF105-10* 35 Tage nach Aussaat.

Diese nekrotischen Läsionen verstärkten sich mit dem Alter der Pflanzen und führten zu dem Absterben ganzer Blätter. Um zu überprüfen, ob die zwei homozygoten Linien durch die Überexpression von AtERF #105 resistenter gegenüber *Vl43*-Infektion sind, wurde die Propagation des Pilzes in den Spross 30 Tage nach Inokulation durch einen Stängelsegment-Assay überprüft. Für die differenzierte Auswertung der Befallsstärke wurden die in Abbildung 25 dargestellten vier Befallskategorien angewandt. Obwohl auch die Überexpressionslinien die durch *Verticillium* ausgelöste Wachstumsdepression zeigten, konnte bei ihnen verglichen mit dem WT ein geringerer Befall des Sprosses mit *Vl43* (Abbildung 25) beobachtet werden.

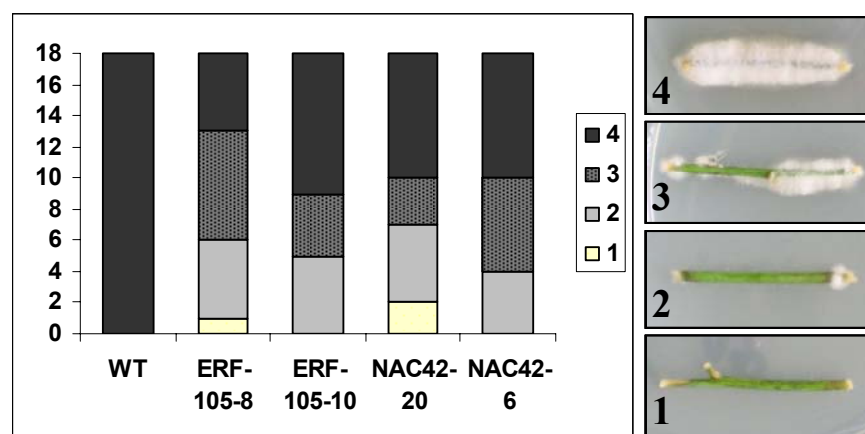


Abbildung 25: Stängelsegment-Assay zur Evaluierung der Befallsstärke verschiedener transgener *Arabidopsis* Linien mit *Vl43*. Der Graph zeigt die Einteilung von jeweils 18 untersuchten, mit *Vl43* infizierten Pflanzen pro Linie, in die rechts abgebildeten Befallskategorien 1 bis 4. Der Col-0 Wt (WT) wurde mit den transgenen Überexpressionslinien *ERF105-8*, *ERF105-10*, *NAC42-20* und *NAC42-6* verglichen.

### 3.6.2 Analyse von ANAC042 Überexpressionslinien

Auch für den NAC-Transkriptionsfaktor ANAC042 (At2g43000) wurden homozygote Überexpressionslinien erzeugt. Die selektionierten Linien *NAC42-6* und *NAC42-20* zeigten geringe phänotypische Unterschiede zu den WT Pflanzen, welche in unterschiedlich starker Ausprägung auch bei anderen ANAC042-Überexpressionslinien beobachtet wurden. Die Überexpressionslinien waren insgesamt etwas kräftiger im Wuchs, was sich durch dickere Stängel und etwas kräftigere Blätter zeigte. Die Blätter weisen vereinzelt eine leichte Violettfärbung auf. Der Transkriptionsfaktor ANAC042 wurde für den *gain of function*-Ansatz ausgewählt, da das ANAC042-Transkript in dem Microarray-Experiment drei Tage nach Infektion mit *Vl43* induziert wurde. Außerdem zeigte ANAC042 bei einer Koregulations-Analyse (Obayashi et al. 2008) eine besonders starke Korrelation zwischen ANAC042-koregulierten Genen und den im Array-Experiment induzierten Genen (Abbildung 26).

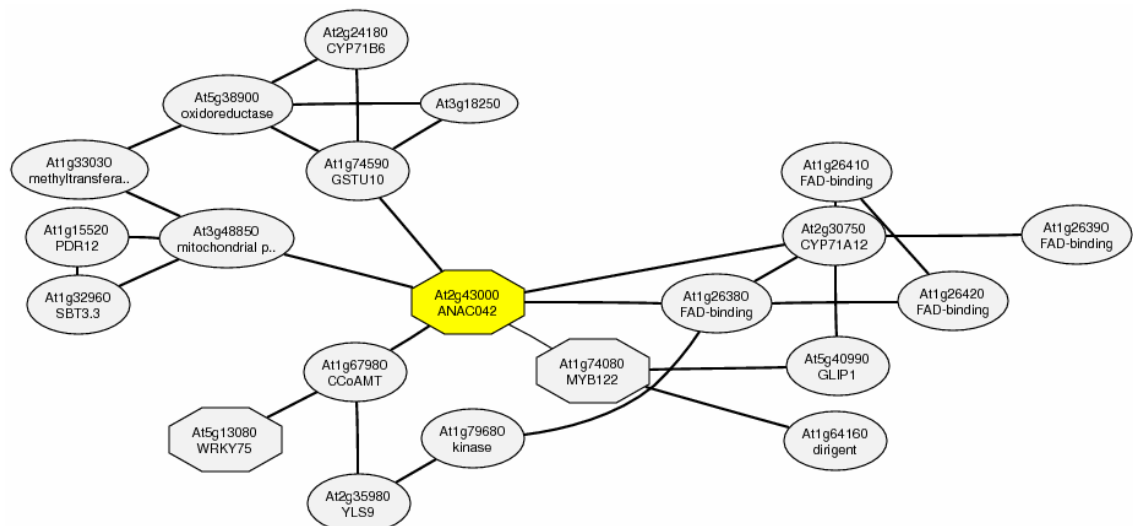


Abbildung 26: ATTED-II Koexpressions-Diagramm für ANAC042 (Obayashi et al. 2008). Die Transkripte mit direkten Verbindungen zu ANAC042 zeigen einen besonders hohen Grad an Koregulation.

Eine direkte oder indirekte Regulation dieser koregulierten Gene durch ANAC042 wurde postuliert und sollte mittels qRT-PCR für zwei dieser Gene überprüft werden (Abbildung 27). Außerdem wurde für die homozygoten Linien *NAC42-6* und *NAC42-20* entsprechend den *AtERF #105*-Linien eine erhöhte Resistenz gegen die Propagation von *Vl43* in den Sprosstängel gezeigt (Abbildung 25).



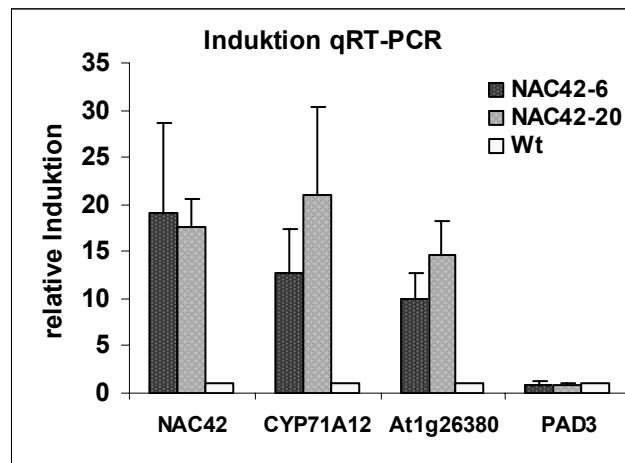


Abbildung 27: Darstellung der zur Wt-Transkription ins Verhältnis gesetzten relativen Expression von ANAC042, CYP71A12, At1g26380 und PAD3. Die Transkription wurde mittels qRT-PCR für Wurzelgewebe der Überexpressionslinien NAC42-6, NAC42-20 sowie dem Wt ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der auf die Expression des Wt normierten  $\Delta\Delta\text{CT}$  Werte aus zwei biologischen Replikaten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der  $\Delta\Delta\text{CT}$  Werte der zwei Replikate.

Sowohl für die Cytochrom P450-Monooxygenase CYP71A12 als auch für das FAD-bindende-Protein At1g26380 konnte durch qRT-PCR in den Überexpressionslinien von ANAC042 eine konstitutive, transkriptionelle Induktion nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde das nicht in dem Koregulations-Netzwerk von ANAC042 enthaltene Gen *PAD3* untersucht. Dieses zeigte keine transkriptionelle Induktion in den ANAC042-Überexpressionslinien. Die Koexpressions-Analyse anhand der ATTED-II-Datenbank führte demnach zu der Identifikation von Transkriptionsfaktor-Zielgenen. Ob diese Transkripte durch direkte Promoterbindung oder durch einen indirekten Effekt induziert wurden, lässt sich nicht sagen. Weitere Gene des ANAC042 Koexpressions-Netzwerkes, wie MYB122, GSTU10 und CCoAMT, wurden drei Tage nach Infektion mit *V. longisporum* in dem Wurzelarray transkriptionell induziert. Ob diese in den NAC042-Überexpressionslinien konstitutiv induziert sind, wurde bisher nicht überprüft. Insgesamt lässt sich schließen, dass ANAC042 mit im Array induzierten Transkripten koreguliert ist, die Überexpression von ANAC042 eine erhöhte Resistenz gegenüber *V. longisporum* Besiedelung auslöst und zwei der koregulierten Transkripte in den Überexpressionslinien konstitutiv exprimiert werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Infektion von *A. thaliana* mit *V. longisporum* führt zu einer schnellen transkriptionellen Reprogrammierung und der Induktion von wurzelspezifischen Abwehrgenen

Eines der zentralen Ziele dieser Dissertation war es, genetische Determinanten der frühen Interaktion von *V. longisporum* und *A. thaliana* zu identifizieren. Für die Identifizierung von *Vl43*-responsiven Genen kamen zwei experimentelle Systeme zur Anwendung. Zum einen wurde eine Luciferase-Promoter-Trap-Kollektion (Alvarado et al. 2004) nach *Vl43*-induzierbarer Luciferase-Aktivität durchmustert. Zum anderen wurden in einem Microarray-Experiment die ein und drei Tage nach *Vl43*-Infektion in der Wurzel differentiell regulierten Transkripte identifiziert. Dabei zeigte sich, dass das für diesen Zweck etablierte, sterile *in vitro*-Infektionssystem gut für die Untersuchung von Abwehrreaktionen der Wurzel geeignet ist, da es einfach zu handhaben ist und eine hohe Reproduzierbarkeit der transkriptionellen Daten ermöglicht. Das *in vitro*-Infektionssystem eignet sich jedoch nicht für die Untersuchung der durch *Verticillium*-Infektion ausgelösten Krankheitssymptome, da die Pflanzen in dem *in vitro*-System nicht bis zum für das Auftreten der Symptome erforderlichen Entwicklungsstadium kultiviert werden können. Die Untersuchung der frühen Reaktion der Wurzel auf *Vl43*-Infektion wurde aufgrund von mikroskopischen Untersuchungen auf die Zeitpunkte ein und drei Tage nach Inokulation festgelegt.

Während aus dem Array-Experiment hervorgeht, dass es in den Wurzeln durch *V. longisporum*-Infektion drei Tage nach Infektion zu einer differentiellen Expression von knapp 500 Transkripten kommt, konnte unter den 40.000 durchmusterten Promoter-Trap-Linien keine *V. longisporum*-responsive Luciferase-Linie mit reproduzierbarer Reporteraktivität identifiziert werden.

Da nach den statistischen Berechnungen die Promoter-Trap-Kollektion knapp ein Fünftel der *Arabidopsis*-Gene abdeckt und laut Array ca. 500 Transkripte drei Tage nach Infektion induziert werden, müssten ca. 100 *Verticillium*-responsive Gene unter den Luciferase-getaggten Linien der Promoter-Trap-Kollektion enthalten sein. Mit der in der Arbeit durchmusterten Stichprobe von 40.000 Pflanzen wurde eine 86-prozentige

Sättigung des Screenings erreicht. Danach hätten in der Stichprobe zumindest einige durch *Verticillium* induzierbare Reporter-Pflanzen enthalten sein müssen. Wahrscheinlich ist das Luciferase-Imaging nicht sensitiv genug, um eine mit dem Array vergleichbare Anzahl an induzierten Transkripten zu erhalten. Zum anderen könnte die für die Berechnung zugrunde gelegte Frequenz an funktionellen Reporter-Insertionen von 15,8% der Kollektion zu hoch sein (Alvarado et al. 2004).

Die Analyse der Transkriptionsprofile von *A. thaliana*-Wurzeln ein und drei Tage nach *V. longisporum*-Infektion zeigt eine deutliche Induktion von Transkripten der biotischen Stressantwort. Ein Vergleich der induzierten Transkripte mit Daten anderer Pathosysteme ist schwierig, da es zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit keine publizierten Daten von Pathogen-induzierten Transkriptionsprofilen aus Wurzelgewebe gab. Es wurden zwar molekulargenetische Untersuchungen der *A. thaliana*-Interaktion mit den wurzelbürtigen Pilzen *F. oxysporum* (Berrocal-Lobo und Molina 2008), *Verticillium ssp.* (Fradin und Thomma 2006) und *Rhizoctonia solani* (Okubara und Paulitz 2005), dem wurzelbürtigen Bakterium *Ralstonia solanacearum* (Hu et al. 2008) und dem wurzelbürtigen Oomyceten *Phytophthora irregularis* (Staswick et al. 1998) durchgeführt, diese befassen sich aber nicht mit der frühen transkriptionellen Reaktion in der Wurzel.

Für das *V. longisporum* - *A. thaliana* Pathosystem wurden von Hella Tappe (2008) zwei Transkriptionsprofile von oberirdischen Pflanzenteilen erstellt, welche die transkriptionelle Veränderung im Stadium einer bereits etablierten vaskulären Besiedelung durch *VI43* fünf bzw. 18 Tage nach Infektion adressieren. Ein Vergleich dieser zwei Transkriptionsprofile mit denen der vorliegenden Arbeit ergab nur eine geringe Zahl an koregulierten Genen. Eine deutliche Korrelation der Datensätze wäre auch nicht zu erwarten, da die frühen Prozesse in der Wurzel noch den pre-vaskulären Infektionsprozess widerspiegeln, während zu späteren Zeitpunkten in dem Sproßgewebe eine etablierte vaskuläre Besiedelung vorliegt. Die spezifischen transkriptionellen Antworten, mit denen *Arabidopsis* in diesen zwei Infektionsstadien auf *VI43*-Infektion reagiert, verdeutlichen die grundsätzliche Verschiedenheit des vaskulären und pre-vaskulären Infektions-Stadiums.

Allgemein stammen die umfangreichen Erkenntnisse über Abwehrreaktionen in Pflanzen aus Analysen von oberirdischem Pflanzengewebe (Okubara und Paulitz 2005).

Die für Pathogen-Interaktionen in Blättern häufig beobachtete Induktion der Markergene einer SA-abhängigen oder der JA- und ET-abhängigen Abwehr (Glazebrook 2005) werden in der Wurzel nach *Vl43*-Infektion nicht induziert. Weder PR1 als Marker von SA-Signalen noch PDF1.2 als Marker für Ethylen- und Jasmonsäure-Signale wurden nach *Vl43*-Infektion differentiell exprimiert. Das VSP2-Gen, welches auch als Markergen für JA-abhängige Transkription gilt (Utsugi et al. 1998), wie auch ein PR1-like Gen wurden einen Tag nach *Vl43*-Infektion sogar reprimiert. Ebenso fand keine Induktion von JA- und SA-Synthesegenen statt. Die klassischen, mit Pathogenabwehr assoziierten Hormonsignale scheinen bei der frühen pre-vaskulären Abwehr in dem *Vl43-Arabidopsis*-Pathosystem keine bedeutende Rolle zu spielen.

Die Analyse der in den Wurzeln ausgelösten Abwehrreaktion deutet vielmehr auf die Induktion von Komponenten einer möglicherweise PAMP-abhängigen Basis-Resistenz hin. Der Vergleich der *Vl43*-induzierten Transkripte des Drei-Tage-Zeitpunktes mit den im Sproßgewebe PAMP-induzierten Transkriptionsprofilen durch Ef-Tu oder Chitin zeigte eine deutliche Koregulation bei über 50% der Transkripte (Zipfel et al. 2006). Die transkriptionell induzierten Gene kodieren unter anderem für Rezeptorproteine, Komponenten der Signalweiterleitung, wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktions-Komponenten und Transkriptionsfaktoren, sowie für antifungale Proteine der Pathogen-Abwehr oder für Synthesenzyme antibiotischer Sekundärmetabolite. Die Induktion von ausgewählten Vertretern der induzierten Gen-Klassen konnte durch qRT-PCR in mehrfachen biologischen Replikaten verifiziert werden. Dies unterstreicht die Verlässlichkeit der erhobenen Microarray-Daten.

Im Folgenden wird die Bedeutung von einzelnen, im Array-Experiment induzierten Transkripten für die Pathogenabwehr besprochen. Unter den *Vl43*-induzierten Transkripten finden sich vier noch nicht näher charakterisierte Membranrezeptoren der *TIR-NBS* Klasse. Viele TIR-NBS-Proteine wurden als Resistenzfaktoren identifiziert (Belkhadir et al. 2004). Möglicherweise kann die Pflanze bestimmte *Verticillium*-Effektoren über diese Rezeptorproteine wahrnehmen.

Unter den drei Tage nach *Vl43*-Infektion differentiell exprimierten Transkripten waren auch zwölf Komponenten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion vertreten. Calcium-vermittelte Signalprozesse sind ein wichtiger Bestandteil der Pathogenabwehr (Reddy und Reddy

2004; Lecourieux et al. 2006) und werden durch transiente Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Zellkompartimenten ausgelöst (Lecourieux et al. 2006). Der Fluss von  $\text{Ca}^{2+}$  über die Zellmembranen unterliegt der Regulation durch Calcium-Kanäle,  $\text{Ca}^{2+}$ -transportierenden ATPasen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Antiportern. Die Informationen aus transienten Veränderungen der Calcium-Konzentration werden durch die Vermittlung von  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden-Proteinen zu sich anschließenden Signalkaskaden weitergeleitet (Sanders et al. 2002). Durch *Vl43* wurden die Transkripte von zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportern (ACA12 und ACA13), einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Natrium-Antiporter (CAX7), vier Calmodulin-ähnlichen-Proteinen (CML37, AtCAL4, CML34 und ACP1), sowie sechs  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden EF-Hand-Proteinen induziert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Pumpen ACA12 und ACA13 sowie der CAX7  $\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter transportieren Calcium-Ionen über Membranen und könnten bei der Auslösung eines *Vl43*-induzierten Calcium-Signals beteiligt sein (Shigaki et al. 2006; Baxter et al. 2003). Die Calcium-bindenden Calmodulin-ähnlichen und EF-Hand-Proteine können  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale an Signalketten weiterleiten (McCormack et al. 2005; Ito et al. 1995; Vanderbeld und Snedden 2007).  $\text{Ca}^{2+}$  kann die Aktivität von Proteinen auch direkt beeinflussen. Nach *Vl43*-Infektion wird beispielsweise die NADH-Dehydrogenase NDB2 transkriptionell induziert, deren Aktivität calciumabhängig ist (Geisler et al. 2007). Eine calciumabhängige Signaltransduktion ist offenbar ein Bestandteil der nach *Vl43*-Inokulation ausgelösten Abwehrreaktion von *Arabidopsis*-Wurzeln.

Als Bindeglied zwischen Signalkaskaden und Genexpression stehen die DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren (Riechmann et al. 2000). In der Wurzel wurde nach *Vl43*-Infektion eine große Zahl an Transkriptionsfaktoren induziert. Im Abschnitt 4.3 (Seite 104) werden die Transkriptionsfaktoren detailliert diskutiert.

Neben den Bestandteilen der Signalperzeption und Weiterleitung werden in der Wurzel auch Proteine mit direkten Abwehrfunktionen transkriptionell induziert. Es kommt beispielsweise zu der Induktion von sechs extrazellulären Chitinasen, was auf eine gezielte Abwehrreaktion gegen die Pilzinfektion hindeutet (Passarinho und de Vries 2002; Kasprzewska 2003). Auch die induzierten Protease-Inhibitoren und das Polygalacuronase Inhibiting Protein1 (PGIP1) sind Komponenten einer typischen Abwehrreaktion von *A. thaliana* auf die Penetration eines Pilzes (Ferrari et al. 2003; Valueva und Mosolov 2004). Bei der Infektion von Pflanzen setzen Pilze

zellwandabbauende Polygalacturonasen und Proteinasen ein. Proteinase-Inhibitoren und das PGIP1 dienen wahrscheinlich dazu, diesen enzymatischen Angriff abzuwehren (Valueva und Mosolov 2004).

Das drei Tage nach Infektion am stärksten induzierte Transkript mit einer 13-fachen Induktion kodiert für die Alternative-Oxidase 1D (AOX1D) (Clifton et al. 2006). Unter den etwas schwächer induzierten Genen findet sich auch die AOX1A mit einer siebenfachen Induktion. Die mitochondriale Elektronen-Transportkette wird durch die Funktion von alternativen Oxidasen abgekürzt, wodurch die Energieausbeute des Elektronentransportes sinkt, gleichzeitig aber auch weniger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entsteht. Die AOX-Proteine gelten daher als Marker für oxidativen Stress in der Zelle und deren Induktion als Schutzmechanismus dagegen (zur Übersicht siehe Arnholdt-Schmitt et al. 2006). Die deutliche Induktion von AOX1D und AOX1A könnte auf einen durch die *Vl43*-Infektion ausgelösten oxidativen Stress in der Wurzel hindeuten.

Die Pathogen-induzierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies kann durch die Aktivität von Atroboh-NADPH-Oxidasen oder durch Peroxidasen generiert werden (zur Übersicht siehe Apel und Hirt 2004). Peroxidasen katalysieren die Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indem sie Elektronen von Donormolekülen, wie phenolischen Substanzen, Ligninvorstufen, Auxin oder sekundären Metaboliten übertragen (Hiraga et al. 2001). Außerdem können native Peroxidasen zu Oxyferro-Peroxidasen reagieren, welche zur Bildung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beitragen (Passardi et al. 2004). In dem Array zeigten drei Tage nach *Vl43*-Infektion zehn Peroxidasen eine transkriptionelle Induktion. Unter diesen Peroxidasen ist PER52 (At5g05340) enthalten. In der Dissertation von Saskia Floerl (2008) wurden *Vl43*-induzierte Proteine aus apoplastischer Waschlösung von *A. thaliana* identifiziert, von denen PER52 eines der am stärksten induzierten Proteine war (Floerl 2008). Floerl konnte in dem *Arabidopsis*-Apoplasten auch eine erhöhte Peroxidase-Aktivität nach *Vl43*-Infektion nachweisen. Die genaue Funktion der *Vl43*-induzierten Peroxidasen ist bisher jedoch noch nicht geklärt.

Auch die Funktion der nach *Vl43*-Infektion induzierten „Germin-like Proteins“ (GLPs) ist bisher noch nicht aufgeklärt. Verschiedene Beobachtungen lassen auf eine Funktion der GLPs in Abwehrreaktionen schließen (Lane 2002). Zum einen werden eine Vielzahl von GLPs durch biotische Stressbedingungen induziert, zum anderen führt die

Überexpression von einigen GLPs zu einer verbesserten Resistenz bzw. ihr *knock out* zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Pathogenbefall (Zimmermann et al. 2006; Lane 2002; Manosalva et al. 2009). Wahrscheinlich sind die GLPs in der Zellwand und im Apoplasten lokalisiert und einige von ihnen sind durch ihre Superoxid-Dismutase-Aktivität an der Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beteiligt (Christensen et al. 2004; Godfrey et al. 2007; Zimmermann et al. 2006).

Als weitere, generell bei biotischem Stress häufig aktivierte Gene sind verschiedene Vertreter der Glutathion-S-Transferasen (GSTs) nach *Verticillium*-Infektion transkriptionell induziert. GSTs haben eine Funktion bei der Entgiftung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Xenobiotika, sowie bei der Akkumulation von Anthozyanen (Rouhier et al. 2006).

Abschließend ergibt sich aus der allgemeinen Analyse der Transkriptionsprofile von *A. thaliana*-Wurzelgewebe der Zeitpunkte ein und drei Tage nach *Vl43*-Infektion das Bild einer deutlichen Induktion von Abwehrgenen.

#### **4.2 Die Induktion von antimikrobiellen Sekundärstoffwechsel-Produkten in der *Arabidopsis*-Wurzel trägt zur Resistenz gegenüber *V. longisporum*-Infektion bei**

Sekundäre Pflanzenstoffe sind Produkte des pflanzlichen Stoffwechsels, welche nicht dem Grundstoffwechsel zugeordnet werden. Dabei ist die Unterscheidung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel teilweise nicht eindeutig abzugrenzen, da die sekundären Pflanzenstoffe aus Produkten des Primärstoffwechsels hervorgehen. Ein großer Anteil der sekundären Pflanzenstoffe, wie beispielsweise Terpene, Alkaloide oder Glucosinolate, haben eine Schutz- bzw. Signalfunktion bei der Interaktion mit der belebten Umwelt der Pflanze. Aber auch beim Schutz gegen abiotischen Stress und bei der Festigung von Zellstrukturen übernehmen Sekundärmetabolite wichtige Funktionen. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Transkriptionsprofile der Wurzeln wurden auf die transkriptionelle Induktion von Stoffwechselwegen von Sekundärmetaboliten untersucht. In dem Transkriptionsprofil des Drei-Tage-Zeitpunktes nach *Vl43*-Infektion sind elf Gene von Cytochrom-P450-Monooxygenasen und vier Gene von UGT-Glycosyltransferasen transkriptionell induziert (Werck-Reichhart et al. 2002; Bowles et al. 2005). Diese Enzyme übernehmen wichtige Syntheseschritte im Sekundärmetabolismus (Werck-Reichhart et al. 2002; Gachon et al. 2005). Zusätzlich sind einen Tag nach Infektion zwei homologe Transkripte induziert, welche für eine

1,8-Cineol-Monoterpen-Synthase (AtTPS-CIN) kodieren (Chen et al. 2004). Die AtTPS-CINs zeigen eine wurzelspezifische Expression und führen zu der Synthese des Volatiles 1,8-Cineol. Möglicherweise übernimmt dieses Monoterpen spezifische Signalfunktionen in der Rhizosphäre (Chen et al. 2004). Des Weiteren sind drei Tage nach Infektion zwei Gene des Phenylpropan-Stoffwechsels induziert: die Caffeoyl-CoA 3-O-Methyltransferase (CCoAOMT) und eine putative Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (At5g19440). Die CCoAOMT, COMT und CAD katalysieren essentielle Syntheseschritte der Monolignol-Bildung (Abbildung 28). Die aus Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol hervorgehenden Monolignole (H-, G- und S-Einheiten) sind die Grundbausteine, aus denen das polymere Lignin aufgebaut ist.

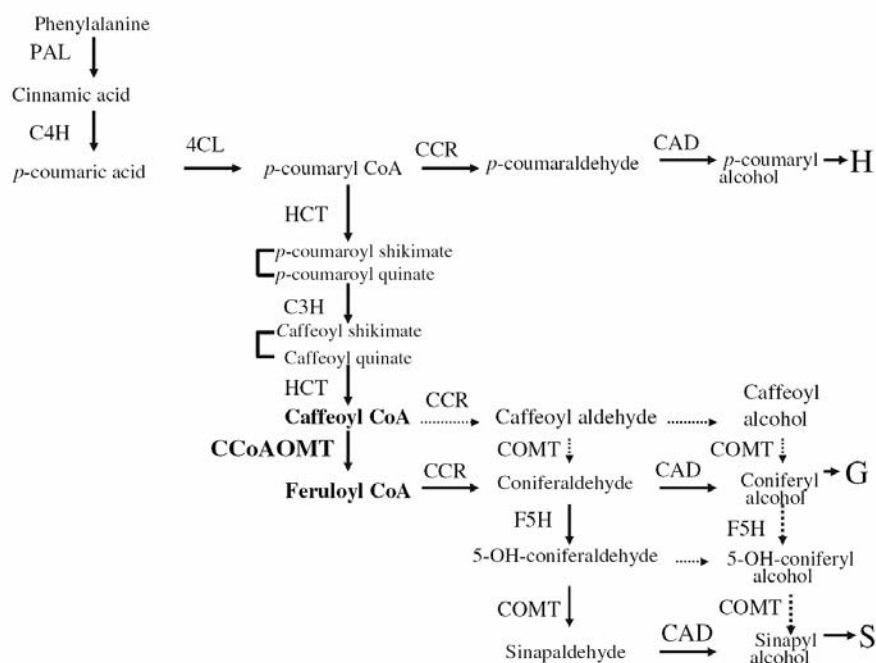


Abbildung 28: Übersicht über den von Do und Kollegen (2007) vorgeschlagenen Syntheseweg von Monolignolen. Abbildung aus (Do et al. 2007). Die zentrale Funktion von CCoAOMT und CAD bei der Synthese von den Monolignol-Ausgangssubstanzen Coniferyl-Alkohol (G) und Sinapyl-Alkohol (S) wird dargestellt. Die Funktion von CCoAOMT und COMT ist obligatorisch bei der Synthese von G- und S-Monolignin-Komponenten. Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenasen katalysieren den finalen Schritt in der Monolignol-Synthese. Aus den Vorstufen der Monolignol-Untereinheiten p-Coumaroyl-Alkohol, Coniferyl-Alkohol und Sinapyl-Alkohol werden die H-, G- und S-Grundbausteine von Lignin gebildet. Die in der Abbildung dargestellten Enzyme sind: Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase (CCoAOMT), Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid O-Methyltransferase (COMT), Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H), Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase (CAD), Cinnamoyl CoA Reductase (CCR), p-Cinnamate 3-Hydrolase (C3H), 4-Coumarate CoA Ligase (4CL), Ferulate 5-Hydroxylase (F5H), p-Hydroxycinnamoyl-CoA:Quinate Shikimate p-Hydroxycinnamoyltransferase (HCT), Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL)

Das makromolekulare Lignin ist ein in der Pflanzenzellwand eingelagerter Stoff, der zur Festigung von Pflanzengewebe beiträgt. Die transkriptionelle Induktion von Genen der



Ligninsynthese deutet auf eine durch *V. longisporum*-Infektion in der Wurzel ausgelöste Verstärkung der Zellwände hin. Eine ligninabhängige Verstärkung der Zellwand kann auch durch die Vernetzung von bereits vorhandenem Lignin durch die Aktivität von Peroxidasen erfolgen. Unter Nutzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> können Peroxidasen aus Monolignolen Phenoxy-Radikale generieren, die dann spontan zu Ligninpolymeren vernetzen (zur Übersicht siehe Passardi et al. 2004). Die durch *VI43*-Infektion induzierten Peroxidasen könnten bei der Lignifizierung der Zellwand beteiligt sein.

Möglicherweise ist die Induktion von weiteren Enzymen der Ligninsynthese (siehe Abbildung 28) in der Array-Analyse aus technischen Gründen nicht detektiert worden, diese könnte aber in weitergehenden Untersuchungen mittels qRT-PCR überprüft werden. Die Verstärkung der Zellwand durch Pathogen-induzierte Ablagerung von Lignin ist eine für andere Pathogen-Interaktionen schon dokumentierte Komponente der Pflanzenabwehr (zur Übersicht siehe Hückelhoven 2007). Die Ausbildung von lignin- und kallosehaltigen Zellwandappositionen kann die Penetration der Zellwand durch Pilzhyphen stoppen. In genetischen Studien zeigten transgene *Einkorn*-Pflanzen (*Triticum monococcum*), in denen verschiedene Enzyme der Monolignol-Synthese durch RNAi reduziert wurden, eine verringerte Ablagerung von phenolischen Zellwandappositionen an Infektionsstellen, sowie eine verringerte Basis- und Nichtwirts-Resistenz gegenüber dem Gerste-Mehltau *Blumeria graminis f. sp. tritici* und dem inkompatiblen Mehltau *B. graminis f. sp. hordei* (Bhuiyan et al. 2008).

Neben den Enzymen des Phenylpropan-Stoffwechsels wurde in den Wurzeln sowohl einen wie auch drei Tage nach *VI43*-Inokulation eine deutliche Induktion der Transkripte des Camalexin-Biosyntheseweges festgestellt. In der anschließend mit Wurzelmaterial aus einem Zeitreihenexperiment durchgeführten biochemischen Analyse (Stefanie Goetze, AG Prof. Feußner) konnte eine deutliche Camalexin-Akkumulation zwischen zwei und zehn Tagen nach Infektion nachgewiesen werden. Das von Tryptophan abstammende Indol-Alkaloid Camalexin (3-thiazol-2'-yl-indole) ist das in *A. thaliana* wichtigste Phytoalexin, dessen Bildung durch eine Vielzahl von Pathogenen induziert wird (zur Übersicht siehe Glawischnig 2007). Phytoalexine sind niedermolekulare, antimikrobielle Sekundärmetabolite, welche nach der Infektion von Pflanzen lokal in dem Bereich der Infektionszone neu synthetisiert werden (Pedras et al. 2000). In uninduzierten Pflanzen werden Phytoalexine nicht gebildet. Die

grundlegenden Schritte der Biosynthese von Camalexin wurden in den letzten Jahren aufgeklärt (zur Übersicht siehe Glawischnig 2007).

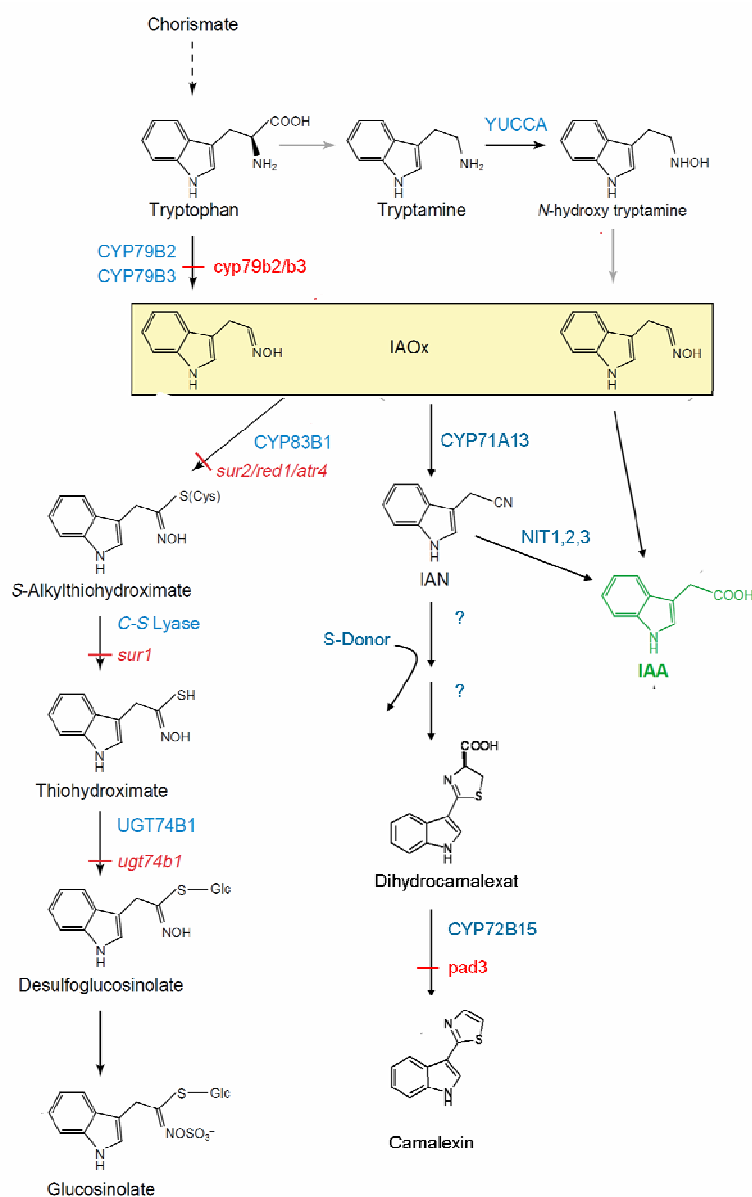


Abbildung 29: Übersicht über die von Tryptophan abstammenden, über den IAOx Pool synthetisierten Sekundärmetabolite. Abbildung abgeändert nach (Grubb und Abel 2006). Die Synthesewege von Indol-Glucosinolaten, von Camalexin und von Auxin (IAA) gehen aus dem gemeinsamen Indol-3-Acetaldoxim (IAOx)-Pool hervor. Der Glucosinolat-Syntheseweg ist auf der linken Seite, die Camalexin-Synthese in der Mitte und die Abzweigung zur Auxin-Synthese vom IAOx ist auf der rechten Seite dargestellt. Die beteiligten Enzyme sind blau, die bekannten Mutanten der Synthesewege rot gekennzeichnet. S-Donor bedeutet in der Darstellung die Notwendigkeit eines Donors von aktiviertem Schwefel für die Synthese von Dihydrocamalexat.

Im ersten Schritt der Camalexin-Synthese wird Tryptophan durch die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP79B2 zu Indole-3-Acetaldoxim (IAOx) umgesetzt. IAOx dient als Zweigstelle für verschiedene Metabolite des Sekundärmetabolismus (Abbildung 29).

Von IAOx zweigt neben der Camalexin-Synthese auch die Synthese von Indol-Glucosinolaten und die durch die Nitrilasen NIT1,2,3 katalysierte Synthese von Auxin ab (Grubb und Abel 2006; Vorwerk et al. 2001).

Den von IAOx abzweigenden Syntheseschritt in Richtung Camalexin katalysiert die P450-Monooxygenase CYP71A13, welche IAOx zu Indol-3-Acetonitril (IAN) umsetzt (Nafisi et al. 2007). Die anschließende Synthese von Camalexin verläuft über ein noch nicht identifiziertes Zwischenprodukt zu Dihydrocamalexat (Schuhegger et al. 2006) und schließlich durch CYP71B15 (PAD3) zu Camalexin. Die Aufklärung dieses letzten Syntheseschritts wurde durch die Identifizierung der Mutante *phytoalexin-deficient-3* (*pad3*), welche kein Camalexin mehr akkumuliert, aufgeklärt (Glazebrook und Ausubel 1994). Durch Untersuchungen der *pad3*-Mutante konnte gezeigt werden, dass Camalexin eine entscheidende Abwehrfunktion gegen verschiedene nekrotrophe Pilze übernimmt. Besonders für die Abwehr von *Botrytis cinerea* und *Alternaria brassicicola* wurde es als essentielle, unabhängig von Salizylsäure, Ethylen und Jasmonsäure induzierte Abwehrkomponente beschrieben (Thomma et al. 1999; Ferrari et al. 2007). Camalexin wird zwar auch durch das biotrophe Bakterium *Pseudomonas syringae* induziert, trägt in diesem Pathosystem aber nicht zur Resistenz bei (Glazebrook und Ausubel 1994).

Die durch *V143* in den Wurzeln induzierten Transkripte umfassen sowohl die Camalexin-Synthesegene CYP79B2, CYP71A13 und CYP71B15, wie auch die Tryptophan-Synthesegene ASA, ASB, TSA1 und PAT1. Es kommt also zu einer koordinierten Induktion der Enzyme des Camalexin-Syntheseweges, sowie der transkriptionellen Induktion der Synthese des Ausgangssubstrates Tryptophan. Für die Induktion von Camalexin durch *B. cinerea*-Infektion konnte gezeigt werden, dass die Camalexin-Synthese durch eine MAP-Kinase-Kaskade reguliert wird. Dabei ist die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade MPK9-MPK3/MPK6 zur Induktion der Camalexin-Synthese ausreichend (Qiu et al. 2008; Ren et al. 2008; Xu et al. 2008). Die koordinierte Induktion der Camalexin-Synthesegene wird wahrscheinlich über eine MAP-Kinasen vermittelte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erreicht. Für die drei eng verwandten Transkriptionsfaktoren MYB51, MYB122 und MYB34 wurde eine regulatorische Funktion bei der Synthese der vom IAOx abstammenden Indolderivate nachgewiesen (Celenza et al. 2005; Gigolashvili et al. 2007). Dabei dient der IAOx-

Pool als Substrat für die Synthese von Auxin, Indol-Glucosinolaten und Camalexin (Abbildung 29). Die Kontrolle über die Verteilung des IAOx-Pools wird scheinbar durch die Induktion von Schlüsselenzymen der verschiedenen Synthesewege reguliert. Die Expression von MYB34 und MYB51 führt unter anderem durch Induktion von CYP83B1 zu einem Fluss des IAOx in die Synthese von Indol-Glucosinolaten. Durch Mutanten-Analysen verschiedener Überexpressions- und *knock out*-Mutanten der MYB-Transkriptionsfaktoren, sowie der Schlüsselenzyme CYP83B1 und CYP79B2/B3 wurde gezeigt, dass über den Status des IAOx-Pools durch Rückkopplungs-Reaktionen die Synthese von Indol-Glucosinolaten, Auxin und Camalexin beeinflusst wird (zur Übersicht siehe Grubb und Abel 2006).

In dieser Arbeit konnte für MYB122 drei Tage nach *V143*-Infektion eine zweifache transkriptionelle Induktion gezeigt werden. Möglicherweise trägt die verstärkte MYB122-Transkription über die Induktion der Camalexin-Synthese-Enzyme zu der beobachteten Akkumulation von Camalexin bei.

Die Induktion des CYP79B2-Transkriptes konnte mit einer vierfachen Induktion im Array, in zeitlicher Auflösung im Zeitreihen-Experiment mittels qRT-PCR, sowie durch die in den Wurzeln induzierte Luciferase-Aktivität in Luciferase-Reporter-Pflanzen gezeigt werden. Die Aktivität des Luciferase-Reporters ist lokal auf den Bereich begrenzt, in dem die Wurzel in direktem Kontakt mit dem Pilz steht. Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass die Camalexin-Synthese sehr lokal stattfindet. Wenn diese Beobachtung für alle im Array induzierten Transkripte gilt, könnte die allgemein in der qRT-PCR beobachtete, im Zeitverlauf der Infektion ansteigende Induktion der Transkripte durch eine fortschreitende Besiedelung der Wurzel ausgelöst werden. Die ansteigenden Transkriptmengen würden also nicht eine Verstärkung der lokalen Induktion bedeuten, sondern eine Vergrößerung der vom Pilz befallenen Wurzelfläche. Die für die CYP79B2-Luciferase-Reporter-Pflanzen beobachtete lokale Induktion müsste für weitere Luciferase-Fusionen anderer im Array induzierter Gene überprüft werden. Reporter-Pflanzen für CYP71A13, PER5 (At1g14550) und T7F6.4 (At2g38870) wurden bereits erstellt, konnten aus Zeitmangel jedoch nicht mehr im Rahmen der Promotion untersucht werden.

Die Umwandlung von Tryptophan zu IAOx wird durch die zwei Isoenzyme CYP79B2 und CYP79B3 katalysiert. Aus Expressionsdaten geht hervor, dass bei der Induktion der

Camalexin-Synthese nur CYP79B2, bei der Synthese von Indol-Glucosinolaten dagegen CYP79B3 induziert wird (Glawischnig et al. 2004). In den Wurzel-Arrays konnte keine durch *Vl43*-induzierte CYP79B3-Transkription nachgewiesen werden. Auch das Schlüsselenzym für den ersten Syntheseschritt in Richtung Indol-Glucosinolaten (CYP83B1) wird nicht durch *Vl43* induziert. Daher scheint Camalexin der primäre über den IAOx-Pool synthetisierte Metabolit zu sein, obwohl CYP83B1 in Wurzeln auch ohne Pathogenstimulus einen hohen konstitutiven Transkriptlevel zeigt (Bednarek et al. 2005). Vielleicht liegt in den Wurzeln eine konstitutiv ablaufende Indol-Glucosinolat-Synthese vor.

Möglicherweise kommt es auch zu einer geringen Induktion der Auxin-Biosynthese, da die Transkription der Nitrilase 2 (NIT2) drei Tage nach Infektion leicht induziert ist. Es ist unklar, ob dies ein direkter Effekt ist oder durch eine Rückkopplungs-Aktivierung über einen erhöhten IAOx-Pool ausgelöst wird. Es wurde versucht, die Rolle von Auxin mit Untersuchungen der Suszeptibilität der *YUCCA*-Activation-Tag-Linie gegenüber *Vl43*-Infektion zu adressieren (Cheng et al. 2007). Die *YUCCA*-Activation-Tag-Linie weist aufgrund der konstitutiven Expression eines Auxin-Biosynthese-Gens eine erhöhte Auxin-Konzentration auf. Da die *YUCCA*-Activation-Tag-Linie jedoch auch einen pleiotrophen Phänotyp hat, welcher die Vergleichbarkeit der *Vl43*-induzierten Krankheitssymptome nicht gewährleistete, ließ sich aus den Experimenten kein Schluss auf die Suszeptibilität ziehen. Ohnehin wird die Funktion von Nitrilasen in der Auxin-Synthese durch neuere Forschungsarbeiten in Frage gestellt (Piotrowski 2008). Danach übernehmen Nitrilasen eher Funktionen in Entgiftungsreaktionen und bei dem Recyceln von Stickstoff.

Ob die Camalexin-Synthese zu einer Abwehr gegen *V. longisporum*-Infektion beiträgt, wurde durch die Analyse der Ausprägung von Krankheitssymptomen der Camalexin-defizienten Mutante *pad3* untersucht. Es zeigte sich, dass die Krankheitssymptome in der *pad3*-Mutante nur geringfügig verstärkt waren. Camalexin-Defizienz führt also nicht zu einer deutlich erhöhten Suszeptibilität, wie es beispielsweise für das *Arabidopsis-Botrytis*-Pathosystem gezeigt wurde (Ferrari et al. 2007).

Der geringe Effekt in der *pad3*-Mutante könnte aber auch an dem angewendeten Infektionssystem liegen. Die Induktion der Camalexin-Synthese wurde in den Wurzeln unter Anwendung des sterilen *in vitro*-Infektionssystems nachgewiesen. Die zu den

frühen Zeitpunkten induzierten Transkriptionsprofile deuten auf eine deutliche Induktion von Komponenten der Basalresistenz hin. Auch die sehr lokale Induktion des *CYP79B2*-Luciferase-Reporters in den Bereichen von direktem Pilzkontakt unterstützt die Theorie einer lokalen Abwehrreaktion. Möglicherweise ist *Arabidopsis* normalerweise durch eine starke Basalresistenz nicht anfällig gegenüber *V. longisporum*-Infektion. Alle bereits publizierten Infektionsprozeduren, in denen erdgewachsene *A. thaliana*-Pflanzen die beschriebenen typischen *V. longisporum*-Infektionssymptome entwickeln, führen während der Infektion zu einer Verletzung der Wurzeln. Womöglich kann *V. longisporum* nur durch diese Verletzungen *A. thaliana* befallen, da die normalerweise vorhandenen Abwehr-Barrieren durch die Penetration über Wunden umgangen werden. Diese Hypothese wird durch mikroskopische Beobachtungen aus dem sterilen *in vitro*-Infektionssystem unterstützt. In diesem System konnte die Besiedelung des Xylems durch den GFP-markierten *VI43*-Stamm nur nach Verwundung der Wurzel beobachtet werden. Ohne Wurzelverletzungen beschränkte sich das Mycelwachstum auf das Kortex-Gewebe (eigene Beobachtung und persönliche Mitteilung von Michael Reusche). Möglicherweise ist *VI43* in der *pad3*-Mutante durch Schwächung der Basalresistenz in der Lage, auch ohne Verletzung der Wurzel das Xylem zu besiedeln. Um zu klären, ob es sich bei dem *A. thaliana*-*VI43*-Pathosystem um eine Wirts-Interaktion handelt, sollte ein erdbasiertes Infektionssystem etabliert werden, welches ohne Verletzungen auskommt. Beispielsweise könnten die Pflanzen durch Angießen mit Sporensuspension oder durch die Beimischung von Mikrosklerotien in die Kulturerde ohne Verletzungen infiziert werden. Unter der Annahme, dass durch die Verletzungen der Wurzel die Basis-Resistenz umgangen wird, wäre es vielleicht möglich, in einem verletzungsfreien Infektionssystem einen deutlicheren Effekt der Camalexin-defizienten Mutante *pad3* auf die Suszeptibilität zu zeigen.

Eine weitere Erklärung für den geringen Effekt der Camalexin-Defizienz der *pad3*-Mutante könnte in der Fähigkeit von *V. longisporum* liegen, Camalexin durch hydrolytischen Abbau zu entgiften. Ein solcher Abbau von Phytoalexinen wurde für viele Pilz-Pathosysteme beschrieben und kann maßgeblich zu der Virulenz einzelner Pathogene beitragen. Eine ausführliche Übersicht über die Entgiftung von Phytoalexinen durch phytopathogene Pilze wurde von Pedras und Ahiahonu

veröffentlicht (Pedras und Ahiahonu 2005). Möglicherweise kann auch *Verticillium* Camalexin entgiften. Dies wird momentan anhand von Untersuchungen der Metabolisierung von Camalexin durch *Verticillium ssp.* sowie durch Untersuchungen der Sensitivität von *Verticillium ssp.* gegenüber Camalexin getestet. Erste Ergebnisse der Untersuchungen deuten darauf hin, dass *Vl43* durch Camalexin im Wachstum gehemmt wird (persönliche Mitteilung von Dr. Susanna Braus-Stromeyer und Seema Singh, Abteilung Mikrobiologie, Göttingen). Die Metabolisierung von Camalexin durch *Vl43* soll durch den biochemischen Nachweis von Camalexin-Abbauprodukten aus *Verticillium*-Kulturüberstand untersucht werden. Gegen die Fähigkeit von *Vl43*, Camalexin abzubauen, spricht jedoch die deutliche Akkumulation von dem Phytoalexin in den *Vl43*-infizierten Wurzeln.

Möglicherweise kann *Verticillium* Camalexin auch über einen aktiven Transport aus der Zelle exportieren und dadurch die toxische Wirkung verringern. Für *B. cinerea* konnte ein entsprechender Mechanismus gezeigt werden (Stefanato et al. 2009). Danach kann *B. cinerea* über einen ABC-Transporter (BcatrB) Camalexin aktiv aus der Zelle exportieren und dadurch eine erhöhte Toleranz gegenüber Camalexin erlangen.

Die *cyp79b2/b3*-Doppelmutante zeigt nach der Infektion mit *Vl43* verglichen mit *pad3* und dem WT stärker ausgeprägte Krankheitssymptome; schon acht Tage nach *Vl43*-Inokulation zeigt sie eine deutlich stärkere Blattflächenreduktion. Dies deutet auf eine Rolle des über CYP79B2/B3 gebildeten IAOx-Pools in frühen Infektionsstadien hin.

Von der Mutation der beiden Cytochrom-P450-Monooxygenasen CYP79B2 und CYP79B3 ist nicht nur die Camalexin-Synthese betroffen, sondern alle vom IAOx aus gebildeten Metabolite. Möglicherweise tragen die über den IAOx-Pool gebildeten Indol-Glucosinolate zu einer *Vl43*-Abwehr bei (Abbildung 29, Seite 96).

In den Transkriptionsprofilen der frühen Abwehrreaktion der Wurzel ist keine Induktion von bereits charakterisierten Komponenten der Indol-Glucosinolat-Synthese erkennbar. In Wurzeln könnte jedoch ein konstitutiv gebildeter Indol-Glucosinolat-Level zur *Vl43*-Resistenz beitragen. Dieser Grundlevel ist in den äußeren Gewebeschichten von Wurzeln deutlich höher als im Blattgewebe (McCully et al. 2008). Auch die Zusammensetzung der einzelnen Glucosinolate unterscheidet sich deutlich zwischen Blatt- und Wurzelgewebe (van Dam et al. 2009). Daher wäre es auch möglich, dass der für Blattgewebe beschriebene Syntheseweg von Indol-Glucosinolaten in der Wurzel in

einigen Syntheseschritten über wurzelspezifische Isoenzyme stattfindet. Da für viele der im Array-Experiment induzierten Cytochrom-P450-Monooxygenasen die Funktion bisher unbekannt ist, könnten einige an solch einem wurzelspezifischen Metabolismus beteiligt sein.

Zwei Transkripten, welche drei Tage nach *Vl43*-Infektion induziert sind, wurde kürzlich eine Funktion bei der Synthese antimikrobieller, von Indol-Glucosinolaten abstammenden Metaboliten nachgewiesen (Bednarek et al. 2009; Clay et al. 2009). Dabei handelt es sich um einen Mechanismus zur Umsetzung von Indol-Glucosinolaten, bei dem nicht das bei der Abwehr von Fraßschädlingen wichtige System von konstitutiv in Zellkompartimenten vorliegenden Myrosinase die Glucosinolate hydrolysiert (Abbildung 30). Bei dem klassischen Glucosinolat-Myrosinase-System sind Enzym und Substrat durch eine Kompartimentierung getrennt. Durch die mechanische Verletzung der Zellkompartimente durch Herbivoren wird diese Trennung aufgehoben und es kommt zu der Bildung von giftigen Thiocyanaten, Isothiocyanaten, Nitrilen, Epithionitrilen und anderen toxischen Produkten (Halkier und Gershenzon 2006). Nach dem neu aufgedeckten Mechanismus führt die Aktivität der Pathogen-induzierbaren Gene CYP81F2 und PEN2 zur Metabolisierung des Indol-Glucosinolats Indol-3-ylglucosinolat (I3G) (Bednarek et al. 2009). Dabei wird das I3G durch die nach Pathogen-Infektion stark induzierte Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP81F2 in 4-methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat (4MI3G) umgesetzt. Dieses 4MI3G wird anschließend durch die Aktivität der Glycosyl-Hydrolase PEN2 in noch nicht weiter charakterisierte, antimikrobielle Stoffe umgewandelt (Abbildung 30). Wahrscheinlich findet eine Synthese von *Brassicaceen*-spezifischen Phytoalexinen über ein 4-methoxyliertes Indol-Dithiocarbamat-Zwischenprodukt statt (Pedras et al. 2007). Die *knock out*-Mutanten von CYP81F2 sowie CYP79B2/B3 können kein 4MI3G mehr bilden und sind, wie auch die *pen2*-Mutante, deutlich susceptibler gegenüber Penetration der *Arabidopsis*-Nicht-Wirts-Pathogene *Blumeria graminis hordei* und *Erysiphe pisi* (Bednarek et al. 2009). Neben der Synthese von Phytoalexinen wurden den bisher noch nicht charakterisierten Produkten der PEN2-abhängigen Indol-Glucosinolat-Hydrolyse eine essentielle Signalfunktion bei der während der Basalresistenz stattfindenden Kalloseapposition nachgewiesen (Clay et al. 2009). In den



*cyp79b2/b3-*, *cyp81f2-* und *pen2*-Mutanten findet nach Pathogen-Stimulus keine für *Wildtyp*-Pflanzen übliche, schnelle, SA-unabhängige Kalloseapposition mehr statt.

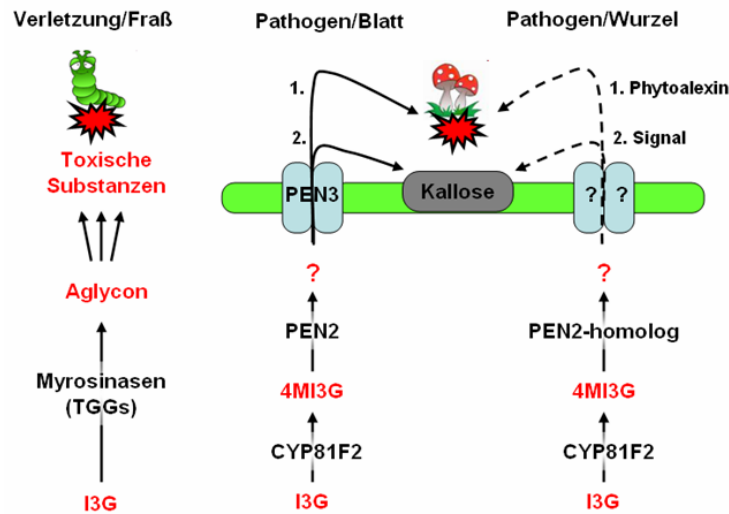


Abbildung 30: Modell der Hydrolyse von Indolglucosinolaten zu toxischen Sekundärmetaboliten und Signalkomponenten bei der Abwehr von Herbivoren (links), Blattpathogenen (mitte) und Wurzelpathogenen (rechts). Links ist die Metabolisierung von Indol-3-ylglucosinolat (I3G) durch die nach Verletzungen ausgelöste Hydrolyse durch Myrosinasen dargestellt (TGG:  $\beta$ -thioglucoside glucohydrolase). Das nach der Hydrolyse entstehende instabile Aglycon zerfällt zu toxischen Verbindungen wie Isothiocyanaten, Oxazolidine-2-thionen, Nitrilen, Epithionitrilen und Thiocyanaten. In der mitte und rechts ist die Umsetzung von I3G durch CYP81F2 zu 4MI3G (4-methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat) und die anschließende Hydrolyse durch PEN2 bzw. der PEN2-homologen Glucosyl-Hydrolase At3g60120 dargestellt. Die entstehenden Metabolite sind noch unbekannt (?). Diese Metabolite haben einerseits eine Signalfunktion (2.) bei der Pathogen-induzierten Kalloseapposition zum anderen wird eine direkte toxische Wirkung (1.) dieser Metabolite angenommen. In dem Fall von Blattpathogenen (mitte) werden diese wahrscheinlich durch den ABC-Transporter PEN3 durch die Plasmamembran in den Apoplasten transportiert und entfalten dort ihre antibiotische Wirkung. Im Fall der Abwehr in der Wurzel (rechts) könnte ein homologer, wurzelspezifischer Mechanismus vorliegen.

Die Analyse der Arraydaten ergab, dass CYP81F2 nach Infektion mit *V. longisporum* in den Wurzeln transkriptionell induziert ist. Bei der Verifizierung der Induktion mittels qRT-PCR zeigte das *CYP81F2*-Transkript eine ca. achtfache Induktion gegenüber den mock-inokulierten Pflanzen. Außerdem konnte durch qRT-PCR für die zu PEN2-ähnliche Glycosyl-Hydrolase At3g60120 eine bis zu zweihundertfache Induktion gegenüber dem mock-inokulierten WT gezeigt werden. Dies ist die stärkste Induktion, die in den qRT-PCR-Versuchen für ein im Array induziertes Gen gezeigt werden konnte. Wahrscheinlich wird durch *V143*-Infektion in den Wurzeln die Synthese von toxischen Sekundärmetaboliten über einen PEN2/CYP81F2-homologen Syntheseweg induziert. Die Glycosyl-Hydrolase At3g60120 könnte als ein wurzelspezifisches Isoenzym von PEN2 zusammen mit CYP81F2 nach *Verticillium*-Infektion die Umsetzung von I3G zu Abwehrstoffen oder Signalkomponenten der Basalresistenz

vermitteln (Abbildung 30). Insgesamt legen die Ergebnisse aus den Transkriptionsprofilen und die Untersuchung der *pad3*- und *cyp79b2/b3*-Mutanten nahe, dass *A. thaliana* eine sehr ausgeprägte basale Abwehrreaktion nach der Infektion durch *VI43* eliciert. Bei dieser Abwehrreaktion kommt es in den Wurzeln zu einer Akkumulation von Camalexin und wahrscheinlich über einen PEN2-homologen Mechanismus zu der Bildung von Indol-Glucosinolat-abstammenden Phytoalexinen. Aufgrund der Tatsache, dass für die Analyse der durch *VI43* induzierten Krankheitssymptome ein Infektionssystem verwendet wurde, welches zu Verletzungen der Wurzeln führt, ist nicht auszuschließen, dass die *Arabidopsis*-*VI43*-Interaktion unter natürlichen Infektionsbedingungen eine inkompatible Interaktion ist. Die Hypothese einer Nicht-Wirts-Situation ließe sich durch mikroskopische Untersuchungen, sowie durch Infektionsstudien, welche ohne Verletzungen der Wurzeln auskommen, bestätigen. Dann könnte man mit den in den Wurzeln identifizierten Abwehrkomponenten Untersuchungen der Nicht-Wirts-Resistenz nach dem Vorbild des blattspezifischen Pathosystems *A. thaliana*-*Blumeria graminis hordei* (*Bgh*) durchführen (Lipka et al. 2008). Vielleicht ließen sich so wurzelspezifische Komponenten der Nicht-Wirts-Resistenz identifizieren.

### **4.3 *Arabidopsis* ERF- und NAC-Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Resistenz gegenüber *V. longisporum***

Durch Rezeptoren nehmen Pflanzen Signale aus der Umwelt wahr und reagieren mit der Aktivierung von komplexen Signalkaskaden. Über diese Signalkaskaden wird die Information des Umweltreizes bis an den Zellkern weitergeleitet und führt dort zu der Expression von einem spezifischen Satz von Genen. Die im Zellkern an definierte DNA-Sequenzen (*cis*-Elemente) bindenden Transkriptionsfaktoren kontrollieren über Aktivierungs- oder Repressionsdomänen die Expression von Genen (Kazan 2006; Riechmann et al. 2000). In der Pathogenabwehr konnte besonders Transkriptionsfaktoren der WRKY-, ERF- und bZIP-Familien eine Regulation von Abwehrprozessen nachgewiesen werden (Singh et al. 2002).

Die drei Tage nach *Verticillium*-Infektion beobachtete Reprogrammierung des Transkriptoms wird wahrscheinlich zu einem Teil direkt durch die im Array koregulierten Transkriptionsfaktoren verursacht. Zwar ist die Array-Technik aufgrund von unzureichender Sensitivität nicht geeignet sehr gering differentiell exprimierte

Transkriptionsfaktoren zu detektieren (Czechowski et al. 2004; Libault et al. 2007), aber die große Anzahl der im Array-Experiment *V143*-induzierten Transkriptionsfaktoren bietet Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen. Diese induzierten Transkriptionsfaktoren gehören zu den Familien der MYB-, Zink-Finger-, WRKY-, ERF- und NAC-Transkriptionsfaktoren (Tabelle 6, Seite 84).

Besonders für Vertreter aus der Gruppe der „Ethylen Responsiv Element Binding Faktoren“ (ERFs) wurde bereits gezeigt, dass viele durch Pathogen-Stimulus induziert werden und zur Pathogen-Resistenz von Pflanzen beitragen (Libault et al. 2007; McGrath et al. 2005; Gutterson und Reuber 2004). Die ERFs werden phylogenetisch in die Superfamilie der AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren eingeordnet, welche noch die AP2- und RAV-Transkriptionsfaktoren einschließt (Nakano et al. 2006). Diese AP2/ERF-Gruppe wird durch die aus 60-70 konservierten Aminosäuren bestehende AP2/ERF-DNA-Bindedomäne definiert (Nakano et al. 2006). In einer umfangreichen Computer-Analyse der ERF-Transkriptionsfaktoren wurden die 122 *Arabidopsis* ERFs identifiziert und in zehn phylogenetische Untergruppen unterteilt (Nakano et al. 2006).

Da Transkriptionsfaktoren die koordinierte Regulation eines spezifischen Satzes von Zielgenen kontrollieren, kann deren Überexpression eine Veränderung von Transkriptionsprofilen bestimmter physiologischer Prozesse auslösen. Die Überexpression von ERFs der phylogenetischen Gruppe IX (ERF1, ERF2, *Gb*ERF2, *Nt*ERF5, *At*ERF14 und ORA59) führt beispielsweise zu einer erhöhten Resistenz gegenüber verschiedene biotische Stressbedingungen (Oñate-Sánchez et al. 2007; Pré et al. 2008; Zuo et al. 2007; Fischer und Dröge-Laser 2004; Berrocal-Lobo und Molina 2004)

Um ERF-Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, welche zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *V. longisporum*-Infektion führen, wurde eine Pflanzenkollektion von ERF-Überexpressionslinien durchmustert. Die für das Screening eingesetzte *AtTORF-EX*-Überexpressions-Kollektion wurde im Rahmen einer während dieser Dissertation betreuten Diplomarbeit hergestellt und anschließend einer gründlichen Qualitätsprüfung unterzogen (Weiste et al. 2007). Die etablierte „batch“-Transformationsroutine zeigte sich als effiziente Methode für die Generierung von großen Überexpressions-Kollektionen.

Bei der Durchmusterung der *AtTORF-EX*-Kollektion konnten ERF-Überexpressionslinien identifiziert werden, in denen die systemische Kolonisierung durch *Vl43* nicht mehr bis in den Infloreszenzstängel voranschreiten konnte. Drei Prozent der durchmusterten Linien zeigte eine Resistenz gegenüber systemischer Besiedelung. Bei einem Screening wird häufig eine gewisse Zahl falsch-positiver Kandidaten selektioniert. Daher wurden nur vier ERFs als Resistenz-vermittelnde ERF-Transkriptionsfaktoren eingestuft, da diese in mindestens drei der selektionierten Kandidaten-Linien überexprimiert wurden. Diese vier Transkriptionsfaktoren sind bisher nicht funktionell charakterisiert. Drei gehören der Untergruppe IX der ERF-Transkriptionsfaktoren an (Abbildung 23, Seite 83), welcher auch viele bereits charakterisierte Transkriptionsfaktoren mit einer Funktion in der Pathogenabwehr zugeordnet werden (darunter ERF1, *AtERF1*, *AtERF2*, *AtERF5*, *AtERF6*, *AtERF13*, *AtERF14*, *AtERF15*, TDR1 und ORA59) (Nakano et al. 2006). Der vierte dreifach im Screen gefundene ERF#060 (At4g39780) gehört zur ERF-Untergruppe Ib, der auch RAP2.4b (At1g78080) und RAP2.4a (At1g36060) angehören (Lin et al. 2008; Shaikhali et al. 2008). Für den zu ERF#060 phylogenetisch nahe stehenden Transkriptionsfaktor RAP2.4b wurde aufgrund von verschiedenen Ethylen-abhängigen phänotypischen Beobachtungen in Überexpressions- und *knock out*-Linien eine Funktion bei der Regulation Ethylen- und lichtabhängiger Signaltransduktion vorgeschlagen (Lin et al. 2008). Die Überexpressions- bzw. *knock out*-Linien von RAP2.4b sind außerdem resistenter bzw. sensibler gegenüber Trockenheitsstress (Lin et al. 2008). In den im Screening isolierten ERF#060-überexprimierenden Linien könnte entsprechend die Ethylen-Signaltransduktion beeinflusst sein. Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zu den bereits beschriebenen Effekten auf die durch *Verticillium* ausgelösten Krankheitssymptome bei Ethylen-Signaltransduktions-Mutanten (Veronese et al. 2003; Johansson et al. 2006).

Die zu der ERF-Subgruppe IX gehörenden resistenten Kandidaten ERF#096, ERF#105 und ERF#106 lassen auf eine Funktion der Gruppe-IX-Faktoren in der Resistenz gegenüber *Vl43* schließen. Neben den drei mehrfach auftretenden ERFs waren auch vier weitere Mitglieder der Gruppe IX unter den resistenten Kandidaten. ERF#105 und ERF#101/ERF2 waren zusätzlich im Array-Experiment induziert (Abbildung 23, Seite 83).

ERF#096 ist aufgrund seiner Ähnlichkeit mit ERF#095 und ERF#097/*At*ERF14 in dem von Nakano (2006) erstellten phylogenetischen Stammbaum mit diesen in einem Zweig zusammengefasst worden. *At*ERF14 wird nach Infektion mit *P. syringae* zusammen mit weiteren ERFs induziert (Abbildung 31, Seite 108) (Oñate-Sánchez und Singh 2002) und *At*ERF14 konnte außerdem eine positive regulatorische Funktion in der Resistenz gegen *F. oxysporum* nachgewiesen werden (Oñate-Sánchez et al. 2007). *At*ERF14-Überexpressions-Pflanzen sind kleinwüchsig und bilden keine Infloreszenz aus, weswegen wahrscheinlich keine starken *At*ERF14-Überexpressions-Linien in der *At*TORF-Ex-Kollektion enthalten sind. Die Untersuchung der Suszeptibilität von *At*ERF14-Überexpressions- und *knock out*-Linien gegenüber *V. longisporum*-Infektion konnte aus Zeitmangel nicht mehr durchgeführt werden, ist aber zukünftig geplant. Der zu *At*ERF14 sehr homologe ERF#096, welcher sechsfach unter den resistenten Kandidaten vertreten war, könnte eine zu *At*ERF14 ähnliche Funktion in der Pathogenabwehr haben.

Ein weiterer Kandidat der ERF-Untergruppe IX, welcher in dem Screen dreifach auftrat, ist ERF#106. ERF#106 zeigt eine hohe Homologie zu dem in zwei resistenten Linien des Screens exprimierten ERF#107. Diese zwei ERF-Transkriptionsfaktoren zeigen in der Analyse der Stimulus-induzierten Transkription mittels des Genevestigator-Programms (Zimmermann et al. 2004) im Vergleich zu den restlichen Mitgliedern der Gruppe IX ein deutlich abweichendes Expressionsmuster (Abbildung 31). Die Analyse zeigt beispielsweise bei der Induktion mit *P. syringae*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und bei UV-Stimulus eine entsprechend gegensätzliche transkriptionelle Regulation zu den anderen Mitgliedern der Gruppe IX.

Als dritte möglicherweise Resistenz-vermittelnde ERF-Paarung wurden in dem Screening die phylogenetisch nahe verwandten ERF-Transkriptionsfaktoren ERF#104 und ERF#105 identifiziert. ERF#105 konnte dreifach im Screen gefunden werden und war zudem drei Tage nach *Vl43*-Infektion transkriptionell induziert. Über diese zwei Transkriptionsfaktoren ist bisher nichts bekannt. Die Genevestigator-Analyse zeigt, dass beide unter verschiedenen biotischen Stressbedingungen in gleicher Weise stark induziert werden (Abbildung 31).

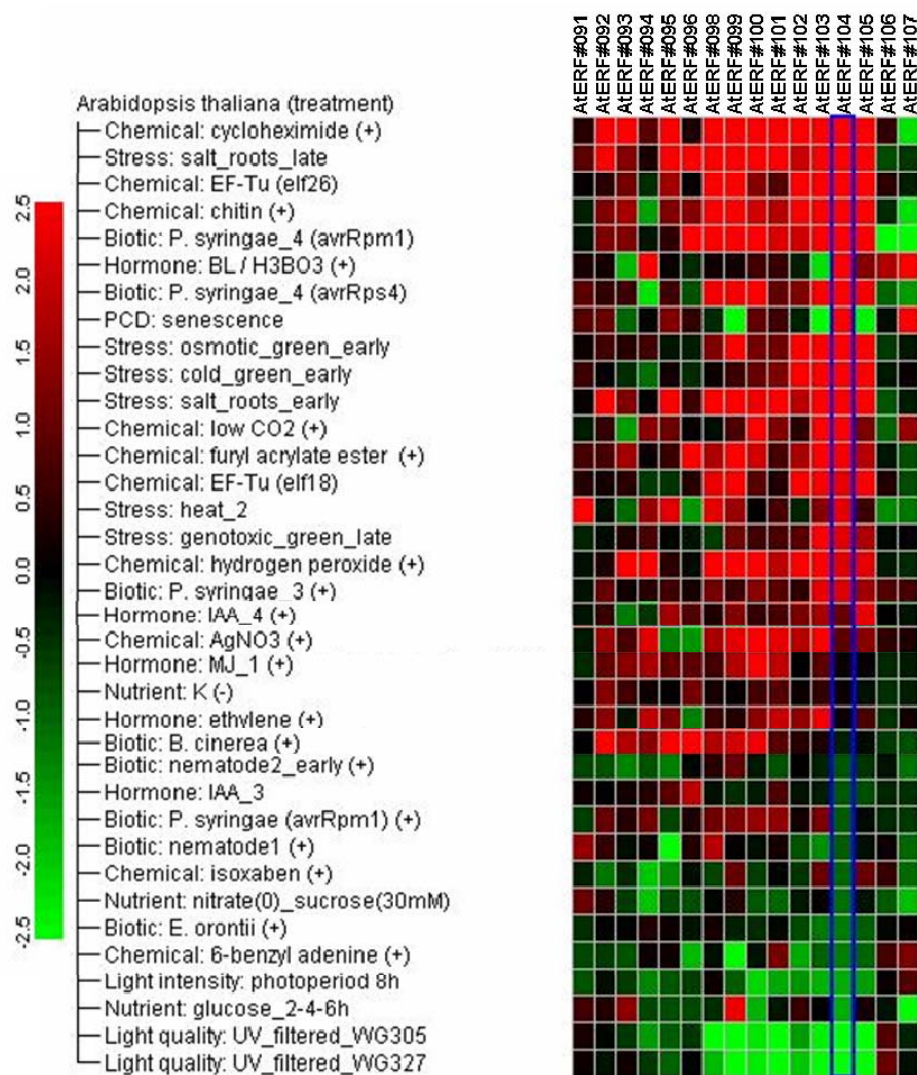


Abbildung 31: Genevestigator-Analyse der Gruppe IX ERF-Transkriptionsfaktoren. Die Induktion dieser ERFs in Arrayanalysen von verschiedenen Stimulus-induzierten Transkriptionsprofilen ist nach der Induktionsstärke entsprechend der links dargestellten Farbskala in eine sogenannte *Heatmap* eingeteilt. Rote Felder bedeuten eine Induktion, grüne Felder eine Repression der entsprechenden Transkripte unter den induzierenden Bedingungen der jeweiligen Array-Experimente. Die Arraybedingungen sind links neben der *Heatmap* in Stichworten zusammengefasst. Über der *Heatmap* sind die ERF-Vertreter der Gruppe IX aufgeführt.

Diese transkriptionelle Koregulation deutet auf eine mögliche funktionelle Redundanz hin. Daher soll die Funktion dieser ERFs in der Abwehrreaktion gegenüber *V. longisporum*-Infektion in einer amiRNA(*artificial micro RNA*)-*knock-down*-Linie adressiert werden. Durch einen amiRNA-Ansatz lässt sich gleichzeitig die Expression beider Transkriptionsfaktoren durch RNA-silencing verringern (Schwab et al. 2006). Entsprechend werden momentan auch amiRNA-*knock-down*-Linien für die Paarungen *AtERF14/ERF#096* und *ERF#106/ERF#107* hergestellt. Die Untersuchung der

Suszeptibilität dieser Linien gegenüber *Vl43*-Infektion soll sich nach der molekularen Charakterisierung der amiRNA-*knock-down*-Linien anschließen.

Die in dem Screening identifizierten Linien wurden einzeln abgeerntet und können in Zukunft für gezielte Untersuchungen auf ihre Suszeptibilität gegenüber *Vl43*-Infektion eingesetzt werden. Diese Linien sind allerdings noch heterozygot; es müssen vor weiteren Untersuchungen erst homozygote Linien identifiziert werden. Da die dafür nötige Segregationsanalyse viel Zeit beansprucht, konnten diese weiterführenden Untersuchungen im Rahmen dieser Promotion nicht mehr durchgeführt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass mittels des etablierten Screening-Verfahrens ERF-Überexpressions-Linien mit einer möglichen resistenzvermittelnden Funktion gegenüber *V. longisporum* identifiziert werden können. Die aufgebaute *AtTORF-Ex*-Kollektion lässt sich erfolgreich in dem angewendeten Screening-Verfahren einsetzen. Dabei zeigte sich, dass die resistenzvermittelnden Kandidaten gehäuft der ERF-Subgruppe IX zugehören, welche Transkriptionsfaktoren mit einer Funktion in der biotischen Stressantwort umfasst. Dies ist ein indirekter Hinweis, dass durch das Screening-Verfahren vorwiegend die mit biotischer Stressantwort assoziierten Transkriptionsfaktoren selektioniert werden können. Die gegen die systemische *Vl43*-Propagation resistenten Kandidaten umfassten jedoch nicht die bereits bekannte Gruppe IX ERFs, sondern weitgehend uncharakterisierte ERFs. Ein Grund dafür könnte der besondere Charakter des *Verticillium-Arabidopsis*-Pathosystems sein. Vielleicht wird durch diese noch uncharakterisierten ERFs eine für Xylem besiedelnde, wurzelbürtige Pilze spezifische Induktion von Abwehrgenen ausgelöst. Das für die ERF-Transkriptionsfaktoren erfolgreich angewendete Screening-Verfahren kann in der Zukunft mit weiteren Transkriptionsfaktor-Gruppen der *AtTORF-Ex*-Kollektion durchgeführt werden.

Neben dem *AtTORF-Ex*-Screening wurde noch ein weiterer experimenteller „*gain of function*“-Ansatz durchgeführt. Es wurden für die zwei in dem Array induzierten Transkriptionsfaktoren ERF#105 und ANAC042 homozygote *Arabidopsis*-Überexpressionslinien erstellt und diese auf ihre Suszeptibilität gegenüber *Vl43*-Infektion untersucht. Dabei erhöhte die Überexpression in beiden Fällen die Resistenz gegenüber systemischer *Vl43*-Propagation. Folglich haben diese in dem Array induzierten Transkripte direkten Einfluss auf die Suszeptibilität von *Arabidopsis*

gegenüber *Vl43*. Das die ERF#105-Überexpressionslinien eine erhöhte *Vl43*-Propagations-Resistenz zeigen, bestätigt auch die Ergebnisse des *AtTORF-Ex* Screenings, in dem ERF#105-überexprimierende Linien dreifach selektioniert wurden. Die in älteren Pflanzen beobachtete Bildung von nekrotischen Flecken auf den Blättern von ERF#105-Überexpressionslinien könnte ein Indiz für eine konstitutive Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies sein. Analysiert man die koexprimierten Transkripte von ERF#105 mit Hilfe des ATTED-II Koexpressions-Datenbank-Programms (Obayashi et al. 2008), so erkennt man, dass die ebenfalls in dem Array induzierten Transkripte von ERF#104 und das des TIR-NBS-Rezeptorproteins *At1g72940* mit ERF#105 koregulieren (Abbildung 32). Möglicherweise zeigen diese Transkripte in den ERF#105-Überexpressionslinien eine erhöhte Expression. Eine konstitutive Expression des ERF#105-koregulierten TIR-NBS-Proteins könnte die in den Überexpressionslinien beobachtete Zelltodreaktion der Blättern auslösen. Es konnte gezeigt werden, dass die induzierbare Expression der TIR-Domäne von TIR-NBS-Proteinen zu der Ausbildung von Nekrosen führt (Swiderski et al. 2009). Mittels qRT-PCR ließe sich eine konstitutive Induktion der ERF#105-koregulierten Gene überprüfen.

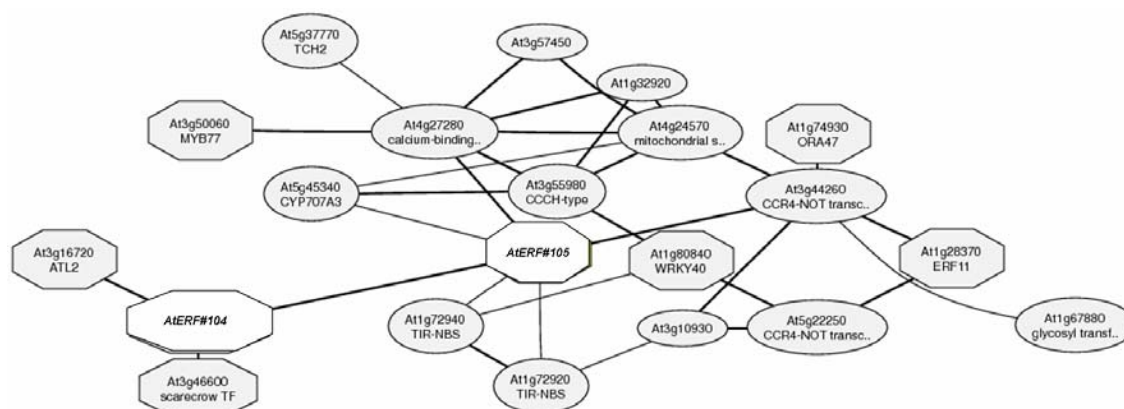


Abbildung 32: ATTED-II Koexpressions-Analyse der mit *AtERF#105* koregulierten Transkripte (Obayashi et al. 2008). Direkte Verbindungen der Gene zeigen einen besonders hohen Grad an Koregulation in verschiedenen Array-Experimenten.

Für den zweiten Transkriptionsfaktor (*ANAC042*), für welchen homozygote Überexpressionslinien erzeugt wurden, konnte mittels qRT-PCR eine konstitutive Induktion von koregulierten Transkripten in den *ANAC042*-Überexpressionslinien nachgewiesen werden (Abbildung 27, Seite 87). Außerdem diente die qRT-PCR als Kontrolle der Überexpression. Die *NAC*-Überexpressionslinien *NAC42-6* und *NAC42-20* weisen verglichen mit dem Wildtyp eine 15-fach erhöhte *ANAC042*-



Transkriptmenge auf. In diesen Linien konnte eine konstitutive Transkription von CYP71A12 und einem FAD-bindenden Protein (At1g26380) gezeigt werden. Diese zwei Transkripte werden auch nach *Vl43*-Infektion in den *Arabidopsis*-Wurzeln induziert. Als Kontrolle wurde das nicht mit ANAC042 koregulierte *PAD3*-Transkript untersucht. Dieses zeigt in den ANAC042-Überexpressionslinien keine konstitutive Induktion. Weitere in dem Drei-Tage-Wurzel-Array induzierten Gene wie MYB122, CCoAOMT und GSTU10 sind mit ANAC042 deutlich koreguliert. Auch diese Transkripte könnten in den ANAC042-Überexpressionslinien konstitutiv induziert sein. Die Aktivierung dieser Abwehrgene verursacht wahrscheinlich die erhöhte Resistenz der ANAC042-Überexpressionslinien gegenüber der systemischen Kolonisierung durch *V. longisporum*. Ob die Induktion durch direkte Bindung des NAC-Transkriptionsfaktors an die Promotoren von CYP71A12 und At1g26380 ausgelöst wird oder es sich um eine indirekte Induktion handelt, kann nicht gesagt werden. Dies könnte mittels Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP) unter Verwendung eines HA-Antikörpers untersucht werden, da die überexprimierten Transkriptionsfaktoren ein HA-Epitop tragen.

Insgesamt konnte durch die Analyse der Überexpressionslinien gezeigt werden, dass durch die Überexpression eines Transkriptionsfaktors die koordinierte Induktion von Abwehrgenen ausgelöst wird und dies zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *V. longisporum* führen kann. Die einzelnen durch die Überexpression induzierten Transkripte und deren Funktion in der Pathogenabwehr müssen in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Eine Analyse der „*loss of funktion*“-Mutanten von ERF#105 und ANAC042 wird ihre Rolle in der *Verticillium*-Abwehr weiter aufklären. Auch andere im Array-Experiment induzierte Transkriptionsfaktoren sollten durch „*gain of funktion*“- und „*loss of funktion*“-Analysen auf ihre Relevanz für die *Verticillium*-Abwehr untersucht werden. Dabei hat sich die Koregulations-Analyse mit Hilfe der ATTED-II Koregulations-Datenbank als ein wertvolles Hilfsmittel bei der Identifizierung von Zielgenen einzelner Transkriptionsfaktoren herausgestellt. Vielleicht lassen sich durch Datenbankanalysen weitere *Vl43*-induzierte Abwehrgene der Regulation durch im Array induzierte Transkriptionsfaktoren zuordnen.

## 5 Zusammenfassung

*Verticillium longisporum* ist ein Xylem-besiedelnder bodenbürtiger Pilz, welcher zu gravierenden Ertragseinbußen im Rapsanbau führt. Untersuchungen der Pflanze-Pathogen-Interaktion des auf *Brassica*-Arten spezialisierten Pilzes können in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt werden, da diese anfällig gegenüber *V. longisporum* ist und die bei Raps beobachteten Krankheitssymptome entwickelt. In der vorliegenden Arbeit sollten genetischen Faktoren aus *A. thaliana* identifiziert werden, welche die Interaktion mit *V. longisporum* beeinflussen. Ein besonderer Fokus lag in der Charakterisierung der frühen transkriptionellen Reaktion von *A. thaliana*-Wurzeln.

In einem Microarray-Experiment wurden die in den Wurzeln einen und drei Tage nach *Verticillium*-Infektion differentiell exprimierten Transkripte bestimmt. Es zeigte sich, dass eine deutliche transkriptionelle Reprogrammierung stattfindet, wobei besonders Transkripte der biotischen Stressantwort induziert werden. Diese kodieren unter anderem für Signaltransduktions-Komponenten, Enzymen der Biosynthese von antibiotischen Sekundärmetaboliten, sowie für Proteine mit einer direkten Abwehrfunktion. Für ein Transkript wurde exemplarisch mittels Luciferase-Reporter-Pflanzen eine lokale Induktion in den direkt mit Pilzmycel in Kontakt stehenden Wurzelbereichen gezeigt.

Besonders Biosynthese-Gene des Phytoalexins Camalexin sind in *V. longisporum*-infizierten Wurzeln transkriptionell induziert. Auch biochemisch konnte eine im Rahmen physiologisch wirksamer Konzentrationen vorliegende Camalexin-Akkumulation nachgewiesen werden. In den Camalexin-Biosynthese-Mutanten *pad3* und *cyp79b2/b3* konnte nur in der *cyp79b2/b3*-Mutante die verstärkte Ausprägung der durch *V. longisporum*-Infektion ausgelösten Krankheitssymptome nachgewiesen werden. In der *cyp79b2/b3*-Mutante ist neben dem Camalexin-Biosyntheseweg auch die Synthese von Indol-Glucosinolaten unterbrochen. Für eine Funktion von Indol-Glucosinolat-abstammenden Biosyntheseprodukten in der Abwehrreaktion spricht die durch *Verticillium* ausgelöste transkriptionelle Induktion der Enzyme CYP81F2 und der PEN2-homologen Glycosyl-Hydrolase At3g60120. Eine PEN2/CYP81F2-abhängige

Metabolisierung von Indol-Glucosinolat konnte kürzlich als wichtige Komponente der Basalresistenz identifiziert werden (Bednarek et al. 2009; Clay et al. 2009).

Als weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit wurden Transkriptionsfaktor-Überexpressionslinien auf ihre Resistenz gegenüber *V. longisporum* untersucht. Unter Anwendung einer im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Transformationsroutine wurde die *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktor-ORF-Überexpressions-Kollektion (*AtTORF-EX*-Kollektion) hergestellt (Weiste et al. 2007). In einem Screeningansatz wurden Überexpressions-Linien von „Ethylen Responsiv Element Binding Faktoren“ (ERF) nach *Arabidopsis*-Linien durchmustert, welche resistent gegen eine systemische Kolonisation durch *V. longisporum* waren. Unter den resistenten Kandidaten-Linien traten gehäuft phylogenetisch verwandte ERF-Faktoren der Gruppe IX auf. In dieser Gruppe finden sich besonders viele ERFs, denen schon eine Funktion bei der biotischen Stressantwort nachgewiesen wurde.

In einem zweiten Ansatz wurden Überexpressionslinien für einzelne der nach *V. longisporum*-Infektion transkriptionell induzierten Transkriptionsfaktoren erzeugt. Die Überexpressionslinien von ERF#105 und ANAC042 zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber systemischer *V. longisporum*-Besiedelung. Für die durch *V. longisporum*-Infektion transkriptionell induzierten Gene *CYP71A12* und *Atlg26380* konnte in den ANAC042-Überexpressionslinien eine konstitutive Induktion nachgewiesen werden.

Die erstellten *Vl43*-induzierten Transkriptionsprofile zeigen zum ersten Mal die transkriptionelle Reaktion von *Arabidopsis*-Wurzeln nach der Infektion eines bodenbürtigen, pilzlichen Pathogens. Zusätzlich konnte einem der induzierten Transkriptionsfaktoren ein regulatorische Funktion bei der Expression von *V. longisporum*-induzierten Transkripten nachgewiesen werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Transkriptionsprofil von *A. thaliana* Wurzeln einen Tag nach *VI43*-Infektion

Tabelle 7: Transkriptionsprofil von *A. thaliana* Wurzeln einen Tag nach *VI43*-Infektion. Die Induktionsfaktoren der differentiellen Expression der Transkripte einen Tag nach Infektion sind in der Spalte *Idpi* aufgelistet. Die Liste umfasst alle differentiell exprimierte Gene mit einer mindest Induktion bzw. Repression der Transkription von 2,0 und einer Signifikanzschwelle von  $p \leq 0,1$ . Positive Werte bedeuten, dass diese Transkripte nach *VI43*-Infektion induziert sind (grüne Beschriftung). Negative Werte bedeuten, dass diese Transkripte nach *VI43*-Infektion reprimiert sind (rote Beschriftung). Als zusätzliche Information sind die Induktionswerte des drei Tages Zeitpunkt (3dpi) zu den entsprechend nach einem Tag differentiell regulierten Transkripten aufgelistet. Diese drei Tages Werte unterliegen nicht den Grenzwertkriterien (Induktion  $\geq 2,0$  Signifikanzschwelle  $p \leq 0,1$ ).

AGI	Gen/Beschreibung	1dpi	3dpi
At2g43510	defensin-like (DEFL) family (ATTI1)	8,4	9,2
At1g26380	FAD-binding domain-containing protein	7,1	8,8
At2g30750	CYP71A12	6,8	12,6
At5g26920	calmodulin-binding protein similar to At4g25800	6,6	1,6
At1g26390	FAD-binding domain-containing protein	6,6	9,5
At5g64120	cell wall bound peroxidase (MHJ24.10)	5,6	4,0
At1g02930	glutathione-s-transferase 3 (AtGSTF3, ERD11,GST1)	5,6	9,3
At5g43580	protease inhibitor, serine-type endopeptidase inhibitor	5,6	3,8
At2g38870	protease inhibitor (T7F6.4)	5,3	11,4
At1g14540	anionic peroxidase (PER4)	5,2	4,0
At5g12030	heat-shock-protein (At-HSP17.6A)	5,0	7,0
At2g43570	chitinase, putative similar to At2g43590 (class IV)	4,9	3,3
At3g24500	Multiprotein Bridging Factor 1C (MBF1c)	4,7	3,8
At2g30770	CYP71A13	4,6	9,2
At5g38910	germin-like protein	4,6	6,8
At1g26410	FAD-binding domain-containing protein	4,6	5,1
At3g29970	germination protein-related	4,6	4,5
At3g55790	unknown protein	4,6	2,7
At4g14630	germin-like protein (GLP9)	4,5	0,7
At1g02920	glutathione-s-transferase 7 (AtGSTF7)	4,4	6,4
At2g26560	Phospholipase 2A (PLA2A)	4,3	7,8
At2g28570	expressed protein	4,2	1,3
At1g53990	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	4,0	-0,2
At1g14200	zinc finger (C3HC4-type RING finger)	3,9	3,2
At1g66700	SABATH methyltransferase gene family (PXMT1)	3,9	2,7
At5g57220	CYP81F2	3,8	6,8
At1g36640	expressed protein	3,8	1,2
At2g15220	secretory protein	3,7	4,6
At3g01970	WRKY45	3,7	2,6
At1g18200	Arabidopsis Rab GTPase homolog A6b (AtRABA6b)	3,7	0,5
At1g74590	glutathione-s-transferase 10 (AtGSTU10)	3,7	3,1
At4g39675	expressed protein	3,7	2,8
At2g43000	ANAC042	3,6	4,2
At4g02430	pre-mRNA splicing factor, putative SR1 protein	3,6	0,2
At5g18040	expressed protein	3,5	-0,5
At4g25200	Hsp20/alpha crystallin family (HSP23.6-M)	3,5	5,7
At1g19530	expressed protein	3,5	-0,4
At3g45470	zinc finger protein	3,5	-0,1
At5g54940	translation initiation factor, similar to Protein translation factor SU1	3,4	0,6
At4g11650	osmotin-like protein 34 (OSM34)	3,4	1,2

At3g15420	unknown protein	3,4	0,6
At3g57460	catalytic/ metal ion binding / metalloendopeptidase/ zinc ion binding	3,4	0,5
At3g18250	unknown protein	3,3	5,1
At4g27654	unknown protein	3,3	1,2
At2g08986	unknown protein	3,3	7,6
At2g28970	leucine-rich repeat protein kinase	3,3	-0,1
At4g28703	unknown protein	3,3	0,9
At2g43590	chitinase	3,2	4,1
At3g60270	uclacyanin, similar to At3g60280 UCC3	3,2	0,8
At5g48570	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3,2	4,0
At5g12020	17.6 kDa Class II Heat Shock Protein (HSP17.6II)	3,2	2,8
At2g05185	unknown protein	3,1	0,1
At5g38900	DSBA oxidoreductase family protein	3,1	3,4
At5g02690	expressed protein	3,1	0,4
At2g07981	expressed protein	3,1	7,6
At5g53740	expressed protein	3,1	1,3
At1g76650	calmodulin-related protein (CML38)	3,0	2,3
At3g47720	Similar To RCD One 4 (SRO4)	3,0	2,7
At3g55910	unknown protein	3,0	0,7
At5g63595	flavonol synthase	3,0	0,3
At5g08185	MIR162A, microRNA that targets DCL1	3,0	0,0
At1g54410	dehydrin family protein	3,0	-1,5
At2g17850	unknown protein	3,0	4,3
At4g35770	Arabidopsis Thaliana Senescence 1 (AtSEN1, DIN1)	2,9	1,0
At1g17990	12-oxophytodienoate reductase	2,9	0,6
At2g45920	U-box domain-containing protein, similar to At3g61390	2,9	-0,5
At5g24270	Calcineurin B-like Protein 4, CBL4, SOS3	2,9	1,1
At1g52710	cytochrome c oxidase-related	2,9	-0,6
At1g14870	expressed protein similar to PGPS/D12 [Petunia x hybrida]	2,9	1,5
At4g19370	expressed protein	2,9	-0,1
At4g23700	Cation/H <sup>+</sup> Exchanger 17 (AtCHX17), Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter	2,8	0,7
At4g37010	caltractin, putative, similar to AtCEN2 (CENTRIN2),	2,8	0,3
At2g38860	proteaseI (pfpl)-like protein (YLS5),	2,8	2,9
At5g04340	zink finger, C2H2, Cold Induced Zink Finger Protein 2, CZF2	2,8	2,5
At1g73260	trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein	2,8	0,5
At3g54640	Tryptophan Synthase Alpha (TSA1)	2,8	3,4
At1g75000	GNS1/SUR4 membrane family protein	2,8	1,8
At3g29000	calcium-binding EF hand family protein	2,8	3,8
At4g02520	glutathione S-transferase (AtGSTF2)	2,8	2,1
At2g23270	unknown protein	2,8	6,1
At1g25275	unknown protein	2,8	3,2
At5g54840	GTP-binding family protein	2,7	0,4
At5g65207	unknown protein	2,7	-0,2
At3g20340	expressed protein	2,7	0,0
At1g78080	AtERF#59 (RAP2.4)	2,7	0,6
At1g73540	Arabidopsis Thaliana Nudix Hydrolase Homolog 21 (AtNUDT21)	2,7	0,9
At3g03560	expressed protein	2,7	0,0
At3g22235	unknown protein	2,7	-0,1
At5g25250	unknown protein	2,7	5,6
At1g07350	transformer serine/arginine-rich ribonucleoprotein	2,7	1,1
At5g25560	zinc finger (C3HC4-type )	2,7	-0,6
At1g65960	Glutamate Decarboxylase 2 (GAD2)	2,7	0,2
At1g80920	DNAJ heat shock, J8 mRNA, nuclear gene encoding plastid protein	2,7	-0,1
At3g49780	Phytosulfokines 3 (PSK3)	2,6	-2,7
At1g27280	paired amphipathic helix repeat-containing protein	2,6	-0,2
At5g13080	WRKY75	2,6	2,6
At1g18330	MYB, Early Phytochrome Response 1 (EPR1)	2,6	1,2
At3g02240	expressed protein	2,6	0,8
At3g52040	unknown protein	2,6	0,5
At1g54050	17.4 kDa class III heat shock protein (HSP17.4-CIII)	2,6	1,9
At4g26120	ankyrin repeat family protein protein; similar to NPR1	2,6	1,3
At2g15960	unknown protein	2,6	-0,3
At3g25820	Terpene Synthase-Like Sequence-1,8-Cineole (ATTPS-CIN)	2,6	-1,7
At3g16220	similar to nucleic acid binding	2,6	-0,5
At1g58320	expressed protein	2,6	2,0
At2g46750	FAD-binding domain-containing protein	2,6	1,3
At5g02020	expressed protein	2,6	1,1

At4g36515	Trichohyalin like protein	2,6	0,4
At1g13520	unknown protein	2,5	4,0
At5g65060	MADS-box protein (MAF3), Agamous-like 70 (AGL70)	2,5	0,0
At1g33055	unknown protein	2,5	1,6
At5g27860	expressed protein	2,5	-0,4
At4g12760	similar to Os05g0417300	2,5	-0,3
At4g25400	basix helix-loop-helix (bHLH) family protein	2,5	-0,5
At2g02930	glutathione-s-transferase (AtGSTF3)	2,5	1,8
At2g16060	Arabidopsis Hemoglobin 1 (AHB1)	2,5	1,6
At4g11880	Agamous-Like 14 (AGL14)	2,5	-1,1
At2g44080	Argos-Like (ARL)	2,4	2,0
At5g59780	MYB59	2,4	-1,3
At3g61390	U-box domain-containing protein	2,4	0,6
At4g10265	wound-responsive protein	2,4	2,5
At3g21320	similar to ELF3 (EARLY FLOWERING 3)	2,4	0,3
At2g16790	shikimate kinase family protein	2,4	0,2
At5g19460	Arabidopsis thaliana Nudix hydrolase homolog 20 (AtNUDT20)	2,4	0,7
At1g20350	mitochondrial inner membrane translocase (AtTIM17-1)	2,4	0,7
At3g47680	transposable element gene	2,4	0,3
At1g34315	unknown protein	2,4	0,2
At5g22920	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	2,4	-0,7
At1g19020	unknown protein	2,4	3,6
At4g05210	bacterial transferase hexapeptide repeat-containing protein	2,4	0,4
At3g26690	Arabidopsis thaliana Nudix hydrolase homolog 13 (ATNUDT13)	2,4	-0,5
At1g53780	26S proteasome AAA-ATPase subunit	2,4	0,5
At2g01220	unknown protein	2,4	0,4
At3g51910	Heat Shock Transcription Factor A7A (HSFA7A)	2,4	-0,7
At2g45860	unknown protein	2,3	1,2
At3g54880	unknown protein	2,3	-0,4
At3g14200	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	2,3	2,2
At1g02220	ANAC003	2,3	1,6
At3g04070	ANAC047	2,3	0,5
At3g22240	unknown protein	2,3	1,1
At1g55780	heavy-metal-associated domain-containing protein	2,3	0,9
At5g45090	Phloem protein 2-A7 (ATPP2-A7)	2,3	0,8
At5g56100	glycine-rich protein / oleosin	2,3	-1,0
At2g40000	Arabidopsis Ortholog Of Sugar Beet HS1 Pro-1 2 (AtHSPRO2)	2,3	1,5
At5g27420	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	2,3	1,5
At5g65300	unknown protein	2,3	1,3
At2g19800	MYO-Inositol Oxygenase 2 (MIOX2)	2,3	0,1
At5g51390	unknown protein	2,3	-0,6
At4g23493	unknown protein	2,3	0,3
At5g51290	ceramide kinase-related	2,3	-0,2
At3g46130	MYB48	2,3	-0,6
At3g60140	Dark Inducible 2 (DIN2, SRG2)	2,3	7,0
At3g10180	kinesin motor protein-related; similar to ZCF125	2,3	0,3
At4g02482	chloroplast outer envelope GTP-binding protein	2,3	-0,2
At3g57230	Agamous-Like 16 (AGL16)	2,3	-0,6
At2g37970	SOUL-1	2,3	1,5
At3g24820	BSD domain-containing protein	2,3	0,0
At5g49450	Basic Leucine-Zipper 1 (AtbZIP1)	2,2	1,3
At2g45170	Autophagy 8E (AtATG8E)	2,2	1,1
At3g28210	putative zinc finger protein (PMZ)	2,2	7,1
At5g10050	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	2,2	1,7
At3g50360	Centrin2 (AtCEN2)	2,2	-0,1
At3g23250	AtMYB15	2,2	4,8
At5g62150	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	2,2	1,7
At1g21130	O-methyltransferase	2,2	0,0
At4g22950	Agamous-Like 19 (AGL19)	2,2	0,5
At3g45730	unknown protein	2,2	3,1
At5g53010	calcium-transporting ATPase	2,2	0,7
At3g23760	similar to transferase, transferring glycosyl groups	2,2	0,3
At5g37190	COP1-interacting protein 4 (CIP4)	2,2	0,2
At1g17630	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	2,2	-0,7
At5g24940	protein phosphatase 2C, putative / PP2C	2,2	0,4
At1g65690	harpin-induced protein-related, similar to NHL25 (NDR1/HIN1-LIKE 25)	2,2	1,0
At2g16720	AtMYB7	2,2	0,5

At1g18970	Germin Like Protein 4 (GLP4)	2,1	3,8
At5g24450	unknown protein	2,1	0,0
At5g18100	Copper/Zinc Superoxide Dismutase 3 (CSD3)	2,1	0,5
At4g11340	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain-containing protein	2,1	1,7
At2g06025	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	2,1	-0,4
At5g39180	germin-like protein	2,1	5,9
At3g55890	yippee family protein	2,1	1,5
At5g22950	VPS24.1	2,1	-0,5
At3g54150	embryo-abundant protein-related	2,1	3,1
At5g41740	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	2,1	0,8
At5g50665	unknown protein	2,1	0,0
At4g28460	unknown protein	2,1	3,2
At5g43620	similar to zinc finger (C2H2-type) family protein	2,1	1,5
At4g07675	unknown protein	2,1	0,5
At3g25830	Terpene Synthase-Like Sequence-1,8-Cineole (AtTPS-CIN)	2,1	-1,9
At2g35730	heavy-metal-associated domain-containing protein	2,1	1,6
At1g74500	bHLH family protein	2,1	1,4
At4g27652	unknown protein	2,1	1,7
At5g03905	hesB-like domain-containing protein; Identical to IscA-like 2	2,1	0,9
At5g26770	unknown protein	2,1	-0,1
At1g26420	FAD-binding domain-containing protein	2,0	3,4
At3g28970	Antiauxin-Resistant 3 (AAR3)	2,0	0,2
At3g14140	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	2,0	-0,3
At1g75980	similar to Os02g0120400	2,0	0,5
At2g46390	unknown protein	2,0	0,7
At3g19660	unknown protein	2,0	0,3
At2g17640	Serine Acetyltransferase 106 (AtSERAT3, SAT-106)	2,0	0,2
At3g42590	transposable element gene	2,0	-0,8
At3g44970	CYP708A2	2,0	0,6
At5g10070	RNase L inhibitor protein-related	2,0	0,6
At1g72690	unknown protein	2,0	0,4
At2g13975	transposable element gene	2,0	-0,1
At5g36180	Serine Carboxypeptidase-Like 1 (SCPL1)	2,0	-2,3
At3g23170	similar to ATBET12	2,0	2,2
At1g22190	ERF #	2,0	0,5
At1g58180	Beta Carbonic Anhydrase 6 (AtBCA6)	2,0	-0,3
At3g54580	proline-rich extensin-like family protein	-2,0	-1,3
At3g11870	protein kinase-related; similar to IRE1A	-2,0	-0,3
At5g67400	PER73	-2,0	-2,1
At5g48180	kelch repeat-containing protein	-2,0	1,1
At4g28250	Arabidopsis Thaliana Expansin B3 (AtEXPB3)	-2,0	0,9
At4g34150	C2 domain-containing protein	-2,0	0,5
At5g06640	proline-rich extensin-like family protein	-2,0	-1,2
At5g41040	transferase family protein	-2,1	-0,1
At3g44990	Xyloglucan Endo-Transglycosyltransferase-Related 8 (XTR8)	-2,1	-0,5
At1g05250	peroxidase, Identical to Peroxidase 1/2 precursor (PER2)	-2,1	-2,2
At2g11810	Monogalactosyl Diacylglycerol Synthase 3 (AtMGD3)	-2,1	-2,4
At3g14310	pectin methylesterase (AtPME3)	-2,1	0,3
At2g38940	Phosphate Transporter 2 (AtPT2)	-2,1	-1,5
At5g22090	unknown protein	-2,1	-0,1
At4g38680	Arabidopsis Thaliana Cold Shock Protein 2 (AtCSP2, CSDP2)	-2,1	-1,4
At4g28530	ANAC074	-2,1	-1,6
At4g15390	transferase family protein	-2,2	-2,4
At5g39190	Germin-Like Protein 2A (GLP2a)	-2,2	-1,8
At5g45490	disease resistance protein-related	-2,2	-1,6
At4g25220	transporter	-2,2	-1,7
At5g10170	MYO-Inositol-1-Phosphate Synthase 3 (AtMIPS3)	-2,2	0,7
At2g43820	UDP-Glucosyltransferase 74F2 (UGT74F2)	-2,2	-0,4
At4g40090	Arabinogalactan-Protein 3 (AGP3)	-2,2	-1,8
At5g09520	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	-2,3	-0,3
At5g39400	pollen specific phosphatase	-2,3	-0,7
At5g22410	PER60	-2,3	-1,1
At4g25620	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	-2,3	-1,3
At3g28510	AAA-type ATPase family protein	-2,3	-0,9
At2g19970	pathogenesis-related protein	-2,3	-2,8
At5g24770	Vegetative Storage Protein 2 (VSP2)	-2,3	1,2
At1g54970	Proline-Rich Protein 1 (AtPRP1)	-2,4	-1,2

At1g05240	peroxidase, putative; Identical to Peroxidase 1/2 precursor (PER2)	-2,4	-2,3
At3g48100	Arabidopsis Thaliana Response Regulator 2 (AtARR5)	-2,4	-2,5
At3g48340	cysteine-type peptidase	-2,4	-1,2
At1g13420	sulfotransferase family protein	-2,4	-2,8
At4g26010	PER44	-2,5	-2,3
At3g47960	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-2,5	0,5
At5g04200	Metacaspase 9 (AtMC9)	-2,5	-0,6
At1g31710	copper amine oxidase	-2,6	-1,5
At3g62680	Arabidopsis Thaliana Proline-Rich Protein 3 (AtPRP3)	-2,6	-2,1
At4g15160	LTP family protein; similar to CWLP	-2,6	-1,6
At2g19990	pathogenesis-related protein 1 like (PR-1-like)	-2,6	-2,6
At5g23990	Ferric Reduction Oxidase 5 (AtFRO5)	-2,6	-1,9
At4g04460	aspartyl protease family protein	-2,7	-1,0
At5g20150	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein	-2,7	-2,9
At2g37040	phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL1)	-2,7	0,6
At2g22510	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	-2,8	-0,9
At1g67750	pectate lyase family protein similar to At4g24780	-3,0	-1,0
At1g19200	senescence-associated protein-related	-3,2	-0,7
At5g01220	Sulfo-Quinovosyl-Diacylglycerol 2 (SQD2)	-3,2	-2,7
At2g26400	Acireductone Dioxygenase (AtARD3)	-3,3	-2,1
At3g03530	Nonspecific Phospholipase C4 (NPC4)	-3,3	-1,0
At5g09530	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	-3,5	0,5
At4g12545	LTP family protein; similar to AIR1	-3,5	-3,8
At5g20790	unknown protein	-3,7	-3,3
At4g12550	AIR1, LTP family protein	-3,8	-4,7
At5g03545	unknown protein	-3,8	-2,7
At3g09922	Induced by Phosphate Starvation 1 (AtIPS1)	-4,0	-3,1
At1g17710	phosphoric monoester hydrolase	-4,8	-3,0

## 6.2 Transkriptionsprofil von *A. thaliana* Wurzeln drei Tage nach *Vl43*-Infektion

Tabelle 8: Transkriptionsprofil von *A. thaliana* Wurzeln drei Tage nach *Vl43*-Infektion. Die Induktionsfaktoren der differentiellen Expression der Transkripte einen Tag nach Infektion sind in der Spalte *3dpi* aufgelistet. Die Liste umfasst alle differentiell exprimierte Gene mit einer mindest Induktion bzw. Repression der Transkription von 2,0 und einer Signifikanzschwelle von  $p \leq 0,1$ . Positive Werte bedeuten, dass diese Transkripte nach *Vl43*-Infektion induziert sind (grüne Beschriftung). Negative Werte bedeuten, dass diese Transkripte nach *Vl43*-Infektion reprimiert sind (rote Beschriftung). Als zusätzliche Information sind die Induktionswerte des ein Tages Zeitpunktes (*1dpi*) zu den entsprechend nach drei Tagen differentiell regulierten Transkripten aufgelistet. Diese ein Tages Werte unterliegen nicht den Grenzwertkriterien (Induktion  $\geq 2,0$  Signifikanzschwelle  $p \leq 0,1$ ).

AGI	Gene/ Beschreibung	3dpi	1dpi
At1g32350	Alternative Oxidase 1 D (AOX1D)	13,2	1,1
At2g30750	CYP71A12	12,6	6,8
At2g38870	protease inhibitor	11,4	5,3
At4g12735	expressed protein	11,2	-0,9
At1g05680	UDP-Glucosyltransferase	9,9	-0,7
At1g26390	FAD-binding domain-containing protein	9,5	6,6
At1g02930	glutathione S-transferase (AtGSTF3, ERD11)	9,3	5,6
At2g43510	trypsin inhibitor	9,2	8,4
At2g41730	expressed protein	9,2	-0,3
At2g30770	CYP71A13	9,2	4,6
At3g60420	expressed protein	9,1	0,6
At4g37370	CYP81D8	9,1	0,0
At2g38823	expressed protein	9,1	-0,4



AGI	Gene/ Beschreibung	3dpi	1dpi
At1g17180	glutathione S-transferase (AtGSTU25)	9,0	0,1
At1g26380	FAD-binding domain-containing protein	8,8	7,1
At5g57510	expressed protein	8,6	3,1
At2g03760	Steroid Sulfotransferase 1 (AtST1)	8,5	-0,5
At4g08555	expressed protein	8,1	-0,5
At5g43450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	8,0	1,2
At2g26560	Phospholipase A 2A (PLA2A)	7,8	4,3
At5g24640	expressed protein	7,7	-0,7
At2g21640	expressed protein	7,6	0,5
At2g08986	expressed protein	7,6	3,3
At2g07981	expressed protein	7,6	3,1
At1g69920	glutathione S-transferase (AtGSTU12)	7,5	0,9
At2g41100	Calmodulin Like 4 (AtCAL4)	7,4	0,0
At3g28210	zinc finger (AN1-like) family protein	7,1	2,2
At5g12030	17.7 kDa class II heat shock protein 17.6A (AtHSP17.6A)	7,0	5,0
At1g76600	expressed protein	7,0	1,1
At3g60140	glycosyl hydrolase family 1 protein (BGLU30, din2)	7,0	2,3
At3g46080	zinc finger (C2H2 type), similar ZAT7	6,9	0,1
At1g07400	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)	6,9	3,1
At5g38910	germin-like protein	6,8	4,6
At5g57220	CYP81F2	6,8	3,8
At2g18193	AAA-type ATPase family protein	6,8	-0,6
At4g33666	expressed protein	6,5	0,1
At3g26830	CYP71B15, PAD3	6,5	-0,8
At1g02920	glutathione S-transferase (AtGSTF7, GST11)	6,4	4,4
At2g18680	expressed protein	6,4	1,7
At5g52720	heavy-metal-associated domain-containing protein	6,3	1,4
At1g72900	disease resistance protein (TIR-NBS class)	6,3	0,6
At4g05020	NAD(P)H Dehydrogenase B2 (NDB2)	6,3	-0,4
At3g22370	Alternative Oxidase 1A (AOX1A)	6,3	-0,2
At5g39100	germin-like protein (GLP6)	6,2	1,4
At2g23270	expressed protein	6,1	2,8
At5g42830	similar to anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase	6,1	1,1
At5g13210	expressed protein	6,0	-1,1
At5g59820	zinc finger family protein (ZAT12, RHL41)	6,0	1,9
At5g39180	germin-like protein	5,9	2,1
At5g39150	germin-like protein	5,9	1,5
At5g51440	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M)	5,9	1,4
At1g14550	peroxidase anionic, (PER5)	5,7	1,5
At4g25200	23.6 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.6-M)	5,7	3,5
At5g42380	Calmodulin Like 37/39 (CML37,CML39)	5,7	1,1
At3g12580	Heat Shock Protein 70 (HSP70)	5,7	0,4
At2g29500	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI)	5,7	2,2
At5g25250	expressed protein	5,6	2,7
At2g44580	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	5,6	0,0
At1g17170	glutathione S-transferase (AtGSTU24)	5,5	-0,7
At2g47520	ERF #071	5,5	2,2
At3g56710	Sigma Factor Binding Protein 1 (SIB1)	5,4	1,1
At5g54100	band 7 family protein similar to stomatin-like protein	5,3	-0,5
At3g46090	zinc finger family protein (ZAT7)	5,3	0,0
At1g55230	expressed protein	5,2	0,1
At3g13080	Multidrug Resistance Protein 3 (AtMRP3)	5,2	-0,1
At1g26410	FAD-binding domain-containing protein	5,1	4,6
At3g18250	expressed protein	5,1	3,3
At5g52640	Heat Shock Protein (AtHSP90.1, HSP81-1)	5,0	1,2
At3g47480	calcium-binding EF hand family protein	5,0	2,4
At4g10250	small heat shock protein (HSP22.0-ER)	4,9	3,4
At5g40000	AAA-type ATPase family protein	4,9	0,1
At4g25380	zinc finger (AN1-like) family protein	4,8	1,2
At3g23250	myb family transcription factor (MYB15)	4,8	2,2
At2g32020	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	4,8	0,4
At5g43570	serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	4,8	2,1
At5g39580	peroxidase, putative identical to PER62	4,8	1,7
At3g04120	Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase C Subu. (GAPC-1)	4,7	0,2
At1g72940	disease resistance protein (TIR-NBS class)	4,7	0,2
At3g63380	calcium-transporting ATPase, putative / Ca(2+)-ATPase (ACA12)	4,7	1,4

AGI	Gene/ Beschreibung	3dpi	1dpi
At5g22530	armadillo/beta-catenin repeat family protein	4,6	1,7
At3g09350	expressed protein	4,6	1,0
At2g18690	expressed protein	4,6	1,6
At1g53625	expressed protein	4,6	1,6
At2g15220	similar to plant basic secretory protein (BSP) family protein	4,6	3,7
At3g50930	AAA-type ATPase family protein, Cytoch BC1 Synthesis (BCS1)	4,6	1,3
At5g22140	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	4,6	-0,9
At5g40590	DC1 domain-containing protein	4,5	0,6
At1g05060	expressed protein	4,5	0,1
At3g29970	germination protein-related	4,5	4,6
At3g54530	expressed protein	4,4	-0,6
At5g39670	calcium-binding EF hand family protein	4,4	1,8
At2g17850	senescence-associated family protein	4,3	3,0
At5g06860	Polygalacturonase Inhibiting Protein 1 (PGIP1)	4,3	1,1
At1g02520	P-Glycoprotein 11 (PGP11)	4,3	0,0
At1g35210	expressed protein	4,2	1,6
At2g43000	no apical meristem (NAM) family protein (ANAC042)	4,2	3,6
At5g10040	expressed protein	4,2	1,8
At5g06730	peroxidase (PER54)	4,2	1,5
At1g75830	Low-molecular-weight cysteine-rich 67 (LCR67, PDF1.1)	4,1	1,4
At5g27760	hypoxia-responsive family protein	4,1	1,6
At1g56240	Phloem protein 2-B13 (AtPP2-B13), F-box protein PP2-B13	4,1	-0,1
At2g43590	Chitinase	4,1	3,2
At1g14540	peroxidase anionic, similar (PER5)	4,0	5,2
At5g38940	germin-like protein, subfamily 1 member 11	4,0	1,1
At5g64120	peroxidase, cell wall bound	4,0	5,6
At5g22300	Nitrilase 4 (NIT4)	4,0	0,7
At3g09440	Heat Shock Cognate 70 kDa Protein 3 (HSC70-3)	4,0	0,0
At5g39120	germin-like protein	4,0	0,8
At4g39950	CYP79B2	4,0	0,7
At5g40990	GDSL Lipase 1 (GLIP1)	4,0	1,2
At5g48570	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FK506-binding protein (ROF1)	4,0	3,2
At1g13520	expressed protein	4,0	2,5
At2g04070	transporter; similar to ATDTX1, antiporter, multidrug efflux pump	3,9	-0,4
At5g13370	auxin-responsive GH3 family protein	3,9	0,1
At1g18970	germin-like protein (GLP4)	3,8	2,1
At1g57630	disease resistance protein (TIR class)	3,8	2,5
At3g53160	UDP-Glucosyltransferase 73C7 (UGT73C7)	3,8	2,2
At5g43580	protease inhibitor, serine-type endopeptidase inhibitor	3,8	5,6
At3g24500	Multiprotein Bridging Factor 1 (AtMBF1C)	3,8	4,7
At3g29000	calcium-binding EF hand family protein	3,8	2,8
At2g04050	MATE efflux family protein; similar to ATDTX1	3,8	-0,3
At4g15760	monooxygenase, putative (MO1)	3,8	-0,7
At4g05030	heavy-metal-associated domain-containing protein	3,7	0,1
At3g47540	Chitinase	3,7	-0,6
At2g14247	expressed protein	3,7	1,8
At1g02530	P-Glycoprotein 12 (PGP12)	3,7	0,0
At5g05410	ERF #045 (DREB2A)	3,7	2,8
At4g19810	glycosyl hydrolase family 18 protein, similar to chitinase	3,6	0,6
At3g25250	protein kinase family protein (AGC2, OXI1)	3,6	-0,4
At5g59720	Heat Shock Protein 18.2 (HSP18.2)	3,6	1,3
At4g18950	ankyrin protein kinase	3,6	0,5
At1g19020	expressed protein	3,6	2,4
At2g40340	ERF #048 (DREB2C)	3,5	-0,5
At1g51010	expressed protein	3,5	1,6
At5g22800	aminoacyl-tRNA synth protein, Embryo Defective 1030 (EMB1030)	3,5	-0,7
At5g39050	transferase family protein	3,5	0,5
At4g36430	peroxidase (PER49)	3,5	-1,4
At5g59320	lipid transfer protein (AtLtp1.12, LTP3)	3,5	-0,4
At1g69930	glutathione S-transferase (AtGSTU11)	3,5	-0,7
At1g43910	AAA-type ATPase family protein	3,4	-0,7
At4g36880	Cysteine Proteinase1 (CP1)	3,4	0,4
At5g38900	DSBA oxidoreductase family protein	3,4	3,1
At3g28580	AAA-type ATPase family protein	3,4	0,3
At3g53230	AAA -type ATPase family, Cell Division Cycle protein 48 (CDC48)	3,4	0,1
At3g54640	Tryptophan Synthase Alpha Subunit (TSA1)	3,4	2,8

AGI	Gene/ Beschreibung	3dpi	1dpi
At1g26420	FAD-binding domain-containing protein	3,4	2,0
At3g21720	Isocitrate Lyase (ICL)	3,4	1,2
At5g22270	expressed protein	3,3	1,9
At3g16530	legume lectin family protein	3,3	1,6
At3g16150	L-asparaginase, putative / L-asparagine amidohydrolase	3,3	1,5
At1g67980	Caffeoyl-CoA 3-O-Methyltransferase (CCOAMT)	3,3	1,7
At2g43570	Chitinase	3,3	4,9
At2g29460	glutathione S-transferase (AtGSTU4, GST22)	3,3	1,3
At5g59510	Rotundifolia-Like 5 (DVL18/RTFL5)	3,3	0,9
At1g05560	UDP-Glycosyltransferase 75B1 (UGT75B1)	3,3	0,1
At1g14200	zinc finger (C3HC4-type RING finger)	3,2	3,9
At2g32190	expressed protein	3,2	0,2
At1g25275	expressed protein	3,2	2,8
At5g26340	hexose transporter, Sugar Transport Protein 13 (STP13)	3,2	-0,1
At1g33860	expressed protein	3,2	0,8
At4g28460	expressed protein	3,2	2,1
At5g51190	ERF #105	3,2	1,8
At2g04040	Detoxifying Multidrug Efflux Carrier (AtDTX1)	3,2	0,9
At5g47220	ERF #101 (ERF2)	3,1	-0,3
At4g39670	glycolipid binding/transporter; similar to (ACD11)	3,1	1,0
At4g20830	FAD-binding domain-containing protein	3,1	0,2
At5g49480	CA2+-Binding Protein 1 (ACP1)	3,1	0,4
At3g14620	CYP72A8	3,1	0,1
At1g32920	expressed protein	3,1	0,7
At1g26910	60S ribosomal protein L10 (RPL10B)	3,1	0,0
At1g74590	glutathione S-transferase (AtGSTU10)	3,1	3,7
At3g45730	expressed protein	3,1	2,2
At5g56000	Heat Shock Protein 81-4 (HSP81-4)	3,1	0,0
At5g56350	pyruvate kinase: cytosolic isozyme	3,1	-1,0
At3g54150	embryo-abundant protein	3,1	2,1
At5g57560	Xyloglucan Endotransglycosylase (TCH4, XTH22)	3,1	0,4
At2g32200	expressed protein	3,1	-0,1
At1g72910	disease resistance protein (TIR-NBS class)	3,1	-0,4
At5g14730	expressed protein	3,1	-0,6
At3g03270	universal stress protein (USP)/early nod ENOD18 family protein	3,0	1,5
At1g30700	FAD-binding domain-containing protein	3,0	0,7
At5g56030	Heat Shock Protein 81-2 (HSP81-2, ERD8)	3,0	-0,1
At5g48540	33 kDa secretory protein-related, identical to CRRSP55	3,0	1,2
At1g51030	expressed protein	3,0	1,1
At1g60730	aldo/keto reductase family protein, similar to ATB2	3,0	-0,1
At5g18470	curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	3,0	0,0
At4g25810	Xyloglucan Endotransglycosylase 6 (XTR6, XTH23)	3,0	-0,3
At1g66600	WRKY63	3,0	0,8
At1g17290	Alanine Aminotransferase 1 (ALAAT1)	3,0	0,0
At4g37910	Mitochondrial Heat Shock Protein 70-1 (MTHSC70-1)	2,9	-0,8
At2g38860	proteaseI (pfpl)-like protein (YLS5)	2,9	2,8
At3g44300	Nitrilase 2 (NIT2)	2,9	0,5
At5g38930	germin-like protein	2,9	0,5
At5g09570	expressed protein	2,9	0,1
At1g74310	Heat Shock Protein 101 (HSP101)	2,9	1,9
At3g50770	Calmodulin Like 41 (CML41)	2,9	0,0
At5g56010	Heat Shock Protein 81-3 (HSP81-3)	2,9	0,0
At5g06320	harpin-induced family protein, NDR1/HIN1-like protein 3	2,9	0,7
At2g04160	subtilisin-like protease (AIR3)	2,9	-0,3
At3g22910	calcium-transporting ATPase, putative / Ca(2+)-ATPase (ACA13)	2,9	1,6
At2g43610	glycoside hydrolase family 19 protein, similar to chitinase	2,9	0,5
At3g48450	nitrate-responsive NOI protein	2,9	0,0
At4g39675	expressed protein	2,8	3,7
At5g22555	expressed protein	2,8	1,6
At1g27730	zinc finger family protein (ZAT10)	2,8	1,1
At2g15490	UDP-Glycosyltransferase 73B4 (UGT73B4)	2,8	-0,3
At5g12020	17.6 kDa class II heat shock protein (HSP17.6II)	2,8	3,2
At4g22690	CYP706A1	2,8	0,1
MIR397a	Arabidopsis thaliana miR397 stem-loop	2,8	0,6
At3g48850	mitochondrial phosphate transporter	2,8	0,2
At1g66580	60S ribosomal protein L10 (RPL10C)	2,8	0,1

AGI	Gene/ Beschreibung	3dpi	1dpi
At1g78340	glutathione S-transferase (AtGSTU22)	2,8	0,7
At3g18290	Embryo Defective 2454 (EMB2454)	2,8	-0,4
At4g08770	peroxidase (PER37)	2,8	-1,4
At3g55790	expressed protein	2,7	4,6
At5g17860	Calcium Exchanger 7 (CAX7); calcium:sodium antiporter	2,7	0,0
At3g50910	expressed protein	2,7	-0,6
At5g22520	expressed protein	2,7	1,2
At1g65500	expressed protein	2,7	1,9
At1g59860	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-C1)	2,7	1,8
At4g24380	hydrolase	2,7	0,6
At1g07135	glycine-rich protein	2,7	0,5
At5g03210	expressed protein	2,7	0,5
At3g47720	Similar To RCD One 4 (SRO4)	2,7	3,0
At5g20230	Blue-Copper-Binding Protein (AtBCB)	2,6	0,7
At5g13320	avrPphB Susceptible 3 (PBS3 GDG1 WIN3)	2,6	1,4
At2g36460	Fructose-bisphosphate aldolase class-I	2,6	0,2
At1g10170	NF-X-Like 1 (AtNFXL1)	2,6	-0,8
At5g08790	no apical meristem (NAM) family protein (ANAC081, ATAF2)	2,6	-0,1
At4g14680	Sulfate Adenylyltransferase 3 / ATP-sulfurylase 3 (APS3)	2,6	-0,5
At4g21840	methionine sulfoxide reductase	2,6	-0,5
At2g03230	expressed protein	2,6	0,2
At5g39110	germin-like protein	2,6	-0,2
At4g23190	Cystein-Rich RLK11 (AT-RLK3, CRK11)	2,6	1,4
At1g77120	Alcohol Dehydrogenase 1 (ADH1, AtADH)	2,6	1,1
At4g08950	phosphate-responsive protein, putative (EXO)	2,6	-0,4
At3g16330	expressed protein	2,6	-0,6
At5g13080	WRKY75	2,6	2,6
At4g04610	APS Reductase 1(APR1), PAPS reductase homolog 19(PRH19)	2,6	-0,9
At3g01970	WRKY45	2,6	3,7
At4g10265	wound-responsive protein	2,5	2,4
At5g64250	2-nitropropane dioxygenase family / NPD family	2,5	0,3
At4g01870	toIB protein-related	2,5	-1,0
At2g24180	CYP71B6	2,5	1,4
At3g17611	Rhomboid-Like Protein 14 (AtRBL14)	2,5	0,6
At5g53820	expressed protein	2,5	1,6
At4g08780	peroxidase (PER38)	2,5	-1,3
At1g72330	Alanine Aminotransferase 2 (ALAAAT2)	2,5	-0,2
At4g22530	embryo-abundant protein	2,5	-0,4
At3g54820	Plasma Membrane Intrinsic Protein 2-5 (PIP2-5, PIP2D)	2,5	0,2
At5g04340	zinc finger family protein (CZF2, ZAT6)	2,5	2,8
At1g01720	no apical meristem (NAM) family protein (ANAC002)	2,5	0,7
At3g60120	glycosyl hydrolase family 1 protein (BGLU27), similar to PEN2	2,5	-0,1
At2g28400	expressed protein	2,4	1,5
At1g15415	expressed protein	2,4	1,0
At4g03320	Transl at the Inner Envelope Membrane of Chloropl 20-IV (TIC20-IV)	2,4	-0,2
At5g17990	Phosphoribosylanthranilate Transferase 1 (PAT1, TRP1)	2,4	0,5
At5g05340	peroxidase (PER52)	2,4	0,4
At4g34710	Arginine Decarboxylase 2 (SPE2, ADC2)	2,4	-0,5
At1g43800	acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase, similar to SSI2	2,4	1,0
At5g62480	glutathione S-transferase (AtGSTU9, GST14)	2,4	1,1
At5g60800	heavy-metal-associated domain-containing protein	2,4	0,5
At5g19550	Aspartate Aminotransferase 2 (ASP2, AAT2)	2,4	0,4
At5g48430	expressed protein	2,4	-0,4
At4g14365	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	2,4	2,1
At3g25230	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FK506-binding protein (ROF1)	2,4	1,0
At1g56600	galactinol synthase (GolS2: stachyose biosynthesis)	2,4	-0,1
At4g01700	Chitinase	2,4	-1,1
At1g69530	Expansin A1 (At-EXP1)	2,4	-0,2
At2g46600	calcium-binding EF hand family protein	2,4	1,0
At1g15170	MATE efflux family protein	2,4	0,5
At2g01340	expressed protein	2,4	0,4
At1g11330	S-locus lectin protein kinase family protein	2,4	-0,7
At2g34650	protein kinase PINOID (PID) identical to protein kinase PINOID	2,4	-0,4
At5g25930	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein	2,3	0,2
At5g05730	Anthranilate Synthase Alpha Subunit (ASA1)	2,3	1,6
At4g15530	pyruvate phosphate dikinase family protein	2,3	0,6

AGI	Gene/ Beschreibung	3dpi	1dpi
At1g76650	calcium-binding EF hand family protein	2,3	3,0
At3g07770	heat shock protein-related	2,3	0,0
At2g41180	sigA-binding protein-related	2,3	0,0
At2g18150	peroxidase	2,3	-1,2
At5g02780	ln2-1 protein	2,3	0,9
At3g10815	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	2,3	0,7
At4g30800	40S ribosomal protein S11 (RPS11B)	2,3	0,3
At3g48310	CYP71A22	2,3	0,6
At5g24660	expressed protein	2,3	0,2
At4g03430	pre-mRNA splicing factor-related	2,3	0,1
At3g24170	glutathione reductase	2,3	-0,4
At1g80840	WRKY40	2,3	1,3
At5g10180	sulfate transporter	2,3	-1,4
At5g52670	heavy-metal-associated domain-containing protein	2,3	1,6
At1g74080	myb family transcription factor (MYB122)	2,3	1,3
At1g71520	ERF #020	2,3	0,3
At5g03030	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	2,3	0,1
At1g55020	Lipoxygenase 1 (LOX1)	2,2	-0,1
At1g13480	expressed protein	2,2	1,3
At4g18100	60S ribosomal protein L32 (RPL32A)	2,2	0,1
At1g79550	phosphoglycerate kinase	2,2	-0,2
At3g23170	expressed protein	2,2	2,0
At4g33560	expressed protein	2,2	1,1
At3g28340	galactinol synthase (homogalacturonan biosynthesis)	2,2	-0,1
At3g14200	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	2,2	2,3
At3g26200	CYP71B22	2,2	0,0
At4g24110	expressed protein	2,2	1,2
At4g27950	ERF #066	2,2	0,5
At4g33550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	2,2	0,0
At5g06090	phospholipid/glycerol acyltransferase family protein	2,2	-0,9
At2g39350	ABC transporter family protein	2,2	-0,9
At1g26240	proline-rich extensin-like family protein	2,2	0,2
At5g16980	NADP-dependent oxidoreductase	2,1	0,7
At5g58070	lipocalin	2,1	0,6
At1g12805	expressed protein	2,1	1,9
At1g24909	Anthranilate Synthase Beta Subunit (ASA2)	2,1	1,7
At4g10270	wound-responsive protein	2,1	1,7
At1g23100	10 kDa chaperonin	2,1	0,8
At5g67340	armadillo/beta-catenin repeat family protein	2,1	0,3
At3g22890	Sulfate Adenylyltransferase 1 / ATP-sulfurylase 1 (APS1)	2,1	-0,6
At1g23550	expressed protein	2,1	0,4
At1g77450	no apical meristem (NAM) family protein	2,1	0,2
At5g24570	expressed protein	2,1	0,6
At4g02520	glutathione S-transferase	2,1	2,8
At3g44260	CCR4-NOT transcription complex protein	2,1	1,2
At3g23230	ERF #098 (TDR1)	2,1	-0,2
At2g26530	expressed protein	2,1	1,3
At2g33680	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	2,1	0,0
At3g08590	phosphoglycerate mutase	2,1	-0,3
At1g47960	Cell Wall / Vacuolar Inhibitor of Fructosidase 1 (ATC/VIF1, C/VIF1)	2,0	1,5
At3g49580	expressed protein	2,0	1,1
At2g20940	expressed protein	2,0	0,5
At5g13190	expressed protein	2,0	0,0
At2g44080	expressed protein	2,0	2,4
At2g26150	heat shock transcription factor family protein	2,0	0,6
At5g11520	Aspartate Aminotransferase 3 (ASP3, YLS4)	2,0	0,2
At4g36500	expressed protein	2,0	-0,1
At5g19440	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, CAD family	2,0	-0,5
At5g61490	expressed protein	2,0	1,1
At4g27585	band 7 family protein similar to stomatin-like protein	2,0	0,0
At2g07671	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase: ATP synthase subunit C	2,0	1,6
At1g67000	protein kinase family protein	2,0	1,5
At3g05400	sugar transporter	2,0	1,1
At3g28930	avrRpt2-induced AIG2 protein (AIG2)	2,0	1,0
At1g02850	glycosyl hydrolase family 1 protein (BGLU11)	2,0	0,5
At5g26300	MATH domain-containing protein	-2,0	0,0

AGI	Gene/ Beschreibung	3dpi	1dpi
At1g78880	balbiani ring 1-related / BR1-related protein	-2,0	-1,3
At5g57785	expressed protein	-2,0	0,9
At4g35750	Rho-GTPase-activating protein-related	-2,0	-0,2
At5g65640	Beta HLH Protein 93 (BHLH093)	-2,0	-0,5
At4g31080	expressed protein	-2,0	-0,6
At5g45500	expressed protein	-2,0	-1,8
At5g45080	Phloem protein 2-A6 (ATPP2-A6)	-2,0	0,4
At2g46220	expressed protein	-2,0	0,2
At5g53250	Arabinogalactan Protein 22 (AtAGP22)	-2,0	-0,4
At2g20080	expressed protein	-2,1	-0,1
At5g44410	FAD-binding domain-containing protein	-2,1	-0,6
At5g67400	peroxidase (PER73)	-2,1	-2,0
At3g15450	expressed protein	-2,1	1,9
At4g02075	Pitchoun 1 (PIT1)	-2,1	1,1
At1g03850	glutaredoxin family protein; Identical to GRXS13	-2,1	0,2
At2g14560	Late Up in Response to Hyaloperonospora Parasitica (LURP1)	-2,1	-1,1
At5g47950	transferase family protein	-2,1	-1,8
At3g62680	Proline-Rich Protein 3 (AtPRP3)	-2,1	-2,6
At3g16240	Delta Tonoplast Intrinsic Protein (AtTIP2, AQP1, DELTA-TIP1)	-2,1	-1,0
At1g28400	expressed protein	-2,1	-1,3
At5g57630	CBL-Interacting Protein Kinase 21 (CIPK21)	-2,1	1,7
At5g57570	expressed protein	-2,1	0,3
At3g49940	LOB Domain-Containing Protein 38 (LBD38)	-2,1	-0,2
At1g21920	MORN repeat-containing protein	-2,1	0,5
At2g47400	Chloroplast Peptide 12-1 (CP12-1)	-2,1	0,7
At2g33830	dormancy/auxin associated family protein	-2,1	0,9
At1g73270	Serine Carboxypeptidase-Like 6 (SCPL6)	-2,1	0,6
At3g09220	Laccase 7 (LAC7)	-2,1	-0,1
At4g08290	nodulin MtN21 family protein	-2,1	0,2
At3g29240	expressed protein	-2,1	0,0
At5g59305	expressed protein	-2,2	0,9
At5g19970	expressed protein	-2,2	-0,4
At3g51950	zinc finger (CCCH-type) family protein	-2,2	-1,1
At4g15400	transferase family protein	-2,2	-1,3
At1g22530	Patellin-2 (PATL2)	-2,2	-1,7
At4g07820	pathogenesis-related protein; similar to PR1	-2,2	1,8
At1g63170	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-2,2	-0,3
At4g15393	CYP702A5	-2,2	-0,4
At3g63210	Mediator of ABA-Regulated Dormancy 1 (MARD1)	-2,2	-0,7
At5g22020	strictosidine synthase family protein	-2,2	-0,8
At2g26410	calmodulin binding, IQ-Domain 4 (IQD4)	-2,2	-1,1
At1g66280	glycosyl hydrolase family 1 protein (BGLU22)	-2,2	-1,2
At3g32980	peroxidase (PER32)	-2,2	-1,8
At3g61035	CYP76C2	-2,2	-0,9
At2g29750	UDP-Glucosyltransferase	-2,2	-1,8
At1g05250	peroxidase, Identical to PER2	-2,2	-2,1
At4g19160	expressed protein	-2,2	-0,3
At2g36090	F-box family protein	-2,2	-0,4
At5g14390	expressed protein	-2,2	-0,6
At1g77530	O-methyltransferase family 2 protein	-2,2	-0,8
At1g48300	expressed protein	-2,2	0,4
At1g73300	Serine Carboxypeptidase-Like 2 (SCPL2)	-2,2	-0,3
At1g56280	induced by progressive drought stress (AtDI19)	-2,2	-0,4
At5g46890	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	-2,2	-0,6
At5g20700	senescence-associated protein-related	-2,2	-0,4
At3g45710	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-2,2	-0,6
At1g22500	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-2,2	-0,9
At2g47360	expressed protein	-2,2	-1,6
At5g17820	peroxidase (PER57)	-2,2	-1,6
At5g56870	Beta-Galactosidase 4 (BGAL4)	-2,2	1,3
At2g18280	Tubby Like Protein 2 (AtTLP2)	-2,2	0,1
At5g47450	Delta Tonoplast Intrinsic Protein (AtTIP2;3, DELTA-TIP3)	-2,2	-0,6
At3g22650	F-box family protein	-2,2	1,1
At5g61590	ERF #107	-2,2	0,5
At4g26010	peroxidase (PER44)	-2,3	-2,5
At1g49860	glutathione S-transferase (AtGSTF14)	-2,3	1,3

AGI	Gene/ Beschreibung	3dpi	1dpi
At5g04950	nicotianamine synthase; Identical to NAS1	-2,3	0,0
At3g15670	late embryogenesis abundant protein, putative / LEA protein	-2,3	-1,4
At2g25150	transferase family protein	-2,3	0,2
At4g29270	acid phosphatase class B family protein	-2,3	0,1
At1g05240	peroxidase, Identical to PER2	-2,3	-2,4
At4g28040	nodulin MtN21 family protein	-2,3	0,1
At2g37130	peroxidase (PER21)	-2,3	-0,6
At5g24410	glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase-related	-2,3	-0,7
At1g51470	glycosyl hydrolase family 1 protein (BGLU35)	-2,3	-0,8
At5g36180	Serine Carboxypeptidase-Like 3 (SCPL3)	-2,3	2,0
At3g20370	MATH domain-containing protein	-2,3	0,3
At4g12510	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	-2,3	-1,3
At5g42580	CYP705A12	-2,3	-0,8
At5g43520	DC1 domain-containing protein	-2,4	0,2
At1g28130	indole-3-acetic acid amido synthetase	-2,4	-0,6
At4g15920	nodulin MtN3 family protein	-2,4	-0,7
At2g11810	Monogalactosyl Diacylglycerol Synthase 3 (MGD3)	-2,4	-2,1
At2g36380	Pleiotropic Drug Resistance 6 (AtPDR6)	-2,4	-1,7
At4g27700	rhodanese-like domain-containing protein	-2,4	1,6
At3g29410	terpene synthase/cyclase family protein	-2,4	-0,7
At5g04960	pectinesterase family protein	-2,4	-1,8
At4g16190	cysteine proteinase, similar to RD19	-2,4	-0,4
At2g38750	Annexin Arabidopsis 4 (ANNAT4)	-2,4	-1,3
At4g15390	transferase family protein	-2,4	-2,2
At4g08300	nodulin MtN21 family protein	-2,4	0,3
At5g42825	expressed protein	-2,5	0,3
At1g72200	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-2,5	-0,4
At1g64190	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	-2,5	-1,6
At3g26520	Gamma Tonoplast Intrinsic Protein 2 (TIP2, GAMMA-TIP2, SITIP)	-2,5	-1,5
At5g15180	peroxidase (PER56)	-2,5	-0,5
At3g16440	Myrosinase-Binding Protein-Like Protein (AtMLP-300B, MEE36)	-2,5	-1,9
At3g61260	DNA-binding family protein / remorin family protein	-2,5	-0,3
At4g11210	disease resistance-responsive family protein	-2,5	-1,0
At3g01260	aldose 1-epimerase family protein	-2,5	-0,2
At1g72150	Patellin 1 (PATL1)	-2,5	-0,4
At4g23400	Plasma Membrane Intrinsic Protein (PIP1D, PIP1-5)	-2,5	-0,7
At3g48100	Arabidopsis Response Regulator 5 (ARR5, AtRR2)	-2,5	-2,4
At1g50720	stigma-specific Stig1 family protein	-2,5	0,1
At1g14960	major latex protein-related	-2,6	0,1
At3g53420	Plasma Membrane Intrinsic Protein 2A (PIP2A, PIP2-1)	-2,6	-0,7
At4g12520	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	-2,6	-1,6
At5g54470	zinc finger (B-box type) family protein	-2,6	0,7
At2g19990	Pathogenesis-Related Protein 1 Like (PR-1-LIKE)	-2,6	-2,6
At1g32450	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-2,6	-0,5
At5g03545	expressed protein	-2,7	-3,8
At5g01220	Sulfoquinovosyltransferase / Sulfolipid Synthase (SQD2)	-2,7	-3,2
At3g49780	Phytosulfokines 3 (PSK3), Phytosulfokines 4 (AtPSK4)	-2,7	2,6
At1g62975	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	-2,7	1,4
At3g48360	BTB and TAZ domain protein 1 (BT1)	-2,7	0,2
At5g04120	phosphoglycerate mutase family protein	-2,7	0,1
At3g57100	expressed protein	-2,8	0,2
At2g19970	pathogenesis-related protein	-2,8	-2,3
At5g66052	expressed protein	-2,8	0,0
At3g45070	sulfotransferase family protein	-2,8	0,8
At3g52060	expressed protein	-2,8	-0,8
At1g70890	major latex protein-like, MLP-Like Protein 43 (MLP43)	-2,8	0,1
At1g13420	sulfotransferase family protein	-2,8	-2,4
At5g44020	acid phosphatase class B family protein	-2,9	-1,6
At5g16110	expressed protein	-2,9	-0,5
At5g24530	oxidoreductase, Downy Mildew Resistant 6 (DMR6)	-2,9	-0,8
At5g20150	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein	-2,9	-2,7
At4g17340	Tonoplast Intrinsic Protein 2-2 (DELTA-TIP2, TIP2-2)	-2,9	-0,3
At1g66800	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, CAD family	-2,9	-0,5
At4g29905	expressed protein	-3,0	0,7
At3g14680	CYP72A14	-3,0	-1,4
At1g17710	phosphoric monoester hydrolase	-3,0	-4,8

AGI	Gene/ Beschreibung	3dpi	1dpi
At5g63160	BTB and TAZ domain protein 1 (BT1)	-3,0	-0,9
At5g03580	polyadenylate-binding protein, similar to PAB7	-3,1	0,8
At2g18050	histone H1-3 (HIS1-3)	-3,1	0,1
At3g09922	Induced by Phosphate Starvation 1 (AtIPS1)	-3,1	-4,0
At4g37700	expressed protein	-3,2	-1,1
At5g20790	expressed protein	-3,3	-3,7
At1g17190	glutathione S-transferase (AtGSTU26)	-3,3	-0,3
At2g01530	major latex protein-like, MLP-Like Protein 329 (MLP329)	-3,4	0,8
At2g39310	Jacalin-Related Lectin 22 (JAL22)	-3,4	-1,1
At4g24450	Phosphoglucan, Water Dikinase (AtGWD2, GWD3, PWD)	-3,4	-0,5
At1g47780	acyl-protein thioesterase-related	-3,4	-0,5
At1g19960	expressed protein	-3,6	-1,2
At3g48740	nodulin MtN3 family protein	-3,7	-0,1
At4g12545	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (AIR1)	-3,8	-3,5
At4g12550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (AIR1)	-4,7	-3,8

### 6.3 Schnittmengen des Venn-Diagramms aus Abbildung 10

Tabelle 9: Gene der Schnittmengen des Venn-Diagramms aus Abbildung 10. In dem oberen Drittel sind die zehn Transkripte aufgelistet, welche in den Wurzeln drei Tage nach *VI43* Infektion (3dpi) und in den Blattrosetten 18 Tage nach *VI43* Infektion (R-Vlgs18) differentiell exprimiert sind. In dem mittleren Tabellen-Abschnitt sind die neun Transkripte aufgelistet, welche in den Wurzeln drei Tage nach *VI43* Infektion (3dpi) und in den Petiolen 5 Tage nach Infektion (P-Vlgs5) differentiell exprimiert sind. In dem unteren Tabellenabschnitt sind die vier Transkripte aufgelistet, welche sowohl in den Petiolen 5 Tage nach Infektion, als auch in den Blattrosetten 18 Tage nach *VI43* Infektion differentiell exprimiert sind. Grau unterlegt ist die Spalte mit At4g33550, welches in allen drei Arrayexperimenten induziert wurde.

Gene Name	Gene Description	3dpi	R-Vlgs18
At5g64120	peroxidase, cell wall bound	4,0	4,1
At1g65500	expressed protein	2,7	4,3
At3g16530	legume lectin family protein	3,3	-3,4
At2g46600	calcium-binding EF hand family protein	2,4	2,5
At3g54820	Plasma Membrane Intrinsic Protein 2-5 (PIP2-5, PIP2D)	2,5	6,6
At3g50770	Calmodulin Like 41 (CML41)	2,9	4,4
At4g33550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	2,2	5,4
At4g35750	Rho-GTPase-activating protein-related	-2,0	3,1
At4g17340	Tonoplast Intrinsic Protein 2-2 (DELTA-TIP2, TIP2-2)	-2,9	6,4
At2g37130	peroxidase (PER21)	-2,3	8,7

Gene Name	Gene Description	3dpi	P-Vlgs5
At2g08986	expressed protein	7,6	-3,2
At2g07981	expressed protein	7,6	-3,0
At3g50930	AAA-type ATPase protein, Cytoch BC1 Synthesis (BCS1)	4,6	2,4
At5g39670	calcium-binding EF hand family protein	4,4	2,1
At5g57560	Xyloglucan Endotransglycosylase (TCH4, XTH22)	3,1	2,9
At4g01700	Chitinase	2,4	3,4
At1g80840	WRKY40	2,3	2,0
At4g33550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	2,2	2,8
At2g33830	dormancy/auxin associated family protein	-2,1	2,0

Gene Name	Gene Description	R-Vlgs18	P-Vlgs5
At3g53980	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	9,9	3,7
At4g33550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	5,4	2,8
At1g20160	subtilase family protein	5,0	3,0
At4g33420	peroxidase	4,1	3,9



## 6.4 qRT-PCR-Validierung der Arraydaten

Tabelle 10: In der Tabelle sind die 29 Gene aufgelistet, deren Induktion im Zeitreihenexperiment von zwei bis zehn Tagen nach *VI43*- und *VII8*-Infektion mittels qRT-PCR verifiziert wurde. Die erste Spalte weist auf die Reihenfolge der entsprechenden, auf den folgenden zwei Seiten dargestellten qRT-PCR-Grafiken hin (Abbildung 33-35). Es wurden zwei unabhängige Time-Course-Experimente (TC#1 und TC#2) durchgeführt. In der Tabelle ist mit einem X gekennzeichnet, welche Transkripte mit welcher Time-Course cDNA überprüft wurden. Bei drei Primerpaarungen war die Oligo-Spezifität der qRT-Primer nicht ausreichend. Ihre Schmelzkurven zeigten die Amplifikation von unspezifischen Produkten.

Abbildung	AGI	Gene Description	3dpi	1dpi	TC#1	TC#2	Oligo Spezifität
A	At5g22300	Nitrilase 4 (NIT4)	4,0	0,7	X		gut
B	At5g64120	peroxidase, cell wall bound (MHJ24.10)	4,0	5,6	X		gut
C	At3g22370	Alternative Oxidase 1A (AOX1A)	6,3	-0,2	X		gut
D	At5g38910	germin-like protein	6,8	4,6	X		gut
E	At5g51190	ERF #105	3,2	1,8	X		gut
F	At1g72900	disease resistance protein (TIR-NBS class)	6,3	0,6	X		gut
G	At2g38870	protease inhibitor	11,4	5,3	X		gut
H	At2g43000	no apical meristem (NAM) family protein (ANAC042)	4,2	3,6	X		gut
I	At2g41100	Calmodulin Like 4 (AtCAL4)	7,4	0,0	X		gut
J	At3g60120	glycosyl hydrolase family 1 protein (BGLU27), similar to PEN2	2,5	-0,1	X	X	gut
K	At2g43590	Chitinase	4,1	3,2	X		gut
L	At2g30750	CYP71A12	12,6	6,8	X	X	gut
M	At5g47220	ERF #101 (ERF2)	3,1	-0,3	X		gut
N	At3g60140	glycosyl hydrolase family 1 protein (BGLU30, din2)	7,0	2,3	X	X	gut
O	At2g47520	ERF #071	5,5	2,2	X		gut
P	At3g26830	CYP71B15, PAD3	6,5	-0,8	X	X	gut
Q	At1g17180	glutathione S-transferase (AtGSTU25)	9,0	0,1	X		gut
R	At4g39950	CYP79B2	4,0	0,7	X	X	gut
S	At4g37370	CYP81D8	9,1	0,0	X		gut
T	At5g57220	CYP81F2	6,8	3,8	X	X	gut
U	At2g26560	Phospholipase A 2A (PLA2A)	7,8	4,3	X		gut
V	At4g05020	NAD(P)H Dehydrogenase B2 (NDB2)	6,3	-0,4	X		gut
W	At1g14550	peroxidase anionic, (PER5)	5,7	1,5	X		gut
X	At1g26380	FAD-binding domain-containing protein	8,8	7,1	X		gut
Y	At5g43450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	8,0	1,2	X		gut
Z	At2g03760	Steroid Sulfotransferase 1 (AtST1)	8,5	-0,5	X		gut
AA	At5g06860	Polygalacturonase Inhibiting Protein 1 (PGIP1)	4,3	1,1	X		gut
AC	At2g43510	trypsin inhibitor	9,2	8,4	X		gut
AD	At1g75830	Low-molecular-weight cysteine-rich 67 (LCR67, PDF1.1)	4,1	1,4	X		gut
_x_	At5g12030	17.7 kDa class II heat shock protein 17.6A (AtHSP17.6A)	7,0	5,0	X		unspez.
_x_	At5g08790	no apical meristem (NAM) family protein (ANAC081, ATAF2)	2,6	-0,1	X		unspez.
_x_	At1g74080	myb family transcription factor (MYB122)	2,3	1,3	X		unspez.

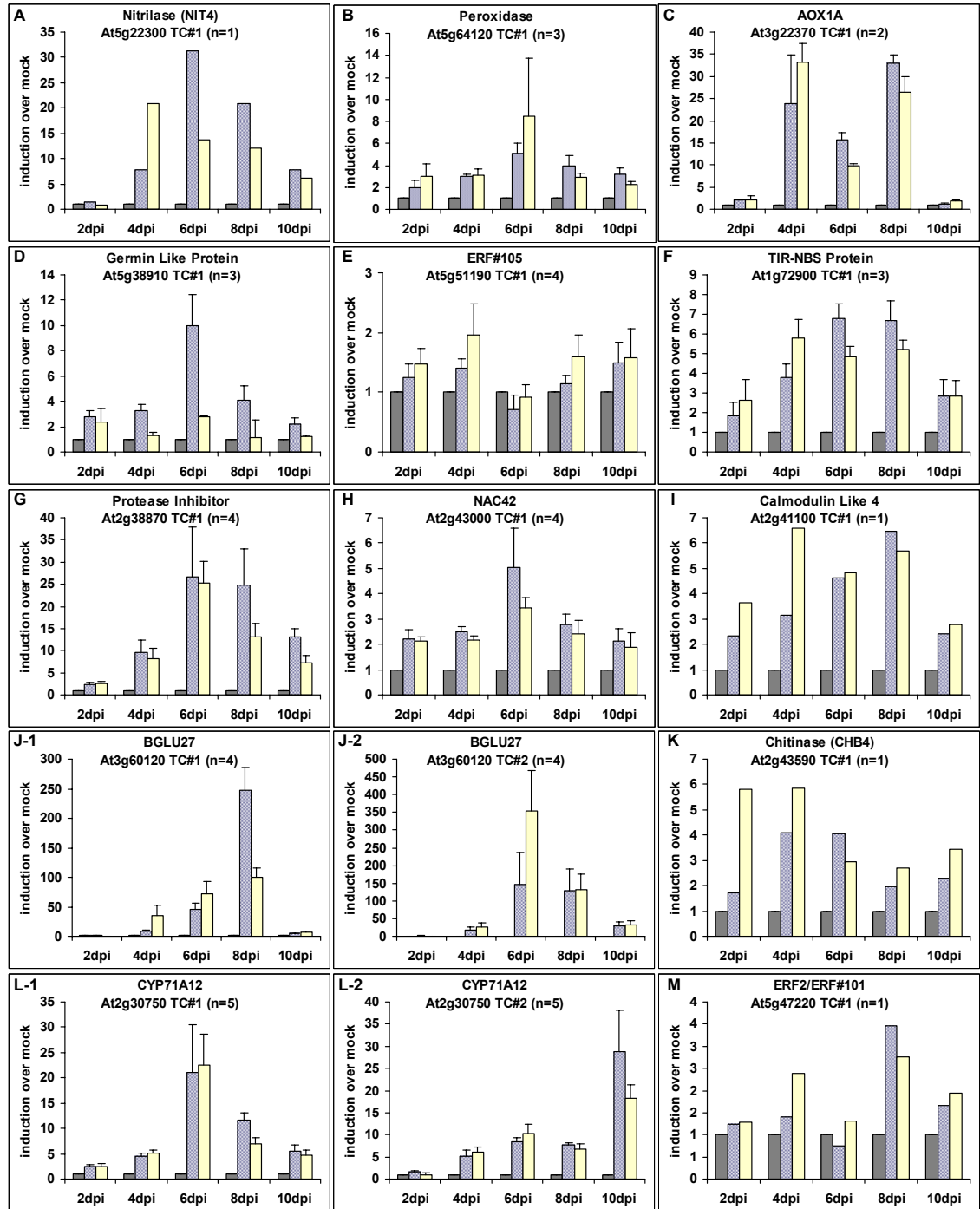


Abbildung 33: Quantitative RT-PCR zum Nachweis der transkriptionellen Induktion der in Tabelle 10 aufgelisteten Gene im *time course*-Experiment der Zeitpunkte zwei, vier, sechs, acht und zehn Tage nach Infektion (dpi). Aufgetragen sind  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte. Die grauen Balken repräsentieren die auf eins normierten  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte der mock-inokulierten Kontrollproben (links), die schraffierten Balken zeigen die auf mock normierte Induktion der *Vl43*-inokulierten Proben (Mitte). Die hellen Balken zeigen die Induktion der *Vl18*-inokulierten Proben (rechts). TC#1 und TC#2 definiert die zwei unterschiedlichen biologischen Replikate. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von (n) technischen Replikaten.

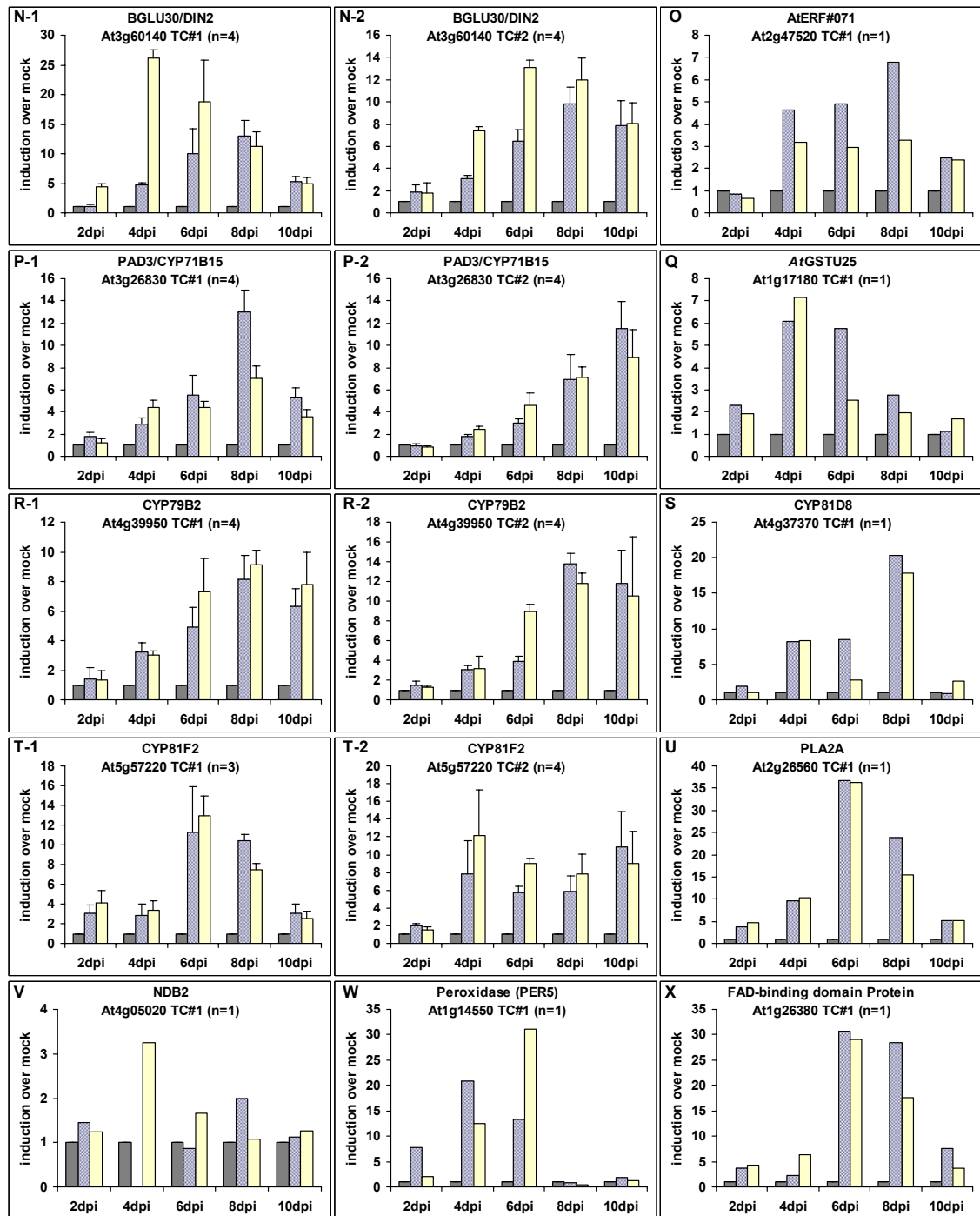


Abbildung 34: Quantitative RT-PCR zum Nachweis der transkriptionellen Induktion der in Tabelle 10 aufgelisteten Gene im *time course*-Experiment der Zeitpunkte zwei, vier, sechs, acht und zehn Tage nach Infektion (dpi). Aufgetragen sind  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte. Die grauen Balken repräsentieren die auf eins normierten  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte der mock-inokulierten Kontrollproben (links), die schraffierten Balken zeigen die auf mock normierte Induktion der *Vl18*-inokulierten Proben (Mitte). Die hellen Balken zeigen die Induktion der *Vl18*-inokulierten Proben (rechts). TC#1 und TC#2 definiert die zwei unterschiedlichen biologischen Replikate. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von (n) technischen Replikaten.

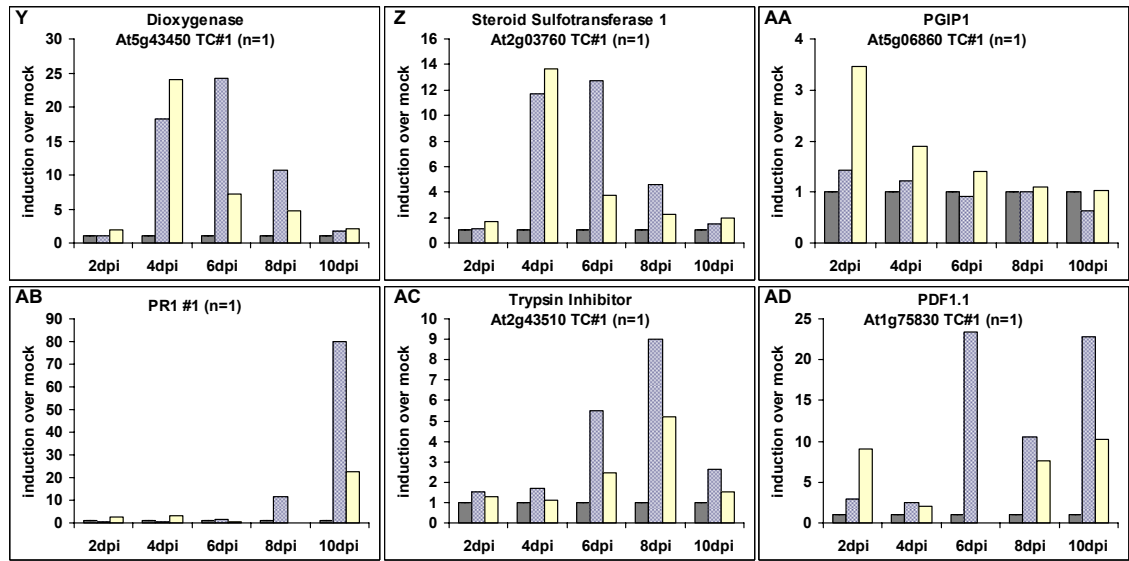


Abbildung 35: Quantitative RT-PCR zum Nachweis der transkriptionellen Induktion der in Tabelle 10 aufgelisteten Gene im *time course*-Experiment der Zeitpunkte zwei, vier, sechs, acht und zehn Tage nach Infektion (dpi). Aufgetragen sind  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte. Die grauen Balken repräsentieren die auf eins normierten  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte der mock-inokulierten Kontrollproben (links), die schraffierten Balken zeigen die auf mock normierte Induktion der *VI43*-inokulierten Proben (mitte). Die hellen Balken zeigen die Induktion der *VI18*-inokulierten Proben (rechts). TC#1 und TC#2 definiert die zwei unterschiedlichen biologischen Replikate. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von (n) technischen Replikaten.

## 6.5 Kartierung des T-DNA Insertionsortes in der *Pt-LUC-1* Promoter-trap Linie

Bei *Pt-LUC1* ist die T-DNA auf Chromosom 1 in „antisense“ Orientierung in den codierenden Bereich der Carotinoid Isomerase (*At1g06820*) integriert. Der nächste Codierbereich in gleicher Orientierung liegt 2303 Basen weiter und codiert für Monothiol Glutaredoxin-S11 (*At1g06830*). Da das eine Gen (*At1g06820*) in falscher Orientierung und das andere Gen (*At1g06830*) in weiter Entfernung zu der T-DNA liegt, ist die Reporteraktivität wahrscheinlich ein Artefakt.

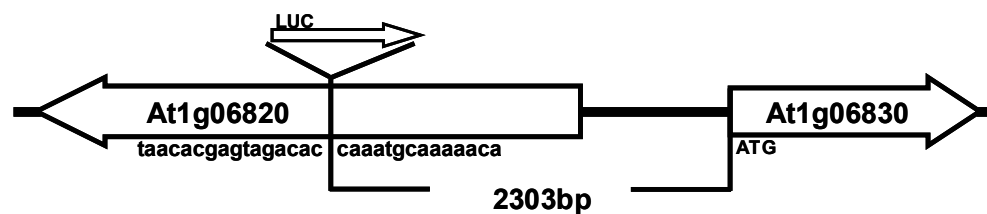


Abbildung 36: Schematische Darstellung des T-DNA Insertionsortes in der *Pt-LUC-1* Promoter-trap-Linie.

## 7 Literaturverzeichnis

- Altenbach D. and Robatzek S.** (2007) Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, no. 9: 1031-9
- Alvarado M.C., Zsigmond L.M., Kovács I., Cséplő A., Koncz C. and Szabados L.M.** (2004) Gene trapping with firefly luciferase in Arabidopsis. Tagging of stress-responsive genes. *Plant Physiology* 134: 18-27
- Anderson J.P., Badruzsaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R. and Kazan K.** (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16: 3460-79
- Apel K., and Hirt H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-99
- Arabidopsis Genome Initiative.** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408: 796-815
- Arnholdt-Schmitt B., Costa J.H. and de Melo D.F.** (2006) AOX-a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends in Plant Science* 11: 281-7
- Back M. A., Haydock P.P.J. and Jenkinson P.** (2002) Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. *Plant Pathology* 51: 683-697
- Bakker P., Pieterse C. and van Loon L.C.** (2007) Induced Systemic Resistance by Fluorescent Pseudomonas spp. *Phytopathology* 97: 239-243
- Barbara D.J., Morton A. and Miller N.J.** (2005) Isolation of microsatellite markers from an interspecific hybrid isolate of the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Molecular Ecology Notes* 5: 854-856
- Barbara D.J. and Clewes E.** (2003) Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Molecular Plant Pathology* 4: 297-305
- Baxter, I., Tchieu J., Sussman M.R., Boutry M., Palmgren M.G., Gribskov M., Harper J.F. and Axelsen K.B.** (2003) Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology* 132: 618-28
- Beckman C.H.** (1987) *The nature of wilt diseases of plants*. St. Paul, Minn.: APS Press
- Bednarek P., Pislewska-Bednarek M., Svatos A., Schneider B., Doubsky J., Mansurova M., Humphry M., et al.** (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 323: 101-6
- Bednarek P., Schneider B., Svatos A., Oldham N.J. and Hahlbrock K.** (2005) Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in Arabidopsis roots. *Plant Physiology* 138: 1058-70
- Beliën T., Van Campenhout S., Robben J. and Volckaert G.** (2006) Microbial endoxylanases: effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or, rather, triggers of plant defense systems? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1072-81

- Belkhadir Y., Subramaniam R. and Dangi J.L.** (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 391-9
- Bell A.A.** (1969) Phytoalexin production and Verticillium wilt resistance in cotton. *Phytopathology* 59: 1119-1127
- Benhamou N.** (1995) Ultrastructural and cytochemical aspects of the response of eggplant parenchyma cells in direct contact with Verticillium-infected xylem vessels. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46: 321-338
- Bensmihen S., To A., Lambert G., Kroj T., Giraudat J. and Parcy F.** (2004) Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. *FEBS Letters* 561: 127-131
- Berlanger I. and Powelson M.L.** (2000) Verticillium wilt. The Plant Health Instructor. *APSnet Plant Disease Lesson*  
<http://www.apsnet.org/education/lessonsplantpath/Verticillium/default.htm>
- Bernard P., Kezdy K.E., Van Melderer L., Steyaert J., Wyns L., Pato M.L., Higgins P.N. and Couturier M.** (1993): The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol*, 234, 534-41
- Berrocal-Lobo M. and Molina A.** (2004) Ethylene response factor 1 mediates Arabidopsis resistance to the soilborne fungus Fusarium oxysporum. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 763-70
- Berrocal-Lobo M. and Molina A.** (2008) Arabidopsis defense response against Fusarium oxysporum. *Trends in Plant Science* 13: 145-50
- Bhuiyan N.H., Selvaraj G., Wei Y. and King J.** (2008) Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *Journal of Experimental Botany* (November 27)
- Bishop C.D. and Cooper R.M.** (1983) An Ultrastructural-Study of Vascular Colonization in 3 Vascular Wilt Diseases. Colonisation of Susceptible Cultivars. *Physiological Plant Pathology* 23, no. 3: 323-343
- Bittel P. and Robatzek S.** (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 335-341
- Bolek Y., El-Zik K.M., Pepper A.E., Bell A.A., Magill C.W., Thaxton P.M. and Reddy O.U.K.** (2005) Mapping of verticillium wilt resistance genes in cotton. *Plant Science* 168: 1581-1590
- Bowers J.H., Nameth S.T., Riedel R.M. and Rowe R.C.** (1996) Infection and colonization of potato roots by Verticillium dahliae as affected by Pratylenchus penetrans and P. crenatus. *Phytopathology* 86: 614-621
- Bowles D., Isayenkova J., Lim E.K. and Poppenberger B.** (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 254-63
- Buckley P.M., Wyllie T.D. and DeVay J.E.** (1969) Fine Structure of Conidia and Conidium Formation in Verticillium albo-atrum and V. nigrescens. *Mycologia* 61: 240-250
- Buhtz A., Kolasa A., Arlt K., Walz C. and Kehr J.** (2004) Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta* 219: 610-8

- Celenza J.L., Quiel J.A., Smolen G.A., Merrikh H., Silvestro A.R., Normanly J. and Bender J.** (2005) The Arabidopsis ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiology* 137: 253-62
- Chen F., Ro D.K., Petri J., Gershenzon J., Bohlmann J., Pichersky E. and Tholl D.** (2004) Characterization of a root-specific Arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. *Plant Physiology* 135: 1956-66
- Cheng Y., Dai X. and Zhao Y.** (2007) Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19: 2430-9
- Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J.D.G., Felix G. and Boller T.** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448: 497-500
- Christensen A.B., Thordal-Christensen H., Zimmermann G., Gjetting T., Lyngkjaer M.F., Dudler R. and Schweizer P.** (2004) The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 109-17
- Clay N.K., Adio A.M., Denoux C., Jander G. and Ausubel F.M.** (2009) Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science* 323: 95-101
- Clifton R., Millar A.H. and Whelan J.** (2006) Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1757: 730-41
- Clough S.J. and Bent A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16, 735-43
- Collard B.C.Y. and Mackill D.J.** (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 363: 557-72
- Collins A, Okoli C.A.N., Morton A., Parry D., Edwards S.G. and Barbara D.J.** (2003) Isolates of *Verticillium dahliae* Pathogenic to Crucifers Are of at Least Three Distinct Molecular Types. *Phytopathology* 93: 364-76
- Cooper R.M. and Williams J.S.** (2004) Elemental sulphur as an induced antifungal substance in plant defence. *Journal of Experimental Botany* 55: 1947-53
- da Cunha L., Sreerekha M.-V. and Mackey D.** (2007) Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 349-357
- Czechowski T., Bari R.P., Stitt M., Scheible W.-R. and Udvardi M.K.** (2004) Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *The Plant Journal* 38: 366-79
- Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K. and Scheible W.-R.** (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139: 5-17
- Daayf F., Nicole M., Boher B., Pando A. and Geiger J.P.** (1997) Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 103: 125-136

- van Dam N., Tytgat T. and Kirkegaard J.** (2009) Root and shoot glucosinolates: a comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. *Phytochemistry Reviews* 8: 171-186
- Dangl J.L. and Jones J.D.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-33
- Dean R.A., Talbot N.J., Ebbole D.J., Farman M.L., Mitchell T.K., Orbach M.J., Thon M., et al.** 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434: 980-6
- Delessert C., Kazan K., Wilson I.W., Van Der Straeten D., Manners J., Dennis E.S. and Dolferus R.** (2005) The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in Arabidopsis. *The Plant Journal* 43: 745-57
- Diener A.C. and Ausubel F.M.** (2005) RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM 1, a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics* 171: 305-21
- Do C.-T., Pollet B., Thévenin J., Sibout R., Denoue D., Barrière Y., Lapierre C., and Jouanin L.** (2007) Both caffeoyl Coenzyme A 3-O-methyltransferase 1 and caffeic acid O-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in Arabidopsis. *Planta* 226: 1117-29
- Dong X.** (2004) NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 547-52
- Dunker S., Kuenecke H. and von Tiedemann A.** (2006) *Verticillium longisporum* in winter oilseed rape – Impact on plant development and yield. *Integrated Control in Oilseed Crops* 29: 365-374
- Durrant W.E. and Dong X.** (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209
- Eichmann R. and Hüchelhoven R.** (2008) Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. *Journal of Plant Physiology* 165: 5-18
- van Esse H.P., Van't Klooster J.W., Bolton M.D., Yadeta K.A., van Baarlen P., Boeren S., Vervoort J., de Wit P. and Thomma B.** (2008) The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *The Plant Cell* 20: 1948-63
- Eynck C., Koopmann B., Grunewaldt-Stoecker G., Karlovsky P. and von Tiedemann A.** (2007) Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology* 118: 259-274
- Eynck C.** (2007) Identification of resistance sources and characterization of resistance factors in Brassica species to *Verticillium longisporum*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2008/eynck/>
- Ferrari S., Galletti R., Denoux C., De Lorenzo G., Ausubel F.M. and Dewdney J.** (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology* 144: 367-79
- Ferrari S., Vairo D., Ausubel F.M., Cervone F. and De Lorenzo G.** (2003) Tandemly duplicated Arabidopsis genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *The Plant Cell* 15: 93-106



- Fischer U. and Dröge-Laser W.** (2004) Overexpression of NtERF5, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1162-71
- Floerl S.** (2008) Identifizierung und Charakterisierung extrazellulärer Proteine unter dem Einfluss von *Verticillium longisporum* in *Arabidopsis thaliana* und Raps (*Brassica napus*). Text.PhDThesis. <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2008/floerl/>
- Floerl S., Druebert C., Majcherczyk A., Karlovsky P., Kues U. and Polle A.** (2008) Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biology* 8: 129
- Flor H.H.** (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296
- Fradin E.F. and Thomma B.** (2006) Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* 7: 71-86
- Franke R. and Schreiber L.** (2007) Suberin--a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 252-9
- Fritz-Laylin L.K., Krishnamurthy N., Tör M., Sjölander K.V. and Jones J.D.G.** (2005) Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138: 611-23
- Gachon C., Langlois-Meurinne M. and Saindrenan P.** (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* 10: 542-9
- Geisler D.A., Broselid C., Hederstedt L. and Rasmuson A.G.** (2007) Ca<sup>2+</sup>-binding and Ca<sup>2+</sup>-independent respiratory NADH and NADPH dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 28455-64
- Gigolashvili T., Berger B., Mock H.-P., Müller C., Weisshaar B. and Flügge U.-I.** (2007) The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 50: 886-901
- Glawischnig E.** (2007) Camalexin. *Phytochemistry* 68: 401-6
- Glawischnig E., Hansen B.G., Olsen C.E. and Halkier B.A.** (2004) Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *PNAS* 101: 8245-50
- Glazebrook J. and Ausubel F.M.** (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *PNAS* 91: 8955-9
- Glazebrook J.** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-27
- Godfrey D., Able A.J. and Dry I.B.** (2007) Induction of a grapevine germin-like protein (VvGLP3) gene is closely linked to the site of Erysiphe necator infection: a possible role in defense? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1112-25
- Gordee R.S. and Porter C.L.** (1985) Structure, germination, and physiology of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum*. *Physiological Plant Pathology* 27: 109-118
- Griffiths D.A.** (1971) The development of lignitubers in roots after infection by *Verticillium dahliae* Kleb. *Canadian Journal of Microbiology* 17: 441-4

- Grubb C.D. and Abel S.** (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11: 89-100
- Gutterson N. and Reuber T.L.** (2004) Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 465-71
- Halkier B.A. and Gershenzon J.** (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* 57: 303-33
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80
- Heinz R., Lee S.W., Saparno A., Nazar R.N. and Robb J.** (1998) Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 385-396
- Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M. and Schell J.** (1992): Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Biotechnology*, 24, 377-81
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., et al.** (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-47
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y. and Matsui H.** (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant & Cell Physiology* 42: 462-8
- van der Hoorn R. and Kamoun S.** (2008) From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell* 20: 2009-17
- Howard R.J., Ferrari M.A., Roach D.H. and Money N.P.** (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *PNAS* 88: 11281-4
- Hu J., Barlet X., Deslandes L., Hirsch J., Feng D.X., Somssich I. and Marco Y.** (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE* 3: e2589
- Hückelhoven R.** (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* 45: 101-27
- Huisman O.C.** (1988) Seasonal colonization of roots of field-grown cotton by *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus*. *Phytopathology* 78: 708-716
- Hunter D., Darling H., Stevenson F. and Cunningham C.** (1968) Inheritance of resistance to *Verticillium* wilt in Wisconsin. *American Journal of Potato Research* 45: 72-78
- Inoue H., Nojima H. and Okayama H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28
- Ito T., Hirano M., Akama K., Shimura Y. and Okada K.** (1995) Touch-inducible genes for calmodulin and a calmodulin-related protein are located in tandem on a chromosome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 36: 1369-73
- Iwai H., Usui M., Hoshino H., Kamada H., Matsunaga T., Kakegawa K., Ishii T. and Satoh S.** (2003) Analysis of sugars in squash xylem sap. *Plant & Cell Physiology* 44: 582-7
- Johansson A., Staal J. and Dixelius C.** (2006) Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on NDR1, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 958-69

- Jones J.D.G. and Dangl J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-9
- Juge N.** (2006) Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science* 11: 359-67
- van Kan J.A.L.** (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11: 247-53
- Karapapa V.K., Bainbridge B.W. and Heale J.B.** (1997) Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape 101: 1281-1294
- Karapapa V.K. and Typas M.A.** (2001) Molecular characterization of the host-adapted pathogen *Verticillium longisporum* on the basis of a group-I intron found in the nuclear SSU-rRNA gene. *Current Microbiology* 42: 217-24
- Karimi M., De Meyer B. and Hilson P.** (2005) Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science* 10: 103-5
- Kasprzewska A.** (2003) Plant chitinases--regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters* 8: 809-24
- Kawchuk L.M., Hachey J., Lynch D.R., Kulcsar F., van Rooijen G., Waterer D.R., Robertson A., et al.** (2001) Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *PNAS* 98: 6511-5
- Kazan K.** (2006) Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors. *Trends in Plant Science* 11: 109-12
- Klimes A. and Dobinson K.F.** (2006) A hydrophobin gene, VDH1, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 283-94
- Koncz, C. and Schell, J.** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet*, 204, 383-396
- Koornneef A. and Pieterse C.M.J.** (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* 146: 839-44
- Lamb C. and Dixon R.A.** (1997) THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275
- Lane B.G.** (2002) Oxalate, germins, and higher-plant pathogens. *IUBMB Life* 53: 67-75
- Lecourieux D., Ranjeva R. and Pugin A.** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *The New Phytologist* 171: 249-69
- Libault M., Wan J., Czechowski T., Udvardi M. and Stacey G.** (2007) Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 900-11
- Lin R.-C., Park H.-J. and Wang H.-Y.** (2008) Role of *Arabidopsis* RAP2.4 in Regulating Light- and Ethylene-Mediated Developmental Processes and Drought Stress Tolerance. *Mol Plant* 1: 42-57
- Lipka U., Fuchs R. and Lipka V.** (2008) *Arabidopsis* non-host resistance to powdery mildews. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 404-11

- Livak K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402-408
- van Loon L.C., Bakker P.A. and Pieterse C.M.J.** (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-83
- van Loon L.C., Rep M. and Pieterse C.M.J.** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-62
- Manosalva P.M., Davidson R.M., Liu B., Zhu X., Hulbert S.H., Leung H. and Leach J.E.** (2009) A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. *Plant Physiology* 149: 286-96
- Mathur J., Szabados L., Schaefer S., Grunenberg B., Lossow A., Jonas-Straube E., Schell J., Koncz C. and Koncz-Kálmán Z.** (1998) Gene identification with sequenced T-DNA tags generated by transformation of Arabidopsis cell suspension. *The Plant Journal* 13: 707-16
- Matzinger P.** (2007) Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nature Immunology* 8: 11-3
- McCormack E., Tsai Y.-C. and Braam J.** (2005) Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs. *Trends in Plant Science* 10: 383-9
- McCully M.E., Miller C., Sprague S.J., Huang C.X. and Kirkegaard J.A.** (2008) Distribution of glucosinolates and sulphur-rich cells in roots of field-grown canola (*Brassica napus*). *New Phytologist* 180: 193-205
- McDonnell M.W., Simon M.N. and Studier F.W.** (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, 110, 119-46
- McGrath K.C., Dombrecht B., Manners J.M., Schenk P.M., Edgar C.I., Maclean D.J., Scheible W.-R., Udvardi M.K. and Kazan K.** (2005) Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiology* 139: 949-59
- Melotto M., Underwood W. and He S.Y.** (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 46: 101-22
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K. and He S.Y.** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-80
- Mikkelsen M.D., Petersen B.L., Glawischnig E., Jensen A.B., Andreasson E. and Halkier B.A.** (2003) Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in Arabidopsis by defense signaling pathways. *Plant Physiology* 131: 298-308
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H. and Shibuya N.** (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *PNAS* 104: 19613-8
- Mullis K.B. and Faloona F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50
- Münch S., Lingner U., Floss D.S., Ludwig N., Sauer N. and Deising H.B.** (2008) The hemibiotrophic lifestyle of Colletotrichum species. *Journal of Plant Physiology* 165: 41-51

- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497
- Nafisi M., Goregaoker S., Botanga C.J., Glawischnig E., Olsen C.E., Halkier B.A. and Glazebrook J.** (2007) Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *The Plant Cell* 19: 2039-52
- Nakano T., Suzuki K., Fujimura T. and Shinshi H.** (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology* 140: 411-32
- Navarro L., Zipfel C., Rowland O., Keller I., Robatzek S., Boller T. and Jones J.D.G.** (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology* 135: 1113-28
- Obayashi T., Hayashi S., Saeki M., Ohta H. and Kinoshita K.** (2008) ATTED-II provides coexpressed gene networks for Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*
- Okubara P. and Paulitz T.** (2005) Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective. In *Root Physiology: from Gene to Function*, 215-226
- Oñate-Sánchez L., Anderson J.P., Young J. and Singh K.B.** (2007) AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiology* 143: 400-9
- Oñate-Sánchez L. and Singh K.B.** (2002) Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiology* 128: 1313-22
- Operon** (2008) Array-Ready Oligo Set™ for the *A. thaliana* Genome Version 3.0. [http://omad.operon.com/download/storage/arabidopsis\\_thaliana\\_V3.0.2\\_datasheet.pdf](http://omad.operon.com/download/storage/arabidopsis_thaliana_V3.0.2_datasheet.pdf)
- Passardi F., Penel C. and Dunand C.** (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9: 534-40
- Passarinho P.A. and de Vries S.C.** (2002) Arabidopsis Chitinases: a Genomic Survey. *The Arabidopsis Book*. <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0023>
- Paz-Ares J. and The Regia Consortium** (2002) REGIA, An EU Project on Functional Genomics of Transcription Factors From Arabidopsis Thaliana. *Comparative and Functional Genomics* 3: 102-8
- Pedras M.S., Okanga F.I., Zaharia I.L. and Khan A.Q.** (2000) Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry* 53: 161-76
- Pedras M.S. and Ahiahonu P.W.K.** (2005) Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry* 66: 391-411
- Pedras M.S., Zheng Q.-A. and Sarwar M.G.** (2007) Efficient synthesis of brassalexin A, a remarkable phytoalexin from Brussels sprouts. *Organic & Biomolecular Chem.* 5: 1167-9
- Pegg G.F. and Brady B.L.** (2002) *Verticillium Wilts*. Wallingford: CABI
- Piotrowski M.** (2008) Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry* 69: 2655-67
- Pollard M., Beisson F., Li Y. and Ohlrogge J.B.** (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* 13: 236-46

- Pré M., Atallah M., Champion A., De Vos M., Pieterse C.M.J. and Memelink J.** (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology* 147: 1347-57
- Qiu J.-L., Fiil B.K., Petersen K., Nielsen H.B., Botanga C.J., Thorgrimsen S., Palma K., et al.** (2008) Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO Journal* 27: 2214-21
- Reddy V.S. and Reddy A.S.N.** (2004) Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry* 65: 1745-76
- Ren D., Liu Y., Yang K.-Y., Han L., Mao G., Glazebrook J. and Zhang S.** (2008) A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *PNAS* 105: 5638-43
- Riechmann J.L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C.-Z., Keddie J., et al.** 2000. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110
- Robb J., Powell D.A. and Street P.F.S.** (1989) Vascular coating: a barrier to colonization by the pathogen in Verticillium wilt of tomato. *Canadian Journal of Botany* 67: 600-607
- Roncero M.I.G., Hera C., Ruiz-Rubio M., Maceira F.I.G., Madrid M.P., Caracuel Z., Calero F., et al.** 2003. Fusarium as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 87-98
- Rouhier N., Couturier J. and Jacquot J.-P.** (2006) Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. *Journal of Experimental Botany* 57: 1685-96
- Rygulla W., Snowdon R.J., Eynck C., Koopmann B., von Tiedemann A., Lühs W. and Friedt W.** (2007) Broadening the Genetic Basis of Verticillium longisporum Resistance in Brassica napus by Interspecific Hybridization. *Phytopathology* 97: 1391-1396
- Rygulla W., Snowdon R.J., Friedt W., Happstadius I., Cheung W.Y. and Chen D.** (2008) Identification of Quantitative Trait Loci for Resistance Against Verticillium longisporum in Oilseed Rape (Brassica napus). *Phytopathology* 98: 215-221
- Sambrook, Fritsch and Maniatis** (1989): Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanders D., Pelloux J., Brownlee C. and Harper J.F.** (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell* 14 Suppl: S401-17
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7
- Schuhegger R., Nafisi M., Mansourova M., Petersen B.L., Olsen C.E., Svatos A., Halkier B.A. and Glawischnig E.** (2006) CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiology* 141: 1248-54
- Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N. and Weigel D.** (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *The Plant Cell* 18: 1121-33
- Schwessinger B. and Zipfel C.** (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 389-95
- Shaikhali J., Heiber I., Seidel T., Ströher E., Hiltcher H., Birkmann S., Dietz K.-J. and Baier M.** (2008) The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear

- expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes. *BMC Plant Biology* 8: 48
- Shigaki T., Rees I., Nakhleh L. and Hirschi K.D.** (2006) Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters. *Journal of Molecular Evolution* 63: 815-25
- Shiu S.H. and Bleecker A.B.** (2001) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2001: RE22
- Simko I., Haynes K.G., Ewing E.E., Costanzo S., Christ B.J. and Jones R.W.** (2004) Mapping genes for resistance to *Verticillium albo-atrum* in tetraploid and diploid potato populations using haplotype association tests and genetic linkage analysis. *Molecular Genetics and Genomics* 271: 522-31
- Simons G., Groenendijk J., Wijbrandi J., Reijans M., Groenen J., Diergaarde P., Van der Lee T., et al.** (1998) Dissection of the fusarium I2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *The Plant Cell* 10: 1055-68
- Singh K., Foley R.C. and Oñate-Sánchez L.** (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 430-6
- Slope D.B.** (1962) CEPHALOSPORIUM STRIPE DISEASE OF WHEAT. *Plant Pathology* 11: 160-160
- Somerville C. and Koornneef M.** (2002) A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews. Genetics* 3: 883-9
- Southern E.M.** (1979) Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 100, 319-23
- Spoel S.H. and Dong X.** (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host & Microbe* 3: 348-51
- Staswick P.E., Yuen G.Y. and Lehman C.C.** (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *The Plant Journal* 15: 747-54
- Stefanato F.L., Abou-Mansour E., Buchala A., Kretschmer M., Mosbach A., Hahn M., Bochet C.G., Métraux J.-P. and Schoonbeek H.-J.** (2009) The ABC-transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*
- Stevenson L.A., Okori P. and Dixelius C.** (2001) An Investigation of the Susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to Isolates of Two Species of *Verticillium*. *Journal of Phytopathology* 149: 395-401
- Sun W., Dunning F.M., Pfund C., Weingarten R. and Bent A.F.** (2006) Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis* FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *The Plant Cell* 18: 764-79
- Swiderski M.R., Birker D. and Jones J.D.G.** (2009) The TIR Domain of TIR-NB-LRR Resistance Proteins Is a Signaling Domain Involved in Cell Death Induction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 157-65
- Takai S.** (1974) Pathogenicity and cerato-ulmin production in *Ceratocystis ulmi*. *Nature* 252: 124-6

- Talboys P.W.** (1972) Resistance to Vascular Wilt Fungi. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences (1934-1990)* 181: 319-332
- Tappe H.** (2008) Verticillium induced Genes. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen
- Thomma B.P., Nelissen I., Eggermont K. and Broekaert W.F.** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* 19: 163-71
- Tjamos S.E., Flemetakis E., Paplomatas E.J. and Katinakis P.** (2005) Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 555-61
- Utsugi S., Sakamoto W., Murata M. and Motoyoshi F.** (1998) *Arabidopsis thaliana* vegetative storage protein (VSP) genes: gene organization and tissue-specific expression. *Plant Molecular Biology* 38: 565-76
- Valueva T.A. and Mosolov V.V.** (2004) Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry. Biokhimiia* 69: 1305-9
- Vanderbeld B. and Snedden W.A.** (2007) Developmental and stimulus-induced expression patterns of *Arabidopsis* calmodulin-like genes CML37, CML38 and CML39. *Plant Molecular Biology* 64: 683-97
- VanEtten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A. and Farmer E.E.** (1994) Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant Cell* 6: 1191-1192
- Verica J.A. and He Z.-H.** (2002) The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant Physiology* 129: 455-9
- Veronese P., Narasimhan M.L., Stevenson R.A., Zhu J.-K., Weller S.C., Subbarao K.V. and Bressan R.A.** (2003) Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 35: 574-87
- Vorwerk S., Biernacki S., Hillebrand H., Janzik I., Müller A., Weiler E.W. and Piotrowski M.** (2001) Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana* nitrilase subfamily encoded by the NIT2/NIT1/NIT3-gene cluster. *Planta* 212: 508-16
- Walter M., Chaban C., Schütze K., Batistic O., Weckermann K., et al.** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal* 40: 428-38
- Wan J., Zhang X.-C., Neece D., Ramonell K.M., Clough S., Kim S.-Y., Stacey M.G. and Stacey G.** (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 471-81
- Wang H.-M., Lin Z.-X., Zhang X.-L., Chen W., Guo X.-P., Nie Y.-C. and Li Y.-H.** (2008) Mapping and quantitative trait loci analysis of *verticillium* wilt resistance genes in cotton. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 174-82
- Weiste C., Iven T., Fischer U., Oñate-Sánchez L. and Dröge-Laser W.** (2007) In planta ORFeome analysis by large-scale over-expression of GATEWAY-compatible cDNA clones: screening of ERF transcription factors involved in abiotic stress defense. *The Plant Journal* 52: 382-90
- Werck-Reichhart D., Bak S. and Paquette S.** (2002) Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book*. doi:10.1199/tab.0028. <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0028>



- White J., Chang S.Y. and Bibb M.J.** (1990) A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res*, 18, 1062
- Wilhelm S.** (1955) Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and in the field. *Phytopathology* 45: 180-181
- Williams J.S., Hall S.A., Hawkesford M.J., Beale M.H. and Cooper R.M.** (2002) Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiology* 128: 150-9
- Xu J., Li Y., Wang Y., Liu H., Lei L., Yang H., Liu G. and Ren D.** (2008) Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 26996-7006
- Zeise K. and von Tiedemann A.** (2001) Morphological and Physiological Differentiation among Vegetative Compatibility Groups of *Verticillium dahliae* in Relation to *V. longisporum*. *Journal of Phytopathology* 149: 469-475
- Zeise K. and von Tiedemann A.** (2002) Host Specialization among Vegetative Compatibility Groups of *Verticillium dahliae* in Relation to *Verticillium longisporum*. *Journal of Phytopathology* 150: 112-119
- Zhao Y., Christensen S.K., Fankhauser C., Cashman J.R., Cohen J.D., Weigel D. and Chory J.** (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291: 306-9
- Zhao Y., Hull A.K., Gupta N.R., Goss K.A., Alonso J., Ecker J.R., Normanly J., Chory J., Celenza J.L.** (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3 *Genes Dev.* 16(23):3100-12
- Zhou N., Tootle T.L. and Glazebrook J.** (1999) Arabidopsis PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *The Plant Cell* 11: 2419-28
- Zimmermann G., Bäumlein H., Mock H.-P., Himmelbach A. and Schweizer P.** (2006) The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in Basal host resistance. *Plant Physiology* 142: 181-92
- Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L. and Gruissem W.** (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* 136: 2621-32
- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D.G., Boller T. and Felix G.** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* 125: 749-60
- Zuo K.-J., Qin J., Zhao J.-Y., Ling H., Zhang L.-D., Cao Y.-F. and Tang K.-X.** (2007) Over-expression GbERF2 transcription factor in tobacco enhances brown spots disease resistance by activating expression of downstream genes. *Gene* 391: 80-90

## Danksagung:

An dieser Stelle kann ich nun allen danken, die mich auf dem Weg zu der vorliegenden Arbeit sowohl fachlich als auch persönlich unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Wolfgang, der während der letzten vier Jahre mein Projekt mit viel Engagement betreut hat und der nicht müde wurde, mich in schwierigen Situationen durch seine optimistische Art erneut für die *Verticillium*-Forschung zu begeistern. Besonders der Einsatz bei der Verlängerung der Finanzierung meiner Arbeit sei noch erwähnt, da die kontinuierliche Finanzierung ein essentieller und nicht selbstverständlicher Faktor einer Dissertation ist. Vielen Dank dafür.

Danken möchte ich auch Prof. Christiane Gatz, da sie zum einen als Koordinatorin der *Verticillium*-Forschergruppe meine Arbeit erst ermöglicht hat und zum anderen immer wohlwollend meinen Fortschritt beurteilte. Auch für die gute Kooperation bei der Arbeit an den teilweise ähnlichen Versuchsansätzen und der reibungslosen Absprache der Forschungsschwerpunkte möchte ich mich bei ihr bedanken.

In diesem Zusammenhang danke ich auch Hella Tappe. Es war immer gut, einen Leidensgenossen im Haus zu haben und sich am Treffpunkt „Praktikumsraum“ während einer Infektion über Neuigkeiten an der *Verticillium*-Front auszutauschen.

Ein Dank auch an alle Mitglieder der Forschergruppe für die gute Kooperation. Besonders sei hier die gute Zusammenarbeit mit Stefanie Götze und Prof. Ivo Feußner erwähnt, welche die Camalexin Messungen und die Synthese von Camalexin übernommen haben. Auch möchte ich Christina Eynk aus der Arbeitsgruppe von Prof. von Tiedemann für die Bereitstellung des *Verticillium* GFP-Stammes und der Transformation des *Verticillium* Luciferase-Stammes danken. Ebenso ein Dankeschön an Prof. Karlovsky, der den *Gaussia*-Luciferase-Reporterstamm für meine Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Außerhalb der Forschergruppe sei noch PD Dr. Erich Glawischnig der TU München für die Bereitstellung der cyp79b2/b3 Mutante und des Camalexin-Standards dankend erwähnt.

Ein freundschaftliches Dankeschön für die allzeit entspannte Arbeitsatmosphäre möchte ich auch an meine Kollegen Friedtjof, Stefan, Andrea, Caro, Katrin, Christoph, Nora und Jenny und die gesamte Abteilung von Prof. Gatz richten.

An Christoph ein extra Dankeschön für seinen großen Einsatz während seiner Diplomarbeit und die verlässliche Gesellschaft, wenn man mal Abends etwas länger im Labor bleiben musste. Christoph war fast immer noch ein wenig länger da.

Besonderer Dank auch an unsere exzellente TA Anna, die für mich unter anderem tausende *Arabidopsis*-Samen ausgelegt hat.

Schließlich möchte ich noch meinen Eltern danken. Ihr habt mich für meinen Lebensweg sowohl mit „festen Wurzeln“ als auch mit „kräftigen Flügeln“ ausgestattet. Zudem habt ihr mir immer selbstverständlich und ohne Vorbehalte die nötige finanzielle Unterstützung zukommen lassen und meinen Weg zum Molekularbiologen mit Liebe und Mitgefühl begleitet. Dafür danke ich euch beiden aus ganzem Herzen.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Daniela, die besonders in der Schlussphase viel Toleranz gegenüber ihrem gestressten Freund gezeigt hat. Danke für deine Liebe und die vielen Kleinigkeiten die du während dieser Zeit für mich übernommen hast. Ein Dank natürlich auch für das Korrekturlesen und die Hilfe mit den statistischen Berechnungen.

## Lebenslauf:

Tim Iven



Diplom-Biologe

Geboren am 29.11.1977 in Bad Oldesloe

**1984-1987** Klosterhof Grundschule, Lübeck

**1987-1994** Thomas-Mann-Gymnasium, Lübeck

**1994-1995** Rush-Henrietta High School, Rochester, New York State, USA

**1995-1998** Thomas-Mann-Gymnasium, Lübeck

**1998** Abitur in den Fächern Biologie, Physik, Englisch und Erdkunde  
Note: 2,4

**WS1998-2003** Studium im Fachbereich Biologie  
an der Georg-August Universität in Göttingen

**11/2003** mündliche Diplomprüfung in den Fächern  
Botanik „gut“  
Genetik „sehr gut“  
Biochemie „gut“

**12/2003- 11/2004** Diplomarbeit bei PD Dr. W. Dröge-Laser: „Funktionelle  
Charakterisierung der bZIP-Transkriptionsfaktoren BZI-2, BZI-3  
und BZI-4 aus *Nicotiana tabacum* mittels RNA-Interferenz“  
Allgemeine und Entwicklungsphysiologie der Pflanze  
Albrecht-von-Haller-Instituts für Pflanzenwissenschaften  
Georg-August-Universität, Göttingen  
Note: „sehr gut“

**2004-2009** Anfertigung der vorliegenden Dissertation