

**Analyse der *Verticillium longisporum* induzierten
Seneszenz und Transdifferenzierung
in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur Erlangung des
mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
„Doctor rerum naturalium“

vorgelegt von

Michael Reusche

aus Peine

angefertigt am
Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften
Abteilung Zellbiologie der Pflanze
an der biologischen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

Göttingen 2011

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertationsarbeit mit dem Titel „Analyse der *Verticillium longisporum* induzierten Seneszenz und Transdifferenzierung in *Arabidopsis thaliana*“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich erkläre hiermit auch, dass ich mich an keiner anderen Universität um einen Doktorgrad beworben habe.

Michael Reusche

Göttingen, den 7. Juni 2011

Referent: Dr. Thomas Teichmann

Korreferentin: Prof. Dr. Christiane Gatz

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2011

Inhalt

1.	Einleitung	- 1 -
1.1	Taxonomie und Charakteristika von <i>Verticillium species (spec.)</i>	- 1 -
1.2	Tracheomykose und Charakteristika bei vaskulärer Infektion.....	- 2 -
1.3	Lebenszyklus von <i>Verticillium longisporum</i>	- 4 -
1.4	Die Rolle von <i>Verticillium longisporum</i> in der Landwirtschaft.....	- 6 -
1.5	Resistenzforschung bei <i>Verticillium spec.</i>	- 7 -
1.6	Das Phytohormon Cytokinin.....	- 8 -
1.7	Biosynthese und Degradation von Cytokinin	- 9 -
1.8	Cytokininsignaltransduktion und Transport.....	- 13 -
1.9	Die Rolle von Cytokinin in der Pathogenese und Pathogenabwehr	- 15 -
1.10	Das vaskuläre System der Pflanze (Bildung und Aufbau).....	- 16 -
1.11	Zielsetzung	- 21 -
2.	Material und Methoden	- 23 -
2.1	Material	- 23 -
2.1.1	Pflanzen	- 23 -
2.1.2	Bakterien	- 23 -
2.1.3	Pilze	- 24 -
2.1.4	Plasmide	- 24 -
2.1.5	Pflanzenmedien	- 24 -
2.1.6	Bakterienmedien.....	- 25 -
2.1.7	Pilzmedien	- 25 -
2.1.8	Oligonukleotide für Sequenzierung.....	- 25 -
2.1.9	Oligonukleotide für qRT-PCR	- 26 -
2.1.10	Antibiotika.....	- 28 -
2.1.11	Enzyme	- 28 -
2.1.12	Kits	- 28 -
2.1.13	Geräte	- 29 -
2.1.15	Verbrauchsmaterialien.....	- 30 -
2.1.16	Chemikalien	- 30 -
2.1.17	Software / Freeware Internet-Software (Seiten).....	- 30 -
2.2	Methoden.....	- 31 -
2.2.1	Pflanzenkulturen.....	- 31 -
2.2.1.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> und <i>Nicotiana benthamiana</i>	- 31 -
2.2.1.2	Anzucht und Infektion von <i>A. thaliana</i> auf sterilen Schrägagarplatten-	- 31 -
2.2.2	Pilzkulturen	- 32 -
2.2.2.1	Anzucht <i>Verticillium spec.</i>	- 32 -
2.2.2.2	Ernte von <i>Verticillium spec.</i>	- 32 -
2.2.2.3	Infektion mit <i>Verticillium spec.</i>	- 33 -
2.2.2.4	Stammkulturen von <i>Verticillium spec.</i>	- 33 -
2.2.3	Bakterienkulturen	- 33 -

2.2.3.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	33 -
2.2.3.2	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	34 -
2.2.3.3	Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34 -
2.2.3.4	Herstellung elektrokompenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	34 -
2.2.3.5	Elektroporation von <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i>	35 -
2.2.3.6	Glycerolkulturen zur Langzeitlagerung	35 -
2.2.4	Blattflächenvermessung	36 -
2.2.5	Generell gesammelte Daten.....	36 -
2.2.6	Pharmakologische Behandlungen	36 -
2.2.7	Färbungen.....	36 -
2.2.7.1	Trypan-Blau Färbung von infizierten Pflanzen/Blättern	36 -
2.2.7.2	Propidiumiodid-Färbung	37 -
2.2.7.3	Histologische GUS-Färbung.....	37 -
2.2.7.4	Fluorometrischer GUS-Assay.....	38 -
2.2.7.5	Safranin-O-Färbung.....	38 -
2.2.7.5	Einbetten und Färben von Blatt- und Hypokotylquerschnitten	39 -
2.2.8	Samensterilisation	39 -
2.2.9	Chlorophyllbestimmung.....	40 -
2.2.10	Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>A. thaliana</i>	40 -
2.2.11	Selektion auf Kanamycin-Resistenz.....	41 -
2.2.12	Analyse von Pflanzen mittels Plant Phire PCR-Kit	41 -
2.2.13	¹⁴ C-Glukose Transportversuch	41 -
2.2.14	Molekulargenetische Methoden	42 -
2.2.14.1	Plasmid-DNA Isolation	42 -
2.2.14.2	Extraktion genomischer DNA aus Pflanzen und Pilzen	43 -
2.2.14.3	Extraktion von <i>Arabidopsis</i> -Gesamt-RNA.....	43 -
2.2.14.4	cDNA-Synthese	44 -
2.2.14.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA, RNA)	45 -
2.2.14.6	Agarosegelelektrophorese.....	45 -
2.2.14.7	DNA-Elution aus Agarosegelen	45 -
2.2.14.8	Restriktionsverdau	46 -
2.2.14.9	Ligation.....	46 -
2.2.14.10	Dephosphorylierung von DNA mit Alkalischer Phosphatase	47 -
2.2.14.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47 -
2.2.14.12	Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR)	48 -
2.2.14.13	qRT-PCR für pilzliche-DNA Bestimmung	50 -
2.2.14.14	Semiquantitative Realtime (sqRT)-PCR	51 -
2.2.14.15	Herstellung des Konstrukts pCamb2300/pSAG12:IPT	52 -
2.2.14.16	Herstellung des Konstrukts pCamb2300/pPer21:VND7-SRDX	52 -
2.2.14.17	Sequenzierung	52 -
3.	Ergebnisse	53 -
3.1	Etablierung eines sterilen <i>in vitro</i> -Infektionssystems zur Analyse der Penetration und der pilzlichen Proliferation über die Wurzel.....	53 -
3.2	Die Rolle von Cytokinin in der Symptomentwicklung während der Infektion mit <i>V. longisporum</i> 43.....	56 -
3.2.1	Symptomverlauf und Analyse der Cytokinin-Konzentrationen im <i>Arabidopsis</i> - <i>V. longisporum</i> 43-Pathosystem	56 -

3.2.2	Symptomverlauf der Infektion und indirekte Analyse der Cytokininkonzentrationen mittels einer Promotor-Reporter-Linie.....	59 -
3.2.3	Quantitative RT-PCR ausgewählter B- und A-Typ ARRs.....	60 -
3.2.4	Quantitative RT-PCR von Cytokininoxidasen (CKX) und Isopentenyltransferasen.....	63 -
3.2.5	Pharmakologische Behandlung <i>V. longisporum</i> 43-infizierter <i>A. thaliana</i> Pflanzen mit BAP.....	64 -
3.2.6	Pharmakologische Behandlung V143-infizierter <i>A. thaliana</i> Pflanzen mit INCYDE.....	67 -
3.2.7	Charakterisierung des Infektionsphänotyps von transgenen pSAG12:IPT <i>A. thaliana</i> Pflanzen	71 -
3.3	Charakterisierung der durch <i>V. longisporum</i> 43-induzierten Transdifferenzierung von Bündelscheidezellen.....	75 -
3.3.1	Untersuchung des Phänotyps der Transdifferenzierung.....	75 -
3.3.2	Genetischer Mechanismus der Transdifferenzierung.....	81 -
3.3.3	Einfluss der Transdifferenzierung auf die Proliferation von V143.....	84 -
3.3.3.1	Symptomauspägung in 35S:VND7 Linien nach V143-Infektion.....	85 -
3.3.3.2	Analyse verschiedenster "Pilzfaktoren" auf Transdifferenzierungsaktivität	88 -
3.3.3.3	Lokalisationsstudie von <i>V. longisporum</i> 43 in Bündelscheidezellen	90 -
3.3.4	Untersuchungen zur Korrelation zwischen <i>de novo</i> Xylemelementen und Welke	91 -
3.3.4.1	Überprüfung der Funktionalität von <i>de novo</i> Xylemelementen	91 -
3.3.4.2	Infektion von Tomate und Tabak mit <i>V. dahliae</i>	92 -
3.3.4.3	Inhibition des Transdifferenzierungsprozesses durch VND7-Repression	95 -
3.3.4.4	¹⁴ C-Glukose Transportversuch mit <i>V. longisporum</i> 43-infizierten Pflanzen	99 -
4.	Diskussion	102 -
4.1	<i>V. longisporum</i> 43 Infektionsverlauf.....	102 -
4.2	Veränderung der Cytokinin-Homöostase nach <i>V. longisporum</i> 43-Infektion	103 -
4.3	Charakterisierung der <i>V. longisporum</i> 43-induzierten Transdifferenzierung von Bündelscheidezellen zu <i>de novo</i> Xylemelementen.....	110 -
4.3.1	Biologische Relevanz der Transdifferenzierung	114 -
5.	Zusammenfassung	122 -
6.	Literaturverzeichnis.....	124 -
7.	Anhang	137 -
7.1	Konzentrationsveränderungen der Cytokinin-Zwischenstufen und Speicherverbindungen nach V143-Infektion	137 -
7.2	Expressionsanalysen von Isopentenyltransferasen nach V143-Infektion.....	141 -
7.3	Expressionsanalysen von Cytokininoxidasen nach V143-Infektion.....	142 -

7.4	Expressionsanalysen von <i>A. tumefaciens-IPT</i> in Col-0 und transgenen pSAG12:IPT Linien	- 143 -
7.5	Charakterisierung transgener pSAG12:IPT Linien nach V143-Infektion	- 144 -
7.6	Expressionsanalysen von <i>VND1 - VND5</i> nach V143-Infektion.....	- 145 -
7.7	Analysen von Pilzfaktoren auf Transdifferenzierungsaktivität.....	- 146 -
8.	Danksagung.....	- 149 -
	Lebenslauf	- 152 -

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
4-MU	4-Methyl-Umbelliferon
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AHK	<i>Arabidopsis</i> -Histidin-Kinase
AHP	<i>Arabidopsis</i> -Phosphattransmitter-Proteine
amp	Ampicillin
ARR	<i>Arabidopsis Response Regulator</i>
ASL	<i>Asymmetric Leaves2-Like</i>
ATP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AWF	Aoplastische-Waschflüssigkeit
<i>B. napus</i>	<i>Brassica napus</i>
BAP	6-Benzylaminopurin
BR	Brassinosteroide
<i>bri</i>	<i>Brassinosteroid insensitive</i>
BSZ	Bündelscheidezellen
cef	Cefotaxim
CK-N-GT	Cytokinin- <i>N</i> -Glykosyltransferase
CKX	Cytokininoxidase
cm	Zentimeter
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Ökotyp Columbia-0
<i>cpd</i>	<i>constitutive photomorphogenic dwarf</i>
CPD	Czapek Dox
<i>CRE1</i>	<i>Cytokinin response 1</i>
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -Zeatin
<i>cZ9G</i>	<i>cis</i> -Zeatin-9-Glukosid
<i>cZOG</i>	<i>cis</i> -Zeatin-O-Glukosid
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -Zeatin ribosid
<i>cZR-5`MP</i>	<i>cis</i> -Zeatin ribosid-5`-monophosphat
<i>cZRMP</i>	<i>c</i> -Zeatin ribosid-5`-monophosphat
<i>cZROG</i>	<i>cis</i> -Zeatin ribosid-O-Glukosid
DHZ	Dihydrozeatin
DHZ-5`MP	Dihydrozeatin ribosid-5`-monophosphat
DHZ9G	Dihydrozeatin-9-Glukosid
DHZOG	Dihydrozeatin-O-Glukosid
DHZR	Dihydrozeatin ribosid
DHZROG	Dihydrozeatin ribosid-O-Glukosid
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
dpi	<i>days post inoculation</i>
<i>dwf</i>	<i>dwarf</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Et	Ethylen
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
gent	Gentamicin
h	Stunden

Abkürzungsverzeichnis

HMBDP	4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphat
hpi	<i>hours post infection</i>
HX	Hyperplastisches Xylem
hyg	Hygromycin B
INCYDE	2-chloro-6-(3-methoxyphenylamino) purine
iP	Isopentenyladenin
iP9G	Isopentenyladenin-9-Glukosid
iPOG	Isopentenyladenin-O-Glukosid
iPR	Isopentenyladenin ribosid
iPR-5`MP	Isopentenyladenin ribosid-5`-monophosphat
iPRDP	isopentenyladenin ribosid-5`-diphosphat
iPRMP	isopentenyladenin ribosid-5`-monophosphat
iPROG	Isopentenyladenin ribosid-O-Glukosid
iP RTP	isopentenyladenin ribosid-5`-triphosphat
IPT	Isopentenyltransferase
JA	Jasmonsäure
kan	Kanamycin
<i>LBD</i>	<i>Lateral Organ Boundaries Domain</i>
LSM	<i>Laser Scanning Mikroskopie</i>
MEP	Methylerythritolphosphat
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MS	<i>Murashige and Skoog</i>
MSC	multiple cloning site
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid
MVA	Mevalonat
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
nm	Nanometer
NPR1	<i>Noneexpresser of PR Genes 1</i>
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Potato Dextrose Broth
PUP	Purinpermease
rif	Rifampicin
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
SA	Salizylsäure
SAG12	<i>Senescence Associated Gene 12</i>
sek	Sekunden
TGA3	TGACG Motif-Binding Protein 3
<i>tZ</i>	<i>trans-Zeatin</i>
<i>tZ9G</i>	<i>trans-Zeatin-9-Glukosid</i>
<i>tZOG</i>	<i>trans-Zeatin-O-Glukosid</i>
<i>tZR</i>	<i>trans-Zeatin ribosid</i>
<i>tZR-5`MP</i>	<i>trans-Zeatin ribosid-5`-monophosphat</i>
<i>tZRMP</i>	<i>trans-Zeatin ribosid-5`-monophosphat</i>
<i>tZROG</i>	<i>trans-Zeatin ribosid-O-Glukosid</i>
V	Volt
<i>V. albo-atrum</i>	<i>Verticillium albo-atrum</i>
<i>V. dahliae</i>	<i>Verticillium dahliae</i>

Abkürzungsverzeichnis

<i>V. longisporum</i>	<i>Verticillium longisporum</i>
Vd830	<i>Verticillium dahliae</i> 830
<i>Vet1</i>	<i>Verticillium dahliae tolerance1</i>
Vl43	<i>Verticillium longisporum</i> 43
VND	Vascular Related NAC Domain
Vol	Volumen
<i>wol</i>	<i>woodenleg</i>
WS	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Ökotyp Wassilewskija
WT	Wildtyp
XS	Xylemsaft
ZKS	Zwei-Komponenten-Signalsystem
ZOGT	<i>tZ-O</i> -Glykosyltransferase
βGlc	β-Glukosidase

1. Einleitung

1.1 Taxonomie und Charakteristika von *Verticillium spec.* (spec.)

Pilze der Gattung *Verticillium spec.* sind bodenbürtige, pflanzenpathogene Pilze, die weltweit für erhebliche Ernteausfälle verantwortlich sind. Sie kommen besonders in kalten (Pegg und Brady, 2002) bis subtropischen Klimazonen vor (Fradin und Thomma, 2006). Im Allgemeinen wird die ausgelöste Krankheit als "Verticillium-Welke" bezeichnet.

Systematisch werden die Pilze dem Phylum der *Ascomycota* (Schlauchpilze) und der Untergruppe der filamentösen *Ascomyceten* zugeordnet (Hibbett *et al.*, 2007). *Verticillium spec.* ist in die Klasse der *Sordariomycetes* und weiter in die Ordnung der *Hypocreales* eingeordnet. Der Gattungsname ist *Verticillium*. Derzeit befindet sich die Taxonomie rund um *Verticillium* im Umbruch und wird den aktuellen Erkenntnissen angepasst (Yun *et al.*, 1991, Zare *et al.*, 2008). *Verticillium spec.* besitzt nach aktuellem Wissensstand kein sexuelles Fortpflanzungsstadium. Pilze der Gattung *Verticillium* bilden keine Ascosporen und vermehren sich rein vegetativ (asexuell, anamorph). Die dabei gebildeten Sporen werden Konidiosporen genannt und auf Phialiden gebildet, die sich seitlich vom Konidiophor abzweigen und wirtelig angeordnet sind. Da kein sexuelles Stadium vorliegt, kann *Verticillium spec.* auch der Sammelgruppe der Deuteromyceten zugeordnet werden. Bei den Deuteromyceten handelt es sich um ein Formtaxa und keine monophyletische Ordnung. Trotz Mangel eines sexuellen Stadiums ist *Verticillium spec.* in der Lage, inter- und intraspezifisch Anastomosen auszubilden und sich wahrscheinlich so genetisch auszutauschen.

Derzeit wird *Verticillium spec.* nach aktuellem Konsens in sechs phytopathogene Arten unterteilt (Pegg und Brady, 2002; Barbara und Clewes, 2003). Vier der sechs Arten, *V. tricorpus*, *V. nigrescens*, *V. nubilum* und *V. theobromae*, sind nicht so bedeutende Phytopathogene oder für Pflanzen harmlose Boden-Saprophyten. Die anderen beiden Arten, *Verticillium dahliae* und *Verticillium albo-atrum*, sind weltweit vertreten und führen zu starken ökonomischen Problemen. Die Pilze haben zusammen ein breites Wirtsspektrum, das über 200 Pflanzenarten umfasst (Kranz *et al.*, 1979; Synder und Smith, 1981; Agrios, 2005). In Kontrast zu den anderen *Verticillium*-Arten, sind *Verticillium dahliae* und *Verticillium albo-atrum* sehr aggressiv. *V. dahliae* hat von allen *Verticillium*-Arten das breiteste Wirtsspektrum und befällt viele Dikotyle, darunter Gemüsepflanzen (Tomate, Gurke, Paprika, Erdbeere, Spinat, Kohl, Salat), Blumen (Chrysanthenen, Dahlien, Rosen), landwirtschaftliche Nutzkulturen (Baumwolle, Raps, Kartoffel, Hanf, Sonnenblume, Tabak, Sesam, Erdnuss),

sowie perennierende Pflanzen (Aprikose, Kirsche, Avocado, Mandel, Ahorn, Ulme, Esche). *V. albo-atrum* hingegen hat ein eingeschränkteres Wirtsspektrum und befällt hauptsächlich Hopfen, Luzerne, Tomate und Kartoffel. Die Wirtsspezifität von individuellen Isolaten beider Arten ist sehr hoch. Das bedeutet, dass ein *V. dahliae*-Isolat von Salat nicht unbedingt in der Lage ist, Tomaten zu befallen (Bhat und Subbarao, 1999). Im Jahr 1997 wurde erstmalig ein weiterer Vertreter von *Verticillium spec.* beschrieben (Karapapa *et al.*, 1997). Dieser bekam den Artnamen *Verticillium longisporum* und unterscheidet sich in zwei Punkten von *V. dahliae* beziehungsweise *V. albo-atrum*. *V. longisporum* grenzt sich im Wirtsspektrum deutlich ab und ist nur pathogen für Pflanzen der Familie der *Brassicaceae* (Kreuzblütlergewächse). Im Europäischen Raum führt diese Spezialisierung zu Problemen im Rapsanbau, welche in Zukunft zu erheblichen Ernteausschlägen führen könnten. Erstmals wurde die Krankheit der "Rapswelke" 1985 (Hornig, 1985) beschrieben, aber fälschlicherweise *V. dahliae* zugeordnet. Morphologisch unterscheidet sich *V. longisporum* durch längliche Konidiosporen (7-7,9 µm) von *V. dahliae*, der im Vergleich kürzere, mit einer Länge von 3,2 - 5,5 µm, bildet (Karapapa *et al.*, 1997). Von molekularer Seite betrachtet weist *V. longisporum* eine spezifische Enzymausstattung und artspezifische genetische Elemente auf (Karapapa und Typas, 2001). Interessanterweise liegt bei *V. longisporum* eine annähernde Verdoppelung des Genoms (amphidiploid) vor. Daraus lässt sich schließen, dass eine Hybridisierung zweier haploider Pilzgenome stattgefunden hat, die eventuell auf Anastomosen-Bildung zwischen zwei verschiedenen *Verticillium*-Arten basiert (Collins *et al.*, 2003; Barbara *et al.*, 2005). Aus welchen Elternteilen genau *V. longisporum* besteht, ist derzeit nicht bekannt. Diese Verdopplung erschwert molekulargenetische Untersuchungen, da Gene nicht durch Insertionen in beiden Allelen des amphidiploiden Genoms ausgeschaltet, sondern nur die Genexpressionen über RNAi-Konstrukte herunterreguliert werden können (Singh *et al.*, 2009).

1.2 Tracheomykose und Charakteristika bei vaskulärer Infektion

Viele verschiedene pflanzenpathogene Pilze sind in der Lage, das vaskuläre System der Pflanzen zu besiedeln. Die primäre Besiedlung verläuft meistens über die Wurzel und das Krankheitsbild wird als Tracheomykose bezeichnet. Dabei kommt es häufig zu Welkeerscheinungen in Folge von Gefäßverstopfungen. Folgende Gattungen phytopathogener Pilze können Tracheomykosen auslösen: *Fusarium*, *Verticillium*, *Ceratocystis*, *Magnaporthe*

und *Chepalosporium*. Das Krankheitsbild beinhaltet neben der Welke Wachstumsreduktion, Chlorosen, Nekrosen und Bräunung des Leitgefäßsystems. Nicht immer führt eine Besiedlung des vaskulären Systems zu Welkeerscheinungen, wie zum Beispiel bei der Interaktion von *V. longisporum* mit Raps (Floerl *et al.*, 2010), *Chepalosporium gramineum* mit Getreide (Rahman *et al.*, 2001) oder *Magnaporthe oryzae* mit Reis (Sylvain *et al.*, 2010). Das Welke-Symptom kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Das Pilzmycel kann die Leitgefäße verstopfen und in Folge dessen den Wassertransport stören. Welke kann auch durch die Abgabe von Phytotoxinen (Barrow und Chain 1969) oder phytotoxische Proteine induziert werden, die auch die Chlorose und Nekrose fördern (Wang *et al.*, 2004; Palmer *et al.* 2005). Ein weiterer wichtiger Faktor, der zur Welke führt, ist die pflanzeneigene Pathogenabwehr. Dabei kommt es in der Pflanze zu Thyllen-Bildung, die durch Ausstülpungen der Mittellamelle benachbarter Parenchymzellen hervorgerufen werden (Talboys, 1958, Beckman, 1966; Beckman, 1987) oder zur Synthese von Kallose und Suberin (Robb *et al.*, 1989; Benhamou, 1995; Talboys, 1972). Diese pflanzeneigenen Maßnahmen blockieren und isolieren das Pilzwachstum, führen aber zu einer Verringerung der Wasserleitfähigkeit des Xylems. Eine Reaktion der Pflanze, um die Wasserleitfähigkeit des Xylems zu erhalten, ist eine erhöhte kambiale Aktivität, die zur Hyperplasie genannten Neubildung von Xylem führt. Bei der Interaktion von *Verticillium spec.* mit einem Wirt kann Hyperplasie im Zentralzylinder der Wirtspflanze beobachtet werden (Talboys, 1958). Diese Gewebevergrößerung basiert auf einer erhöhten Aktivität der Zellteilungsrate des Kambiums. Es ist nicht bekannt, ob die Pflanze damit der Thyllen-Bildung entgegenwirkt oder ob der Pilz dieses Phänomen aktiv induziert, um sich besser auszubreiten. Neben der Hyperplasie kann es auch zur Neubildung von Xylem-Elementen kommen, um mit Pilz besiedelte oder durch Gele beziehungsweise Thyllen blockierte zu ersetzen (Baayen, 1984).

Alle vaskuläre Pathogene haben eine Besonderheit. Sie sind auf die Besiedlung des Xylems spezialisiert, das kaum Nährstoffgrundlage bietet. Das Xylem dient hauptsächlich zum Transport von Wasser und der Xylemsaft beinhaltet nur in geringer Konzentration auch Zucker, Salze, Aminosäuren und Proteine (Buhtz *et al.*, 2004). Trotz dieser lebensfeindlichen Umgebung schaffen es die vaskulären Pilze gut, in der Pflanze zu wachsen, ohne den Nährstoffgehalt der Pflanze stark zu manipulieren (Floerl *et al.*, 2010). Da die Pilze die meiste Zeit ihres Lebens im Xylem verbringen, sind sie gut geschützt vor Fungiziden, die nur bei Blattpathogenen wirken. Fungizide, die über die Wurzel aufgenommen werden, sind nicht bekannt. Ein weiteres Problem bei vaskulären Pathogenen stellen ihre Überdauerungsstrukturen dar. Die meisten von ihnen produzieren am Ende ihres

Lebenszyklus Mikrosklerotien, Clamydosporen oder Dauermycel, welche über Jahre im Boden infektiös bleiben und zu großen Problemen in der Landwirtschaft führen.

1.3 Lebenszyklus von *Verticillium longisporum*

V. longisporum ist nur pathogen für Pflanzen der Familie der *Brassicaceae* (Kreuzblütlergewächse) und hat Raps als Hauptwirt (Zeise und Tiedemann, 2001; Zeise und Tiedemann, 2002). Pflanzenpathogene Vertreter der Gattung *Verticillium* haben eine hemibiotrophe Lebensweise. Dementsprechend ist der Lebenszyklus von *V. longisporum* in zwei Phasen, eine biotrophe und eine nekrotrophe, unterteilt. In **Abb. 1** ist der Lebenszyklus von *V. longisporum* in Raps dargestellt. Dieser beginnt mit dem Auskeimen der Mikrosklerotien im Herbst nach Aussaat/Keimung der nächsten Rapsgeneration. Mikrosklerotien sind melanisierte, dickwandige Überdauerungsstrukturen von *Verticillium spec.* (Gordee und Porter, 1985), die eine gewisse Toleranz gegenüber biotischem und abiotischem Stress haben. Der Prozess der Keimung wird durch chemische Wurzelexsudate der jungen Rapspflanzen initiiert. Die Hyphe wächst in die Richtung der Wurzel und, wenn möglich, an einem Wurzelhaar entlang bis zur Rhizodermis, um diese dann zu penetrieren (Eynck *et al.*, 2007). Die Eintrittsstellen für den Pilz in das Leitgefäßsystem sind die Elongationszone, Seitenwurzel- Initiationszonen oder Wurzelspitzen, an denen die Endodermis noch nicht vollständig ausgebildet ist (Bishop und Cooper, 1983; Pegg und Brady, 2002). Dabei bildet *V. longisporum* kein Appressorium aus wie andere Pilze, sondern nur ein Hyphopodium (geringe Anschwellung der Hyphenspitze), vergleichbar mit *Magnaporthe oryzae* (Wilson und Talbot, 2009; Sylvain, 2010). In der Anschwellung wird ein geringer Druck aufgebaut, der ausreicht, durch die Zellwand zu penetrieren, nachdem diese enzymatisch angedaut wurde (Talboys, 1958; Russel, 1974). Des Weiteren kann der Pilz auch über Fraßwunden von Nematoden in die Wurzel hineinwachsen (Bowers *et al.*, 1996; Back *et al.*, 2002). Nach der Penetration befindet sich der Pilz in der biotrophen Phase und wächst inter- und intrazellulär durch den Kortex in Richtung Zentralzylinder (Eynck *et al.*, 2007). Nachdem der Zentralzylinder erreicht wurde, wächst der Pilz in Richtung Hypokotyl weiter und besiedelt dabei nur einzelne Leitgefäße (Eynck *et al.*, 2007). Im Winter macht der Pilz sowie der Wirt eine Ruhephase durch, in der das Wachstum von beiden Organismen stagniert. Sobald die Temperaturen im Frühjahr ansteigen, beginnt zuerst der Raps ab März (~8°C) wieder zu wachsen (<http://www.proplanta.de>), und etwas zeitversetzt zu der

Wirtspflanze der Pilz, da sein Temperatur-Minimum höher liegt als das vom Wirt. Im Verlauf des Frühjahres kolonisiert *V. longisporum* systemisch die Pflanze. Zur besseren Ausbreitung bildet der Pilz im Xylem Konidiosporen aus (Buckley *et al.*, 1996; Eynck *et al.*, 2007), die sich passiv über den Transpirationssog in der Pflanze verteilen. Werden die Konidien an Gefäßenden aufgehalten, keimen sie aus und wachsen in aufwärts gelegene Gefäßelemente ein (Beckman, 1987).

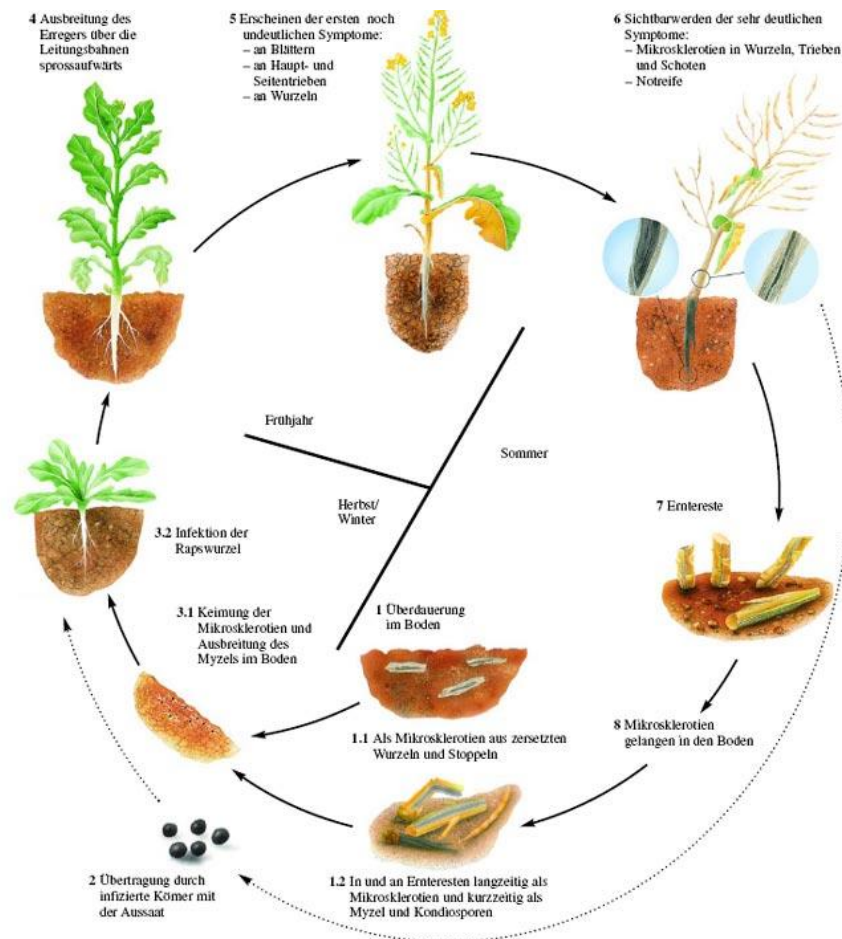


Abb. 1: Lebenszyklus von *Verticillium longisporum* auf Raps. (Paul, 2003; Verlag Th. Mann; http://www.ips-raps.de/dia_rapswelke.htm)

Gegen Ende des Frühjahres kommt es zur klassischen *Verticillium* Symptomentwicklung des Krankheitsbildes. Die Pflanzen stagnieren leicht im Wuchs, bekommen chlorotische (senescente) Blätter und teils bräunlich bis schwärzliche Wurzeln. Im Sommer entwickelt sich das Krankheitsbild sehr dramatisch, da der Pilz von der biotrophen in die nekrotrophe Lebensphase wechselt. Neben chlorotischen treten nekrotische Blättern auf, die stark von *V. longisporum* überwachsen werden. Des Weiteren kommt es zu einer verfrühten Fruchtreifung, welche mitverantwortlich ist für den Ernteverlust. In der ganzen Pflanze bildet der Pilz Mikrosklerotien, die nach der Ernte über zersetzte Stoppeln, Wurzeln und diverse andere

Pflanzenreste in den Boden gelangen und so den Kreislauf schließen. Die Mikrosklerotien gehen in eine Ruhephase über (Olsson und Nordbringhertz, 1985), die 10-15 Jahre dauern kann. Erst nach Registration von Botenstoffen einer Wirtspflanze keimen sie wieder aus (Pegg und Brady, 2002).

1.4 Die Rolle von *Verticillium longisporum* in der Landwirtschaft

Seit 1980 hat der Rapsanbau in Deutschland und allgemein in Europa stark zugenommen, da die Produktion von Rapsöl wirtschaftlich immer interessanter wurde. Die *Verticillium*-Welke an Raps (*Brassica napus*) wurde in Europa erstmals vor ca. 50 Jahren in Schweden beobachtet (Dixelius *et al.*, 2005) und erstmalig 1985 beschrieben (Hornig, 1985). Durch den ansteigenden Rapsanbau kam es zu einem vermehrten Auftreten pilzlicher Pathogene. Besondere Probleme im Rapsanbau machen die Pilze *Phoma lingam* und *V. longisporum* (Karapapa *et al.*, 1997). Die Spezialisierung von *V. longisporum* auf *Brassicaceae*n kann auf Grund fehlender, direkter Bekämpfungsmöglichkeiten zu großen Problemen im Rapsanbau führen (Dunker *et al.*, 2006). Aktuell stehen weder Fungizide noch tolerante oder resistente Sorten zur Verfügung (Rygulla *et al.*, 2007). Problematisch sind auch die langlebigen *V. longisporum*-Überdauerungsorgane (Mikrosklerotien) (Karapapa *et al.*, 1997), die schwer zu bekämpfen sind und sich bei intensivem Rapsanbau im Boden anreichern. Der Krankheit kann gegenwärtig allein durch eine mehrjährige Unterbrechung in der Raps-Fruchtfolge durch andere nicht *Verticillium* anfällige Arten entgegengewirkt werden (Pegg und Brady, 2002; Steinbach *et al.*, 2004). Des Weiteren ist derzeit schwer einzuschätzen, wie hoch die Ernteverluste und die Verbreitung von *V. longisporum* innerhalb Deutschlands wirklich sind. Erste Ergebnisse liegen aus dem UFOP-Projekt 521/002 vor. Der Projektbericht kommt zu dem Ergebnis, dass "die Raps-Welke im gesamten Bundesgebiet auftritt. Allerdings sind die regionalen Unterschiede groß. In Schleswig-Holstein und Mecklenburg-Vorpommern mit langer und intensiver Rapsanbautradition ist die Verbreitung am häufigsten" (Steinbach *et al.*, 2004) und konnte auf allen Testfeldern nachgewiesen werden. Trotz der Studie ist es nicht möglich, prozentual zu bestimmen, wie viel Anbaufläche Deutschlands kontaminiert ist, da sie sich nur auf ausgewählte Testfelder bezog. Andererseits wurde gezeigt, dass *V. longisporum* schon weit in der Bundesrepublik verbreitet ist.

1.5 Resistenzforschung bei *Verticillium spec.*

Verticillium spec. ist als vaskuläres Pflanzenpathogen durch seine Lebensweise gegen Fungizide sehr gut geschützt ist. Fungizide wirken nur auf der Blattoberfläche oder minimal auch im Blatt und dementsprechend sind alle Mittel des Pflanzenschutzes gegen *Verticillium* nicht einsetzbar. Ein anderer Ansatz könnte der gezielte Einsatz von pflanzeigenen Phytohormonen sein. Es ist möglich, die Pflanzenfitness durch Erhöhung des Cytokinin-Konzentration (Gan *et al.*, 1995) zu steigern und so kann durch Stärkung der Pflanzenvitalität der Ausbreitung von pathogenen Organismen entgegengewirkt (Swartzberg *et al.*, 2008) und die Ausbildung von Krankheitssymptomen verzögert werden. Eine große Hoffnung liegt auch im Bereich der Züchtung, *Verticillium* tolerante oder resistente Sorten zu erzeugen, denn mittlerweile wurden in verschiedenen Pflanzen Resistenz-Loci kartiert und identifiziert. Polygenetische Resistenz wurde in Baumwolle, Kartoffel, Raps und Erdbeere (Hunter *et al.*, 1968; Simko *et al.*, 2004; Bolek *et al.*, 2005; Rygulla *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008) und einzel dominante Resistenz in Baumwolle, Sonnenblume, Kartoffel und Tomate (Schaible *et al.*, 1951; Lynch *et al.*, 1997; Kawchuk *et al.*, 2001; Jansky *et al.*, 2004) entdeckt.

Der in der Tomate (*Lycopersicon esculantum*) identifizierte *Ve*-Lokus (Schaible *et al.*, 1951) vermittelt eine Resistenz gegenüber *V. dahliae* und *V. albo-atrum* und wurde in den letzten 60 Jahren in der Tomatenzüchtung verwendet. Er konnte 2001 im Detail charakterisiert werden (Kawchuk *et al.*, 2001) und es wurde gezeigt, dass auf diesem Lokus zwei Gene liegen, die für die homologen Proteine VE1 und VE2 kodieren, die der Klasse der "leucine rich repeat"-Proteine angehören (LRRs, Kruijt *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass die *Ve*-Lokus induzierte Resistenz nicht im Xylem, sondern in den umschließenden Parenchymzellen etabliert wird (Fradin *et al.*, 2006).

In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp C24), die zur Familie der *Brassicaceae* gehört und nach Infektion mit *V. longisporum* ein ähnliches Krankheitsbild wie Raps zeigt, wurde der *Vet1* (*Verticillium dahliae tolerance1*) -Lokus identifiziert. Genetische Analysen deuten an, dass der *Vet1*-Lokus als negativer Regulator im Übergang zum Blühstadium aktiv ist und in Folge dessen zur Toleranz und reduzierter Symptomatik führt (Veronese *et al.*, 2003).

Bei der Infektion von *Verticillium spec.* kann eine prävasculäre und eine vaskuläre Phase unterschieden werden. In der prävasculären Phase besiedelt *Verticillium* den Kortex der Wurzel und kann die Endodermis nicht überwinden. Neben der suberinisierten Endodermis helfen Zellwandauflagerungen und Ligninablagerungen (Griffiths, 1971; Talboys, 1972), die

Ausbreitung der Hyphen in der Wurzel zu blockieren. Dementsprechend dringt der Pilz nur über Endodermis-freie Zonen ins Leitgefäßsystem ein. In der vaskulären Phase wird der Pilz durch Thyllen und Gele isoliert (Talboys, 1972). Die isolierende Funktion der physikalischen Verteidigungselemente wird durch die Produktion von antimikrobiellen Stoffen unterstützt. Zu diesen Stoffen gehören Phytoalexine, Chitinasen, Glucanasen, "pathogen related proteins" und auch elementarer Schwefel (Bell, 1969; Talboys, 1972; Benhamou, 1995; Daayf *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2002; Cooper und Williams, 2004; Floerl *et al.*, 2008). Sie werden allgemein, in Bezug auf *Verticillium*, durch Signalmoleküle wie Jasmonsäure (Johansson *et al.*, 2006), Salizylsäure (Tjamos *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2006) und Ethylen induziert (Tjamos *et al.*, 2005; Veronese *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2006). Biosynthese- oder Signaltransduktionsmutanten dieser Hormone sind nur geringfügig anfälliger. Zu den Endprodukten der Signalwege gehören solche mit der "Fähigkeit, pilzliche Zellwände aufzulösen (Endoglucanasen und Endochitinasen), antipilzlich zu wirken (Defensine, Thionine, Peroxidasen) oder die Lignifizierung bzw. Suberinisierung der Zellwände (Peroxidasen, Chitinasen) zu katalysieren (Van Loon *et al.*, 2006; Floerl *et al.*, 2008). Ebenfalls relevant ist die Produktion von Phytoalexinen. Diese sehr heterogene Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe hat eine starke antimikrobielle Wirkung. Zu den Phytoalexinen gehören unter anderem Camalexin und Flavonoide (Dixon, 2001)" (Ganssmann, 2009; Iven, 2009).

1.6 Das Phytohormon Cytokinin

Cytokinine sind allgemein N⁶-substituierte Purine, die die Eigenschaft haben, Zellen zur Teilung (Cytokinese) zu stimulieren (Sitte *et al.*, Strasburger 35. Auflage, Seite: 419-425). Das erste identifizierte, künstliche Cytokinin war Kinetin (N⁶-Furfurylaminopurin) und wurde aus hitzedenaturierter Heringssperma-DNA gewonnen, basierend auf der Entdeckung, dass ein zellteilungsfördernder Faktor in autoklavierten DNA-Präparaten zu finden war. Kinetin, das erstmals 1955 isoliert und kristallisiert wurde (Miller *et al.*, 1955), ist kein natürlich in der Pflanze vorkommendes Cytokinin. Aus Maiskörnern konnte Miller 1961 das pflanzeigene Cytokinin Zeatin isolieren.

Cytokinin wirkt als Phytohormon und ist dementsprechend in viele Entwicklungsprozesse involviert. Neben der zellteilungsfördernden Wirkung spielt es eine Rolle in der Seneszenz (Gan *et al.*, 1995), Stress-Toleranz (Huynh *et al.*, 2005), Chloroplasten-Biogenese (Brovko *et*

al., 2010) und vaskulären Differenzierung (Yokoyama *et al.*, 2007). Des Weiteren führt eine exogene Behandlung mit Cytokinin zur Aktivierung der Photosynthese, unterdrückt die Seneszenz und fördert das Auswachsen von Seitenknospen. Aufgrund dieser Eigenschaften könnten Cytokinine in der Landwirtschaft Anwendung finden.

Cytokinine sind auch Gegenspieler von anderen Phytohormonen. Ein wichtiger *crossstalk*-Partner ist Auxin (Moubayidin *et al.*, 2009). Cytokinin fördert die Brechung der Apikaldominanz, die von Auxin negativ reguliert wird.

Natürlich vorkommende Cytokinine sind Adeninderivate, die am N⁶-Stickstoffatom eine Isoprenoid- oder aromatische Seitenkette tragen. Das wichtigste Cytokinin in der Pflanze ist *trans*-Zeatin (*tZ*) mit der höchsten Konzentration. Neben *tZ* gibt es noch Isopentenyladenin (iP), Dihydrozeatin (DHZ) und *cis*-Zeatin (*cZ*), die weitaus geringer konzentriert vorliegen und möglicherweise von *tZ* abweichende Funktionen haben.

Zur Anwendung in der Pflanzengewebekultur wurden synthetische Cytokinine, wie Benzyladenin, Diphenylurea oder Thidiazuron, entwickelt.

1.7 Biosynthese und Degradation von Cytokinin

Biosynthese von Cytokinin

In Enzymextrakten des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* wurde erstmals die Cytokininbiosynthese beschrieben (Taya *et al.*, 1978). Das verantwortliche Enzym wurde als Isopentenyltransferase (IPT) bezeichnet. In höheren Pflanzen gibt es zwei Hauptwege und einen Nebenweg, die zur Cytokininbiosynthese genutzt werden können. Der Isopentenyladenin (iP) abhängige Weg ist in **Abb. 2** zu sehen. Grundlegend katalysiert IPT dabei die Übertragung von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) auf Adenosinmono-, Adenosindiphosphat oder Adenosintriphosphat (AMP/ADP/ATP), wobei entsprechend iP ribosid-5'-monophosphat iPRMP, iPRDP und iPRTP entsteht (Kakimoto, 2003; Sakakibara, 2006). Die Bildung von DMAPP erfolgt in höheren Pflanzen auf zwei Wegen: zum einen gibt es den Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg, der in Plastiden stattfindet (Hecht *et al.*, 2001), zum anderen den Mevalonat (MVA)-Weg, bei dem DMAPP im Cytosol über das Zwischenprodukt Mevalonat gebildet wird (Lichtenthaler, 1999).

Aus den Vorstufen iPRMP, iPRDP und iPRTP wird über wenige Zwischenschritte Isopentenyladenin oder *trans*-Zeatin gebildet. Nach dem gleichen Mechanismus verläuft die

Agrobacterium tumefaciens vermittelte Biosynthese von Cytokinin, die im Zusammenspiel mit Auxin zur Tumorbildung führt (Akiyoshi *et al.*, 1984). AtIPT1 und AtIPT3-AtIPT8 wurden anhand ihrer Homologie zu bakteriellen IPTs als Enzyme klassifiziert, die wahrscheinlich DMAPP auf AMP/ADP/ATP übertragen. Der zweite Hauptweg ist iP unabhängig. Dabei reagiert 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphat (HMBDP) mit AMP/ADP/ATP direkt zu *t*ZRMP, *t*ZRDP und *t*ZRTP (Blackwell und Horgan, 1993; Krall *et al.*, 2002). HMBDP ist ein Zwischenprodukt des MEP-Weges.

Der Nebenweg wird als tRNA-Weg bezeichnet und basiert auf dem Vorkommen von Cytokininresten in tRNAs (Armstrong *et al.*, 1969; Skoog und Armstrong 1970). Bei der Synthese über diesen Weg reagiert die tRNA mit DMAPP zu *c*ZRMP. Drei weitere Schritte müssen für die endgültige Synthese von *cis*-Zeatin ablaufen. In *Arabidopsis* konnte für AtIPT2 und AtIPT9 eine solche katalytische Aktivität gezeigt werden (Kakimoto, 2001; Golovko *et al.*, 2002; Miyawaki *et al.*, 2006).

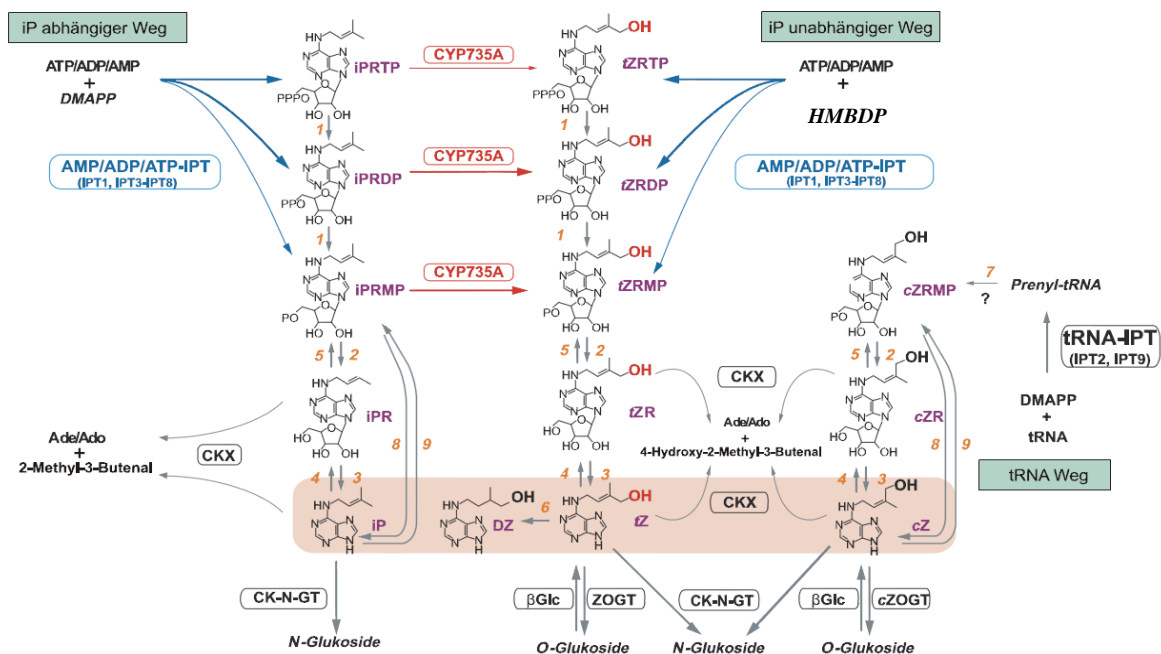


Abb. 2: Schematische Darstellung der Cytokininbiosynthese von Isopentenyladenin, *trans*-Zeatin und *cis*-Zeatin sowie der Konjugate. Die in der Legende nicht aufgeführten Abkürzungen sind dem Text und dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen. (CK-N-GT) Cytokinin-*N*-Glykosyltransferase, (ZOGT) *tZ*-*O*-Glykosyltransferase, (*c*ZOGT) *cZ*-*O*-Glykosyltransferase, (β Glc) β -Glukosidase, (1) Phosphatase, (2) Ribonukleotid-Phosphohydrolase, (3) Adenosinnukleosidase, (4) Purinnukleosidphosphorylase, (5) Adenosinkinase, (6) Zeatinreduktase, (7) *cis*-Hydrolase, (8) Cytokininnukleosid-5'-Moophosphat-phosphoribohydrolase, (9) Adenin-phosphoribosyltransferase. (Sakakibara, 2006; modifiziert durch Köllmer, 2009).

Durch Modifikation können aktive Cytokinine, wie iP oder *t*Z inaktiviert oder gespeichert werden. Bei der Inaktivierung entstehen *N*-Glukoside, die über *N*-Glykosyltransferasen katalysierte Übertragung von Zuckerresten gebildet werden (Hou *et al.*, 2004). Zur

Speicherung der aktiven Cytokinine findet *O*-Glykosylierung statt, wobei *O*-Glykosyltransferasen die Reaktion von Glukose oder auch Xylose mit der OH-Gruppe der Isoprenoidkette katalysieren. Für *tZ* wurde der Vorgang der *O*-Glykosylierung von Martin *et al.* beschrieben (Martin *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2001a; Martin *et al.*, 2001b). *tZ*-Glukosid kann von β -Glukosidasen hydrolisiert werden, um aktives *tZ* freizusetzen (Brzobohaty *et al.*, 1993). Diese Form der Speicherung dient als Regulationsmechanismus, um die Cytokinin-Homöostase aufrechtzuerhalten (Mok und Mok 2001).

Degradation von Cytokinin

Cytokinin ist in der Pflanze für wichtige Entwicklungsprozesse zuständig und wirkt in geringen Konzentrationen, wie auch die anderen Phytohormone. Biosynthese und Abbau von Cytokinin müssen reguliert sein, um eine stabile Homöostase der Cytokininkonzentration aufrecht zu erhalten. Ein wichtiger Faktor für das Gleichgewicht stellt die Degradation von Cytokinin dar. Erstmals wurde Cytokinin-abbauende Enzymaktivität in Tabak-Zellkulturen beschrieben (Paces *et al.*, 1971), bei der enzymatisch iPR inaktiviert und Adenosin gebildet wurde. Enzyme mit vergleichbarer Aktivität wurden in Maiskörnern charakterisiert und als Cytokininoxidasen (CKX) bezeichnet (Whitty und Hall, 1974). In **Abb. 3** ist schematisch die enzymatische Aktivität der Cytokininoxidasen dargestellt. Diese spaltet in einem Schritt Cytokinin (Isopentenyladenin = Beispiel) zu Adenin und dem Aldehyd 3-methyl-2-butenal (Brownlee *et al.*, 1975). CKX-Enzyme besitzen eine FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid)-Domäne (Bezeichnung: FAD-abhängige Oxidoreduktase) (Galuszka *et al.*, 2001), die maßgeblich für die katalytische Aktivität ist. FAD wird im ersten Schritt reduziert und im limitierenden zweiten Schritt durch Übernahme der Elektronen von einem Akzeptor oxidiert. Durch Hydrolyse von Wasser wird die Aminogruppe des N₁₀-Atoms zur Bildung der Endprodukte reduziert.

Der Degradations-Mechanismus ist evolutionär hoch konserviert und ist in verschiedenen Pflanzenarten gleich; einzig die Anzahl der CKX-Gene ist unterschiedlich. Zum Beispiel wurden in Mais bisher fünf CKXs identifiziert von denen ZmCKX1 die erste beschriebene Cytokininoxidase war (Morris *et al.*, 1999). In Reis wurden elf CKX Gene gefunden (Ashikari *et al.*, 2005) und in *Arabidopsis* sieben (Bilyeu *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003). Für die meisten der von diesen Genen kodierten Proteine konnte eine CKX-Aktivität gezeigt werden.

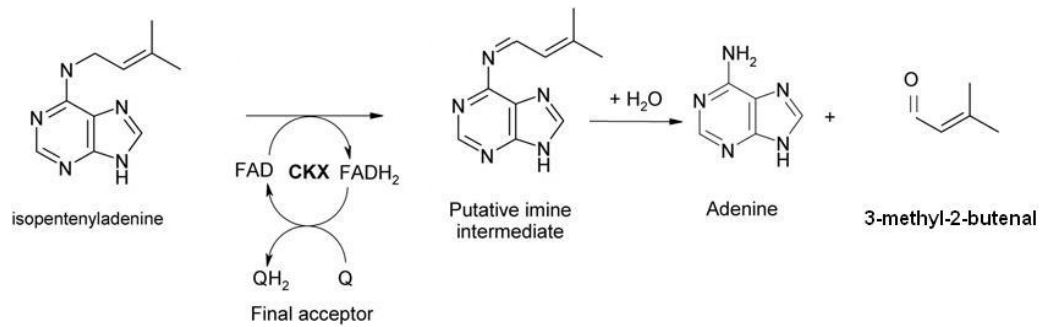


Abb. 3: Schematische Degradation von Cytokinin am Beispiel von Isopentenyladenin. (Quelle: 2008.igem.org/wiki/images/4/4c/Ckxrxn.jpg).

Einige CKX-Enzyme weisen Substratspezifität für bestimmte Cytokine auf. Die bevorzugten Substrate sind iP und tZ, sowie deren Riboside (Armstrong, 1994; Hare und von Staden, 1994; Schmülling *et al.*, 2003). Substratspezifität wurde auch für *Arabidopsis*-CKX-Enzyme beschrieben, die spezifisch iP und tZ und deren Riboside spalten. Dies gilt vor allem für AtCKX2 und AtCKX4, die insgesamt die stärkste Aktivität der CKX-Proteinfamilie haben (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003; Galuszka *et al.*, 2007). AtCKX1, AtCKX3 und AtCKX7 können neben IP, tZ, cZ auch iPRMP und iP9G als Substrat verwenden (Schmülling *et al.*, 2003). Ihre Aktivität für den Abbau von iP9G ist sogar höher als für das Substrat iP (Galuszka *et al.*, 2007) und AtCKX7 ist das einzige Enzym, das cZ mit höherer Aktivität abbaut als tZ. Der jetzige Wissensstand weist darauf hin, dass es in Pflanzen verschiedene *Pools* von Cytokinin geben muss, die Kompartiment-spezifisch sind und unterschiedlich auf Entwicklungsprozesse einwirken. Durch Substratspezifität der Cytokininoxidasen werden diese *Pools* gezielt reguliert.

Bisher wurden detaillierte Lokalisierungstudien von CKX-Proteinen nur für einige Cytokininoxidasen von *Arabidopsis* durchgeführt. Mittels GUS und GFP als Reporter konnten gewebespezifische Expression und subzelluläre Lokalisation in verschiedenen Kompartimenten der Zelle gezeigt werden (Werner *et al.*, 2003). In den Wurzeln werden im Leitgewebe CKX6, in Seitenwurzelpremordien CKX5 und CKX6, im Wurzelapikalmeristem CKX5, in der Wurzelhaube CKX4, in Seitenwurzelspitzen CKX4, am Übergang der Wurzel zum Hypokotyl CKX1 und im Perizykel von Wurzelverzweigungspunkten CKX1 exprimiert. Im Spross werden die CKX-Gene CKX1 und CKX2 im Apex, CKX4 und CKX5 in jungen Blättern, CKX5 in Blattachsen, CKX2 und CKX4 in Stipeln, CKX4 und CKX6 in Spaltöffnungen, CKX4 in jungen Trichomen, und CKX6 im Leitgewebe exprimiert. In Blüten wurde die Expression von CKX1, CKX5, CKX6 und CKX7 gefunden.

Subzelluläre und Organ-spezifische Lokalisationen konnten für *CKX1-CKX3* gezeigt werden (Werner *et al.*, 2003). Das CKX1-GFP Fusionsprotein akkumuliert in Vakuolen der Wurzelzellen im Zentralzylinder. CKX2-GFP ist lokalisiert in Stomata, ER und der Petiole. CKX3-GFP hingegen zeigt eine Akkumulation in allen Vakuolen und in ER-ähnlichen Strukturen.

1.8 Cytokininsignaltransduktion und Transport

Cytokininsignaltransduktion:

Die Cytokininsignaltransduktion in höheren Pflanzen basiert auf dem Zwei-Komponenten-Signalsystem (ZKS), welches aus Prokaryonten und Eukaryonten bekannt ist. In **Abb. 4** ist das Modell der Cytokininsignaltransduktion von *Arabidopsis* dargestellt. Für alle beteiligten Komponenten konnten in *Arabidopsis* Gene identifiziert werden. Grundlegend wird das Signal (Cytokinin) von einer *Arabidopsis*-Histidin-Kinase (AHK) durch Ligandenbindung an die Chase-Domäne des membranständigen Rezeptors registriert (Heyl und Schmölling, 2003). Daraufhin kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und anschließend zur Autophosphorylierung eines konservierten Histidins. In *Arabidopsis* wurden bislang die drei Cytokininrezeptoren *AHK2*, *AHK3*, *CRE1/AHK4* identifiziert (Inoue *et al.*, 2001; Ueguchi *et al.*, 2001a; Ueguchi *et al.*, 2001b). Nach der Dimerisierung des Rezeptors wird das Phosphat (P) auf ein Histidin eines Phosphattransmitter-Proteins (AHP) übertragen, von denen in *Arabidopsis* fünf verschiedene identifiziert wurden (Suzuki *et al.*, 2000). Das AHP wird abschließend in den Kern transportiert und das Phosphat von AHP auf ein Aspartat in der N-terminalen *Receiver*-Domäne eines *Arabidopsis Response Regulator* (ARR) übertragen. ARRs stellen Transkriptionsfaktoren dar, die abschließend entweder diverse Zielgene aktivieren oder in eine negative *feed-back* Regulation der Cytokininantwort involviert sind (Heyl *et al.*, 2006; Santner *et al.*, 2009; Hwang und Sheen, 2001; To *et al.*, 2004; To *et al.*, 2007). Die 23 ARRs in *Arabidopsis* werden in zwei Gruppen unterteilt: Die B-Typ ARRs haben eine lange C-terminale Domäne, die Transkriptionsfaktoraktivität besitzt (Hutchison und Kieber, 2002), vermittelt durch die GARP-Domäne, die Zielgene bindet und diese aktiviert bzw. positiv reguliert (Hwang und Sheen 2001). A-Typ ARRs haben nur eine kurze C-terminale Domäne und können keine DNA binden bzw. als Transkriptionsfaktor wirken (Heyl *et al.*, 2006). Des Weiteren sind sie stark durch Cytokinin induzierbar, was sie als

primäre Antwortgene auszeichnet (D'Agostino *et al.*, 2000), im Kontrast zu den B-Typ ARR, die nicht direkt induzierbar sind. Aus diesem Grund wird Typ A ARR5 aufgrund seiner Cytokinininduzierbarkeit als Marker gen der Cytokininantwort benutzt (Kudryakova *et al.*, 2008).

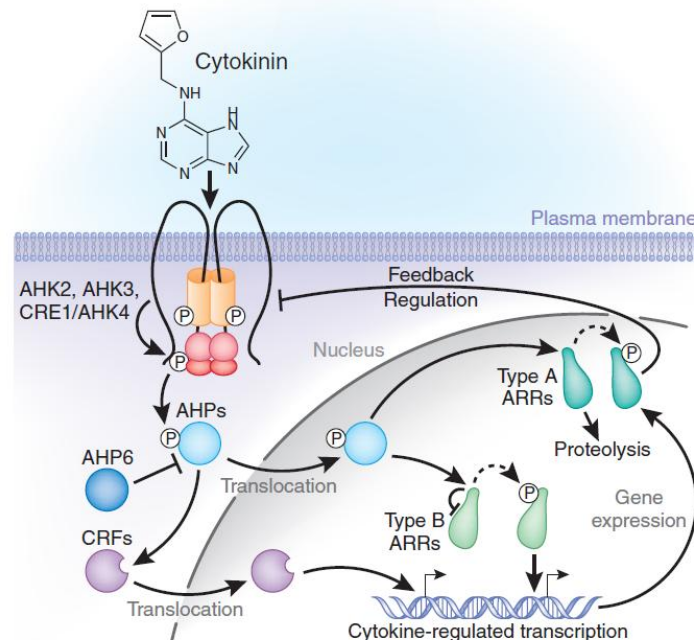


Abb. 4: Model der Cytokinintransduktion (Santner *et al.*, 2009).

Cytokinintransport:

Grundlegend ist noch wenig über den Cytokinintransport in höheren Pflanzen bekannt. Der Cytokinintransport findet über das Phloem und den Xylemsaft statt. Im Phloem werden hauptsächlich die Riboside und *O*-, wie auch *N*-Glukoside transportiert, während im Xylem nicht-konjugiertes, freies Cytokinin vorliegt. Das im Xylem transportierte Cytokinin wirkt als Signalmolekül, wie zum Beispiel bei der Übermittlung des Nitratstatus der Wurzel an den Spross (Takai *et al.*, 2001; Takai *et al.*, 2002). Der Langstreckentransport scheint für die Cytokininwirkung eher nebensächlich zu sein, da biologisch gesteuerte Prozesse, wie Seneszenz oder das Auswachsen von Seitenknospen, lokal gesteuert und über lokal produziertes Cytokinin reguliert werden. Des Weiteren scheint es in Pflanzen auch Transportproteine für den zellulären Transport von Cytokinin zu geben. Cytokinintransportaktivität wurde für die Purinpermease PUP1 nachgewiesen. Purinpermeasen werden in *Arabidopsis* von einer Multigenfamilie mit 15 Vertretern kodiert. Die PUP Proteine zeigen aber keine absolute Spezifität für Cytokinine, sondern können auch

Adenin und Cytosin mit hoher Affinität transportieren. Gezeigt wurde jedoch, dass Phytohormone wie Kinetin oder Zeatin den Adenintransport durch Verdrängung inhibieren (Gillesen *et al.*, 2000).

1.9 Die Rolle von Cytokinin in der Pathogenese und Pathogenabwehr

Bezüglich der Rolle von Pflanzenhormonen bei der Pathogenabwehr sind die Phytohormone Salizylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen (Et) am besten charakterisiert. SA spielt primär eine Rolle in der Resistenz gegen biotrophe Pathogene und JA sowie Et sind in der Abwehr nekrotropher Pathogene und herbivorer Insekten involviert. Vielfach wird eine antagonistische Wirkung zwischen SA und JA/Et beschrieben. Neue Studien zeigen, dass dieses Modell deutlich komplexer zu sein scheint, da es auch zu synergistischen Interaktionen kommt (Beckers und Spoel, 2006; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Loake und Grant, 2007; Truman *et al.*, 2007) und andere Phytohormone ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Die Funktionen der Phytohormone Auxin, Cytokinin, Gibberellinsäure und Brassinosteroide bei der Pflanze-Pathogen-Interaktion sind nur oberflächlich bekannt. Zusätzlich wird die Analyse durch die Eigenschaft der Pathogene, selbst Phytohormone oder ähnliche Derivate zu erzeugen, die in den pflanzlichen Hormonhaushalt eingreifen, erschwert (Seilaniantz *et al.*, 2007).

Von einigen Pilzen und Bakterien ist bekannt, dass sie den Cytokininhaushalt auf positive oder negative Weise manipulieren können. Die Erhöhung der Cytokininkonzentration spielt in der Interaktion *Arabidopsis* - *Plasmodiophora brassicae* eine wichtige Rolle (Siemens *et al.*, 2006). Der Pilz löst die Krankheit Kohlhernie aus, die auf einer Steigerung der Cytokinin- bzw. Auxinkonzentration basiert. Durch erhöhte Zellteilungsaktivität resultiert Gallenbildung, vergleichbar mit dem *Agrobacterium tumefaciens*-System. Cytokininoxidase-Mutanten mit verringerten Cytokininkonzentrationen zeigen bei Befall mit *Plasmodiophora brassicae* weniger ausgeprägte Symptome (Siemens *et al.*, 2006). Auch *Piriforma indica* nutzt in der Interaktion mit Pflanzen erhöhte Cytokininkonzentrationen, um sich besser auszubreiten (Vadassery *et al.*, 2008). Beispiel für eine Reduzierung der Cytokininmenge nach Pathogenbefall ist die Interaktion zwischen *V. dahliae* und Tomate. Es ist bekannt, dass *Verticillium*-Infektion zu einer Reduzierung der Cytokininkonzentration in infizierten Pflanzenbereichen und allgemein im Xylemsaft führt (Patrick *et al.*, 1977). Dies ist wahrscheinlich von Vorteil für einen hemibiotroph wachsenden Pilz, da durch Reduktion des

Cytokiningehalts verfrühte Seneszenz ausgelöst wird. Durch die Seneszenz kann sich der Pilz in der nekrotrophe Phase von dem absterbenden Pflanzenmaterial ernähren und dadurch stark proliferieren sowie Mikrosklerotien zur Überdauerung bilden. Bei diesen Interaktionen wird die Cytokinin-Homöostase zum Vorteil der Pathogene moduliert und spielt keine Rolle in der Pathogenabwehr.

Werden Wirtspflanzen nun genetisch so manipuliert, dass bei Pathogenbefall die Cytokinin-Homöostase aufrechterhalten wird, so ist als Folge die Symptomentwicklung abgeschwächt. *Botrytis cinerea* induziert Seneszenz und es konnte gezeigt werden, dass durch Pathogen-induzierte Cytokininbiosynthese die ausgelöste Krankheitssymptomatik abgeschwächt wird (Swartzberg *et al.*, 2008). Gleiche Ergebnisse lassen sich mit einer exogenen Behandlung von Cytokinin erzielen. Mit *Bremia lactucae* (falscher Mehltau) infizierter und mit Cytokinin behandelter Salat zeigte eine deutliche Reduktion des Pilzwachstums (Prokopova *et al.*, 2010). Auch Getreide-Mehltau (*Erysiphe graminis*) wird durch exogene Cytokinbehandlung in seiner Infektiosität drastisch inhibiert (Babosha *et al.*, 2009). Ein direktes Zusammenspiel zwischen Cytokinin und Pathogenabwehr konnte von Choi *et al.* (2010) in der Interaktion von *Pseudomonas syringae* DC 3000 mit *Arabidopsis* gezeigt werden. Mutanten mit einer modifizierten Cytokininkonzentration (CKX-, IPT-Überexpressionslinien/*Knockouts*) oder Signaltransduktions-Mutanten zeigen der Mutation entsprechend veränderte Resistenz. Dabei vermittelt der Transkriptionsfaktor ARR2, an den TGA3 binden kann, spezifisch die Pflanzenimmunität gegenüber *Pseudomonas syringae* DC 3000 mittels SA abhängiger TGA3/NPR1 Signaltransduktion.

1.10 Das vaskuläre System der Pflanze (Bildung und Aufbau)

Das vaskuläre System (Übersicht):

Das vaskuläre System der Pflanze ist grundlegend zuständig für Wasser- und Nährstofftransport. Es besteht aus zwei Gewebekomplexen, dem Xylem und dem Phloem. Das Xylem dient vor allem dem Ferntransport von Wasser, Nährsalzen und im geringen Maß von Aminosäuren bzw. Zucker, während das Phloem die Assimilate der Blätter transportiert. Das Xylem besteht aus verschiedenen Elementen, wie Tracheiden und Tracheen, Holzfasern und Xylem-Parenchymzellen. Die Tracheiden sind langgestreckte, spindelförmig zugespitzte Einzelzellen und Tracheen formen lange Röhren, die durch Verschmelzung von Einzelzellen

entstehen. Beide Leitgefäße sind im funktionsfähigen Zustand tote Strukturen, da sie ausschließlich aus Zellwand bestehen. Wasser wird über den Transpirationssog transportiert und hierbei entstehen hohe Saugspannungen. Damit die Gefäße mangels Turgor nicht kollabieren, werden sie durch Aussteifungen der Zellwände mittels netzartiger, spiraliger, oder ringförmiger Leisten verstärkt. Die Leitelemente sind von Tüpfeln durchzogen, die eine Verbindung zwischen parallel laufenden Elementen bilden.

Das Phloem besteht aus Siebzellen, Siebröhren mit Geleitzellen, Phloemparenchymzellen und Phloemfasern. Diese Strukturen sind im Gegensatz zum Xylem lebendig. Siebröhren werden durch Siebporen bzw. Siebplatten miteinander verbunden, die aus Plasmodesmata entstanden und mit Kallose ausgekleidet wurden. Die Funktionalität der Siebröhren ist nur in der Vegetationsphase gegeben und sie müssen bei mehrjährigen Pflanzen jährlich ersetzt werden (Lüttge *et al.*, 2002).

Wurzelaufbau (Übersicht):

Grundlegend besteht die Wurzel aus verschiedenen Zonen, die sich morphologisch unterscheiden. In **Abb. 5 A** ist schematisch der Aufbau einer dikotylen Wurzel dargestellt. Diese setzt sich aus Wurzelspitze, Elongationszone und Differenzierungszone zusammen. In **Abb. 5 (B, C)** ist der Querschnitt einer *Arabidopsis*-Wurzel dargestellt, der den grundlegenden Aufbau einer Wurzel zeigt. Der Aufbau des Zentralzylinders ist Art-spezifisch und wie folgt organisiert: Epidermis (oder Rhizodermis), Kortex (Speichergewebe), Perizykel, Endodermis und Zentralzylinder (Phloem, Proto- und Metaxylem). Die Endodermis dient als natürliche Schutzbarriere gegen pathogene Organismen. Die radiären Zellwände der Endodermis sind mit einer suberinähnlichen Substanz imprägniert und diese Schicht der Endodermis wird auch als Casparischer Streifen bezeichnet. Das Perizykel oder Perikambium spielt eine Rolle beim sekundären Dickenwachstum und der Seitenwurzelbildung.

Die verschiedenen Zonen der Wurzel haben unterschiedliche Aufgaben. Die Wurzelkappe (Kalyptra) schützt beim Wachstum in der Erde den Vegetationspunkt der Wurzel. Randständige Zellen sondern Schleim ab, lösen sich beim Wachstum aus dem Zellverband und wirken so beim Vorschub als Gleitmittel. In der Differenzierungszone findet die Zellteilung und deren Bestimmung statt. In der Elongationszone strecken sich die Zellen und teilen sich kaum noch. Darauf folgt die Differenzierungs-Zone, in der Epidermiszellen zu

Wurzelhaaren differenzieren und so Wasser und Nährstoffe aufnehmen können (Lüttge *et al.*, 2002).

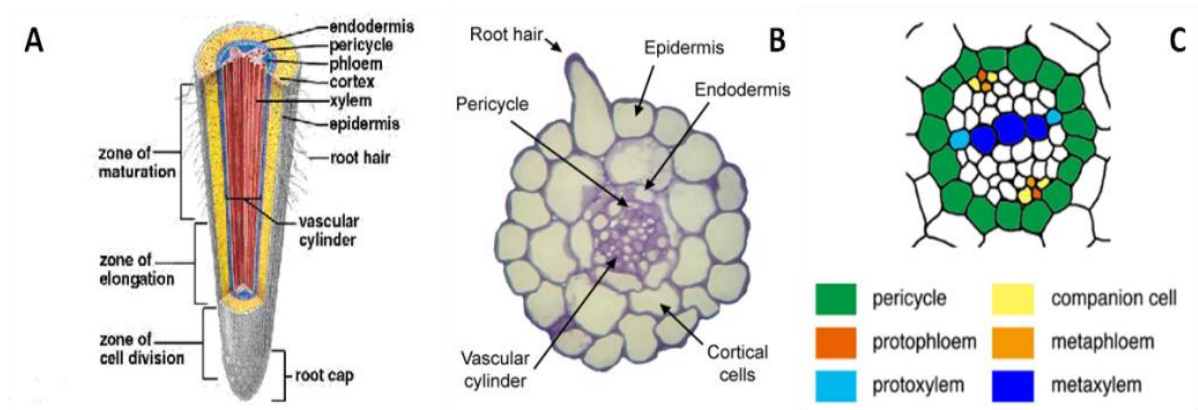


Abb. 5: (A) Schematische Darstellung der Wurzelzonen und des Wurzelbaus (<http://excellup.com/InterBiology/morphologyplant.aspx>), (B) Querschnitt durch eine *Arabidopsis*-Wurzel ([http://www.crc.uga.edu/~mao/ultrast/root /root.htm](http://www.crc.uga.edu/~mao/ultrast/root/root.htm)), (C) Schematische Darstellung einer *Arabidopsis*-Wurzel (Kubo *et al.*, 2005).

Prozesse in der Tracheen-Differenzierung:

Zellen des meristematischen Gewebes des Embryos oder des Perikambiums differenzieren in der vaskulären Entwicklung zu verschiedenen Xylemzellen. Kaskaden von differentieller Genregulation sind dafür notwendig, wie auch die Phytohormone Auxin, Cytokinin und Brassinosteroide. Xylemzellen können auch durch Transdifferenzierung aus somatischen Zellen hervorgehen. Ein sehr gut charakterisiertes System zur Untersuchung der *de novo* Xylembildung durch Transdifferenzierung sind *Zinnia* Mesophyllzellen, die nach Applikation von Auxin und Cytokinin über einen Dedifferenzierungsschritt Xylemelemente bilden. In **Abb. 6** ist schematisch die Xylemdifferenzierung dargestellt. Während der Xylementwicklung durchlaufen die Zellen mehrere Differenzierungsschritte. Grundlegend muss die Identität der Zelle festgelegt werden, die dann Streckenwachstum, Einlagerung von sekundären Zellwand-Ablagerungen und programmierten Zelltod durchlebt, bis sich ein Leitgefäß entwickelt (Turner *et al.*, 2007). Diese Prozesse wurden in den Modellsystemen *Arabidopsis*, Pappel und *Zinnia elegans* beschrieben.

In den folgenden Abschnitten wird die Rolle der Phytohormone und spezieller Transkriptionsfaktoren bei der Xylemdifferenzierung näher betrachtet. Phytohormone spielen eine große Rolle in der frühen Differenzierungsphase.

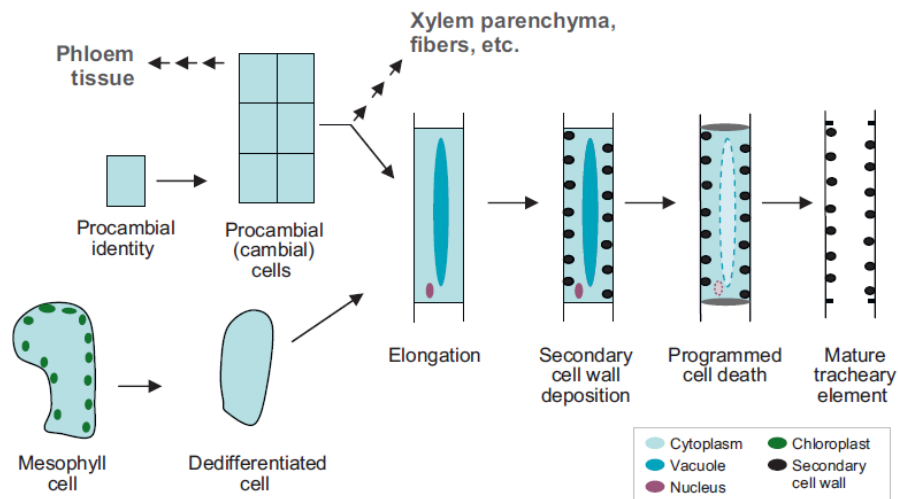


Abb. 6: Schematische Darstellung der Xylemdifferenzierung aus perikambialen-Zellen und Mesophyllzellen (Turner *et al.*, 2007).

Auxin ist bei normaler Xylementwicklung wie auch bei Neubildung von Gefäßen nach Verwundung involviert (Sachs, 1991). Mittels Mutanten der Auxin-Signalkaskade konnte die Rolle von Auxin in frühen Stufen der Bildung von procambialen-Zellen identifiziert werden (reviewed in Sieburth *et al.*, 2006; Carlsbecker *et al.*, 2005). Hohe Konzentrationen an Auxin wurden auch bei Untersuchungen von sekundärem Dickenwachstum im Kambium von Pinien gefunden (Uggla *et al.*, 1996). Durch das *Zinnia*-Modell (Fukuda und Komamime, 1980), welches auf einer Dedifferenzierung von Mesophyllzellen mit anschließender Transdifferenzierung zu Xylemzellen basiert, konnten viele Faktoren der Xylemdifferenzierung beschrieben werden. Das Medium enthielt neben Auxin auch Cytokinin. Durch das *Zinnia*-Modell konnten diverse Auxin-Gene der Signaltransduktion identifiziert werden, die während der Differenzierung verstärkt exprimiert wurden (Demura *et al.*, 2002).

Die Rolle von Cytokinin in der vaskulären Differenzierung wurde über die *Arabidopsis-woodenleg* (*wol*)-Mutante entdeckt. Diese hat weniger Zellschichten im vaskulären Zylinder der Primärwurzel, die aber alle zu Xylem differenziert sind, während das Phloem fehlt (Scheres *et al.*, 1995). *WOL* entspricht dem Allel des Cytokinin-Rezeptors *CRE1* (Mahonen *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001). Überexpression von *ARR22*, einem *Response Regulator* der nicht den B- oder A-Typen zugeordnet werden kann, führt zu einem ähnlichen Phänotyp, wie dem der *wol*-Mutante (Kiba *et al.*, 2004). Dies deutet auf eine regulatorische Funktion von *ARR22* in der Xylemdifferenzierung hin. Von Yokoyama *et al.* (2007) konnte gezeigt werden, dass B-Typ Transkriptionsfaktoren, *ARR10* und *ARR12*, in Cytokinin vermittelter Protoxylemdifferenzierung der Wurzeln eine Rolle spielen. Neben B-Typ ARRs sind auch A-

Typ ARRs (Kiba *et al.*, 2002) in Gefäßdifferenzierungsprozesse involviert. Grundsätzlich zeigen diese Ergebnisse, dass Cytokinin eine wichtige Rolle in der Xylementwicklung spielt. In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Brassinosteroide (BR) ebenfalls wichtig für die Regulation der Xylementwicklung sind. Dem *Zinnia*-System wurde Uniconazol (Brassinosteroid- und Gibberellin-Biosynthese-Inhibitor) hinzugegeben und damit die Transdifferenzierung inhibiert. Diese Hemmung konnte mit Verabreichung von Brassinosteroiden rückgängig gemacht werden (Iwasaki *et al.*, 1991). Weitere Hinweise lieferten Experimente mit *Arabidopsis*-BR-Biosynthese-Mutanten. Die *cpd*- und *dwf7*-Mutanten haben weniger Xylemgefäße als der Wildtyp (Choe *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte mit Brassinazol, einem BR-Biosynthese-Inhibitor, die Entwicklung von sekundärem Xylem in *Lepidium sativum* inhibiert werden (Nagata *et al.*, 2001). Neben der Biosynthese haben auch die BR-Rezeptoren BRL1 und BRL3 eine Funktion in der vaskulären Differenzierung (Cano-Delgado *et al.*, 2004), deren Mutanten Phänotyp ähnlich der *bri*-Mutante ist, die mehr Phloem im Verhältnis zu Xylem aufweist (Li und Chory 1997). Überexpression von *BRI1* führt zu mehr Xylem.

Im *Zinnia*-System wurden diverse NAC-Transkriptionsfaktoren identifiziert, die während der Xylem-Differenzierung hochreguliert sind. Die Gene werden als *Vascular Related NAC Domain* (VNDs) Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Alle sieben Vertreter der Familie in *Arabidopsis* zeigen unterschiedliche Expressionsprofile. Es konnte nachgewiesen werden, dass *VND6* eine wichtige Rolle in der Metaxylementwicklung spielt und *VND7* für Protoxylembildung wichtig ist (Kubo *et al.*, 2005). Beide scheinen die "Master-Regulatoren" zu sein, während die anderen VNDs eher in Vorgängen eine Rolle spielen, die nicht für die Xylembildung relevant sind. Von Soyano *et al.*, 2008 wurde gezeigt, dass "Asymmetric Leaves2-Like19/Lateral Organ Boundaries Domain 30" (*ASL19/LBD30*), *ASL20/LBD18* in einer *feedback*-Schleife mit *VND6* und *VND7* wirken und somit regulatorisch in die Xylemdifferenzierung eingreifen. Beide ASL sind pflanzenspezifische Kernproteine, die eine Rolle in der pflanzlichen Entwicklung spielen.

1.11 Zielsetzung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war zunächst eine generelle zellbiologische Charakterisierung der Interaktion von *V. longisporum* mit der Modellpflanze *A. thaliana*. Hieraus resultierten zwei Hauptaspekte, unter denen der Infektionsverlauf einer genaueren molekularen Analyse zugeführt werden sollte.

Der erste Teil der Arbeit untersucht das Symptom der verfrühten Seneszenz, die durch *V. longisporum* ausgelöst wird. Dieses Krankheitsbild ist für die hohen Ernteverluste bei Raps verantwortlich, da weniger und kleinere Schoten gebildet werden und zusätzlich das Saatgut mit Mikrosklerotien kontaminiert ist. Es sollte geklärt werden, inwieweit verfrühte Seneszenz für den Lebenszyklus des Pilzes eine Rolle spielt und was die molekularen Ursachen für dieses Symptom sind. Dazu wurde die Cytokininbiosynthese und -degradation auf Veränderungen in der Expression untersucht, sowie ausgewählte Gene der Cytokinin-Signaltransduktion. Des Weiteren sollte durch verschiedene experimentelle Ansätze überprüft werden, inwieweit eine Stabilisierung der Cytokinin-Homöostase den Infektionsverlauf beeinflusst und wie *V. longisporum* darauf reagiert.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit sollte ein Phänomen untersucht werden, das bisher noch bei keiner anderen Interaktion zwischen vaskulären Pilz- oder allgemein Pflanzenpathogenen und Pflanze beschrieben wurde. So konnte in zellbiologischen Interaktionsanalysen eine Transdifferenzierung von Bündelscheidenzellen des Blattes zu Proto- und Metaxylem-ähnlichen Strukturen beobachtet werden. Pathogen induzierte Transdifferenzierung ist ein von der bereits beschriebenen Steigerung der kambialen Aktivität im Zentralzylinder des Hypokotyls zu unterscheidender Prozess, da hierdurch Zellen mit einer festen Funktion eine völlig neue Aufgabe bekommen. In dieser Arbeit sollte die biologische Relevanz der Pathogen-induzierten Transdifferenzierung experimentell erforscht werden. Folgende alternative Arbeitshypothesen wurden aufgestellt:

1. *Verticillium* nutzt die induzierte Transdifferenzierung zur besseren Ausbreitung, da er das vaskuläre System der Pflanze zur systemischen Besiedlung der Pflanze benötigt.
2. Der Wasserhaushalt der Pflanze wird während einer *Verticillium*-Infektion durch Transdifferenzierung positiv beeinflusst, da die *de novo* gebildeten Xylemelemente die als Folge der Infektion nicht mehr funktionellen Xylemelemente ersetzen.
3. Transdifferenzierung von Bündelscheidenzellen beeinflusst den Nährstoffexport aus seneszenten Blättern und erhöht dadurch das Nährstoffangebot für *Verticillium* während der nekrotrophen Phase.

In Bezug auf die Arbeitshypothesen sollte geklärt werden, ob es sich bei der Transdifferenzierung um eine aktive Modulation durch den Pilz, oder eine generelle Antwort der Pflanze handelt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

Ökotyp/Linie/Mutante	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
<i>Brassica napus</i>	Sorte: Drakkar	AG Tiedemann
Columbia, Col-0	<i>Arabidopsis</i> Wildtyp	N1092
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Wildtyp	Botanischer Garten Göttingen
<i>Solanum lycopersicum</i> (MM)	Sorte: Money Maker (MM)	Thompson und Morgan seeds
Wassilewskija, Ws	<i>Arabidopsis</i> Wildtyp	N1601
35S:MAP4-GFP	Überexpressionslinie eines Mikrotubuli assoziierten Gens gekoppelt an GFP	AG Friml Marc <i>et al.</i> , 1998
35S:VND7	Überexpressionslinie des Transkriptionsfaktors <i>VND7</i> in <i>A. thaliana</i> Col-0	Kubo <i>et al.</i> , 2005
pARR5:GUS	Promotor Reporter GUS Konstrukt des Cytokinin sensitiven Gens <i>ARR5</i> in <i>A. thaliana</i> Col-0	Kudryakova <i>et al.</i> , 2008
pPer21:Vnd7-SRDX	Repression von <i>VND7</i> , reguliert durch den <i>PER21</i> Promotor in <i>A. thaliana</i> Col-0	diese Arbeit
pSAG12:IPT	3,2kb Fragment wurde in pCamb2300 kloniert und damit Col-0 transformiert; Cytokinin- produktion, reguliert vom SAG12 Promotor	Gan <i>et al.</i> , 1995 (diese Arbeit)
pVND7:GUS	Promotor Reporter GUS Konstrukt des Transkriptionsfaktors <i>VND7</i> in <i>A. thaliana</i> Col-0	Kubo <i>et al.</i> , 2005

2.1.2 Bakterien

Stamm	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	recA1 relA1 thi-1 Δ lacU 169 ϕ 80 (lacZ Δ M15) hsdR17(rk-mk+)	Hanahan 1983

<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	PMP90 <i>rif^r</i> , <i>gent^r</i>	Deak <i>et al.</i> , 1986
---	--	---------------------------

2.1.3 Pilze

Isolat	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
<i>Vl43</i>	isoliert in Mecklenburg/Deutschland	Zeise und von Tiedemann, 2002
<i>eGFP-Vl43</i>	eGFP-Reporterstamm von <i>Vl43</i>	Eynck <i>et al.</i> , 2007
<i>Vd830</i>	isoliert in Ohio/USA	Zeise und von Tiedemann, 2002
<i>dsRed-Vl43</i>	dsRED-Reporterstamm von <i>Vl43</i>	produziert von Van Tuan (Abteilung G. Braus Uni-Göttingen)

2.1.4 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pSG516	Plasmid beinhaltet das <i>pSAG12:IPT</i> Konstrukt, <i>amp^r</i>	Gan <i>et al.</i> , 1995
pCambia2300	Binärvektor für Agrobakterien-Transformation; Selektion Bakterien, Pflanze <i>kan^r</i>	Abteilung C. Gatz
pCambia2300/pSAG12:IPT	Binärvektor beinhaltet <i>pSAG12:IPT</i> Konstrukt, Selektion Bakterien, Pflanze <i>kan^r</i>	diese Arbeit
pCambia2300/pPer21:VND7-SRDX	Binärvektor beinhaltet <i>pPer21:VND7-SRDX</i> Konstrukt, Selektion Bakterien, Pflanze <i>kan^r</i>	diese Arbeit (GenScript)

2.1.5 Pflanzenmedien

1/2 Murashige und Skoog (MS)-Medium: (Murashige und Skoog, 1962)

MS + Vitamine	2,2 g/l
MES	0,5 g/l
Saccharose	10 g/l

pH-Wert mit 1 N KOH auf 5,7 einstellen

7,5 g/l Plant-Agar (Duchefa) für Pflanzenselektion mit Antibiotika

15 g/l Plant-Agar (Duchefa) für Schrägagarplatten

Agaraoseplatten

10 g/l Plant-Agar (Duchefa)

2.1.6 Bakterienmedien

LB-Medium:

Pepton 15 g/l

Hefeextrakt 5 g/l

NaCl 10 g/l

pH-Wert auf 7,2 einstellen mit 1 N NaOH

fest: 15 g/l Bacterial-Agar (VWR)

DYT-Medium:

Pepton 16 g/l

Hefeextrakt 10 g/l

NaCl 10 g/l

keinen pH-Wert einstellen

fest: 15 g/l Bacterial-Agar (VWR)

2.1.7 Pilzmedien

Die Pilzmedien wurden bei Sigma, Duchefa eingekauft und nach Herstellerangaben angesetzt.

Um bakterieller Kontamination vorzubeugen, wurde dem Medium 500 µg/ml Cefotaxim (cef) beigefügt.

Medium	Hersteller
Czapek Dox (CPD)	Sigma
Potato Dextrose Broth (PDB)	Duchefa

2.1.8 Oligonukleotide für Sequenzierung

Seq pSAG12 forw	tgctgtcctcaactatcg
Seq pSAG12 rev	cgatagttgaggacagca

pPer21:VND7-SRDX-forw	cccgggctcgaggggacttt
pPer21:VND7-SRDX-rev	acgcggccgccccgggta
pCambia2300 uni24	ttcacacaggaacagctatgac
pCambia2300 rev23	acgacgttgtaaacgacggccag

2.1.9 Oligonukleotide für qRT-PCR

Primer wurden über ein Tool der Firma Roche hergestellt (<https://www.roche-applied-science.com>)

ATG-Nummern	Gen	Roche-Sequenz 5'-3'
AT2G41510	CKX1 forw	ctgagaagcgggaattctgaac
AT2G41510	CKX1 rev	gagtaccctgatccatttaacca
AT2G19500	CKX2 forw	gaggtttggtcaatttgga
AT2G41510	CKX2 rev	agagcatccgaaaccatttg
AT5G56970	CKX3 forw	tctcaatacacagtcaacgagga
AT5G56970	CKX3 rev	tcgtacataaacctcttacatgg
AT4G29740	CKX4 forw	ccctcccattattgaccag
AT4G29740	CKX4 rev	cgaaatacggaacatctgtacg
AT1G75450	CKX5 forw	ccatggtcctcaaattagtaacg
AT1G75450	CKX5 rev	tctgagcatctcatcacctctc
AT3G63440	CKX6 forw	caactggagattgtcacaggaa
AT3G63440	CKX6 rev	cctaaaccaccaagaacacca
AT5G21482	CKX7 forw	caccagagctagggtttg
AT5G21482	CKX7 rev	catcgaactcgggtgtatactactctt
AT2G18060	VND1 forw	ggaaaacacttgtgtctacaaagg
AT2G18060	VND1 rev	caaaccaccatccttcttc
AT4G36160	VND2 forw	cgaacctgggatttacaaga
AT4G36160	VND2 rev	tgtttgttctgttctgttgg
AT5G66300	VND3 forw	cgaacctgggatctacaaga
AT5G66300	VND3 rev	cggtttgcctagtcccagtc
AT1G12260	VND4 forw	tggcatgaggaaaacacttg
AT1G12260	VND4 rev	ccctacacacaaccatcct
AT1G62700	VND5 forw	aaaatggaaccctcaggaa
AT1G62700	VND5 rev	gctgatcatctaccaatgc
AT5G62380	VND6 forw	gccatgggacatccaaga

AT5G62380	VND6 rev	tgtggctaaagaaataccattcc
AT1G71930	VND7 forw	cacgaataccgtctccaaaact
AT1G71930	VND7 rev	cctaaatgctcgacacacca
AT4G00220	ASL19/LBD30 forw	agcgagcaacgtctccaa
AT4G00220	ASL19/LBD30 rev	acggcgtctggtcgtttat
AT2G45420	ASL20 forw	cgctgctcacatctttgct
AT2G45420	ASL20 rev	tgccaaatgggcttgaagt
AT3G16857	ARR1 forw	gcgcaacttctaagcaggaa
AT3G16857	ARR1 rev	tggagtatcgctcaagtcg
AT4G16110	ARR2 forw	cgttgatgatgaccaactgt
AT4G16110	ARR2 rev	tccgaagcagagacaatgc
AT1G10470	ARR4 forw	gtcatcgagagattgcttcgt
AT1G10470	ARR4 rev	acgccatccactatctaccg
AT3G48100	ARR5 forw	tcagagaacatcttgctcgt
AT3G48100	ARR5 rev	atttcacaggcttcaataagaaatc
AT5G62920	ARR6 forw	gaacattttgcctcgtattgatag
AT5G62920	ARR6 rev	cgagagttttaccggcttca
AT1G19050	ARR7 forw	tcatctgagaacatcttacctcgt
AT1G19050	ARR7 rev	ttcaccggttcaacaagaat
AT4G31920	ARR10 forw	cttcagcgtgccaatc
AT4G31920	ARR10 rev	gttctccctcaacaactccaa
AT2G25180	ARR12 forw	ctccacgatgaagcaggaa
AT2G25180	ARR12 rev	aactaaacctccatatcccaaa
AT3G62250	UBQ5 forw	gacgcttcatctcgtcc
AT3G62250	UBQ5 rev	gtaaacgtaggtgagtcca
AT1G49240	act8 forw	ggttttccccagtggtgttg
AT1G49240	act8 rev	ctccatgtcatcccagttgc
Basiert auf ITS Sequenz von <i>VI43</i>	Olg70 forw	cagcgaaacgcgatattgtag
Basiert auf ITS Sequenz von <i>VI43</i>	Olg70 rev	ggcttgtagggggtttaga
AT5G45890	SAG12 forw	gtgtctacgggatgtgaag
AT5G45890	SAG12 rev	cagcaactgattaccgca

2.1.10 Antibiotika

Substanz	Endkonzentration	Konzentration der Stammlösung
Ampicillin (amp)	100 µg/ml	100 mg/ml in ddH ₂ O
Cefotaxim (cef)	500 µg/ml	250 mg/ml ddH ₂ O
Gentamicin (gent)	25 µg/ml	25 mg/ml ddH ₂ O
Hygromycin B (hyg)	25 µg/ml	50 mg/ml Methanol
Kanamycin (kan)	50 µg/ml	50 mg/ml ddH ₂ O
Rifampicin (rif)	100 µg/ml	100 mg/ml DMSO

2.1.11 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I, RNase-free	Fermentas
DreamTaq™ DNA Polymerase	Fermentas
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas
Fast Digest - Restriktionsenzyme	Fermentas
Pfu DNA Polymerase	Fermentas
Proteinase K	Fermentas

2.1.12 Kits

Kit	Hersteller
DNeasy Plant Mini Kit	Quiagen
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas
innu Speee Plant RNA	Analytik Jena
Nucleo Spin® Extract II	Macherey-Nagel
Phire® Plant Direct PCR Kit	Finnzymes
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas

2.1.13 Geräte

Gerät	Model	Hersteller/Lieferant
Autoklav	Varioklav	Thermo Scientific
Digitalkamera	DSC-H5	Sony
Elektroporationsapparatur	Micro Pulser	Bio-Rad
Feinwaage		Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	DM 5000B	Leica
-80°C Gefriertruhe		Thermo Scientific
Geldokumentationsanlage	Geno Plex	VWR
Gelelektrophoresekammer	BlueMarine™ 200	Serva
Heizschrank		Thermo Scientific
Klimakammer I		KEES Klima & Kälte Technik
Klimakammer II		York
Kühlzentrifuge I	Heraeus Pico 21	Thermo Scientific
Laser Scanning Mikroskop	SP5	Leica
Magnetrührer	RH basic 2 IKAMAG®	IKA
Mikrowelle	R26-ST	Sharp
Mini Zentrifuge	Galaxy Mini Star	Schütt 24 GMBH
PCR-Cycler	My Cycler™	Bio-Rad
Pflanzenkulturschrank		Percival
pH-Meter	WTW-series	inoLab
qRT-PCR Maschine	MyIQ	Bio-Rad
Photometer I	Biowave II	WPA
Photometer II	Infinite M200	Tecan
Schüttelinkubationsschrank	Certomat ^(R) BS-1	Sartorius
Standzentrifuge mit Ausschwingrotor	Multifuge 3SR+	Heraeus/Thermo Scientific
Sterilwerkbank	Hera Safe	Thermo Scientific
Thermomixer		Eppendorf
Tischzentrifuge	Heraeus Pico 21	Heraeus/Thermo Scientific
Vortexer	VFZ	IKA Labortechnik
Wasseraufbereitungsanlage	Anium 611D	Sartorius
Zählkammer	Thoma	Optik Labor

2.1.15 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller/Lieferant
Alufolie	Roth
Elektroporationsküvetten	Thermo-Electra
Glasmaterialien	Schott
Kunststoff-Einwegmaterial	Eppendorf, Sarstedt, Roth,
Parafilm/Leukopor®	Pechiney Plastic Packaging
Skalpell/Klingen	Swann-Morton LTD
Papierfilter	Sartorius
Sand Vitakraft Nr. 12262	Vitakraft
Seramis	Masterfoods GmbH

2.1.16 Chemikalien

Verwendete Chemikalien in dieser Arbeit wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Apple Chem, Duchefa, Fluka, Merck, Roth, Serva, Sigma-Aldrich, VWR

2.1.17 Software / Freeware Internet-Software (Seiten)

Acrobat Reader	http://www.adobe.com/de/
Adope Photoshop CS5	Copyright © 2011 Adobe Systems Incorporated
Alignement	http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/
Arabidopsis eFP Browser	http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi
BioRad iQ5	BioRad (München, Deutschland)
Chromas	Technelysium Pty Ltd (Shannon Co. Clare, Irland)
Clonemanager	© 2010 Scientific & Educational Software
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Nucleotide-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Office 2007	Microsoft
Restrictionmapper	http://www.restrictionmapper.org/
Revers Komplementär	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
Statistik	http://www.graphpad.com/welcome.htm

Tair	http://www.arabidopsis.org/
Translate DNA	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenkulturen

2.2.1.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Solanum lycopersicum* und *Nicotiana benthamiana*

Die Plinzen wurden in einem zwei Schalen-System (17,5 cm * 13 cm * 5,5 cm) angezogen. Unter eine durchlöchernte Schale wurde eine weitere Schale (auch mit Löchern) mit Abstandshalter (Eppendorfreaktionsgefäße) gestellt, um eine optimale Belüftung zu gewährleisten. In die obere Schale kamen 200 ml Seramis (Wasserspeicherung) und darauf 700-800 ml eines Sand/Erde-Gemisches im Verhältnis 1:1. Anschließend wurde die gefüllte Schale gleichmäßig mit 250 ml Wasser plus 0,1 % Wuxal bewässert und die Oberfläche mit Wasser besprüht. Pro Schale wurden je nach Pflanzenart 30 (*B. napus*, *S. lycopersicum* und *N. benthamiana*) bis 60 (*A. thaliana*) Samen ausgelegt und die Schalen für eine Woche mit einer lichtdurchlässigen Haube abgedeckt. Die Samen wurden 24 h bei 4 °C vernalisiert und im Langtag oder Kurztag kultiviert. Die Kultivierung von *A. thaliana* erfolgte für 3½ Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 22 °C/16 h dunkel, 18 °C) bis zur Infektion. *B. napus*, *S. lycopersicum* wurden für 2 Wochen und *N. benthamiana* für 2½ Wochen unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 22 °C/8 h dunkel, 18 °C) bis zur Infektion kultiviert.

2.2.1.2 Anzucht und Infektion von *A. thaliana* auf sterilen Schrägagarplatten

Für mikroskopische Analysen des Infektionsverlaufs wurden Schrägagarplatten verwendet, bei denen die Pflanzenwurzeln nur auf der Agaroberfläche wuchsen. Dazu wurde ½ Murashige und Skoog (MS)-Medium (Duchefa, Niederlande) in 10*10 cm Petrischalen gegossen (auf einem Deckel liegend), so dass eine Schräglage entstand. Zehn oberflächensterilisierte Samen wurden 2 cm von dem Rand der Petrischale entfernt ausgelegt. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für 24 h bei 4 °C vernalisiert. Die Pflanzen

wuchsen für zwei Wochen unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 22 °C/8 h dunkel, 18 °C) und wurden anschließend auf Schräg-platten (Agarose) transferiert (Reduktion des Nährstoffgehaltes für den Pilz). Nach drei weiteren Tagen wurden die Pflanzen mit einer Sporenlösung (10^5 Sporen/ml) besprüht und mit Alufolie zu $\frac{3}{4}$ eingepackt, um für den Wurzelraum plus Pilz „Dämmerlicht“ zu erzeugen. Nach 24, 48, 72, 96 "hours post infection (hpi)" konnten die Wurzeln von der Agaroberfläche entnommen und für die Mikroskopie benutzt werden.

2.2.2 Pilzkulturen

2.2.2.1 Anzucht *Verticillium spec.*

In einen Vierschikane-Kolben wurden 120 ml Potato dextrose broth (PDB, Sigma Aldrich), 120 μ l 0,5 mg L⁻¹ Cefotaxim und 100 μ l Glycerin-Stammkultur mit einer Konzentration von ca. 10^8 Sporen/ml gegeben. Dies wurde für ein bis zwei Wochen im Dunkeln bei 22 °C und 90 rpm inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das alte Medium mit einer sterilen Pipette abgesaugt, das Pilzmyzel verblieb dabei im Kolben. Es wurden 120 ml Czapek dox (CBD, Duchefa) und 120 μ l 0,5 mg L⁻¹ Cefotaxim hinzugegeben. Nach drei bis sieben Tagen bildeten sich Sporen, welche geerntet wurden.

2.2.2.2 Ernte von *Verticillium spec.*

Die Kultur wurde durch ein Filterpapier in zwei 50 ml Falcon Röhrchen gegeben. Diese wurde bei 4000 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Falcon-Röhrchen wurden zum Waschen der Sporen mit 35 ml kaltem, autoklaviertem Leitungswasser aufgefüllt und das Präzipitat resuspendiert. Anschließend wurde erneut bei 4000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem Pellet wurden 5 ml autoklaviertes Leitungswasser gegeben und erneut resuspendiert. Die Sporen lagerten bis zur Benutzung auf Eis oder im Kühlschrank bei 4 °C. Die Sporenkonzentration wurde mit einer Zählkammer (0,1 mm Tiefe; 0,0025 mm² Fläche Thoma Zählkammer) bestimmt.

2.2.2.3 Infektion mit *Verticillium spec.*

Aus der Sporenlösung wurde eine Verdünnung mit einer Konzentration von 10^6 Sporen/ml hergestellt. Die Pflanzen (*A. thaliana*, *B. napus*, *S. lycopersicum*, *N. benthamiana*) wurden aus dem Sand/Erde-Gemisch herausgelöst und dabei die Wurzeln mechanisch geschädigt. Die Pflanzen wurden für die Infektion 45 min in der Sporenlösung und parallel dazu die Kontrollen in Wasser inkubiert (in Petrischalen). Anschließend wurden die Pflanzen in einzelne Töpfe gepflanzt und unter Kurztag- oder Langtagbedingungen kultiviert. *A. thaliana* wurde unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 22 °C/16 h dunkel, 18 °C) und *B. napus*, *S. lycopersicum*, *N. benthamiana* unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 22 °C/8 h dunkel, 18 °C) angezogen.

2.2.2.4 Stammkulturen von *Verticillium spec.*

Zur Herstellung von *Verticillium spec.* Glycerol Stocks wurden die Sporen steril geerntet. Für die Anzucht von *Verticillium* wurden Stocks hergestellt mit einer Konzentration von 10^8 Sporen/ml (250 µl 65 % (v/v) Glycerol, 750 µl Sporenlösung). Die Stocks wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die Infektionen bei -20 °C bzw. für Langzeitlagerung bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Bakterienkulturen

2.2.3.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Vermehrung von Plasmid-DNA fand in dem Organismus *E. coli* statt. Über Nacht wurden Einzelkolonien in Petrischalen unter Verwendung entsprechender Antibiotika auf LB-Medium angezogen. Die Temperatur betrug dabei 37 °C. Die Lagerung bewachsener Platten erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank. Für die Vermehrung eines Klons wurden 3 ml flüssiges LB-Medium (mit Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Kulturansatz wurde dabei die gesamte Zeit mit 200 rpm geschüttelt. Anschließend konnte die Plasmid-DNA isoliert (Mini-Präparation) oder eine Großkultur im Midi- bzw. Maxi-Format angeimpft werden.

2.2.3.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 500 ml LB mit dem *E. coli* DH5 α Stamm im Volumenverhältnis 1:500 angeimpft. Nach ungefähr 4 h musste alle 10-15 min ein Aliquot zur Bestimmung der Zelldichte unter sterilen Bedingungen abgenommen werden. Die Vermessung erfolgte an einem Photometer (Tecan) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die optische Dichte (OD) sollte nach der Vermessung zwischen 0,6 bis 0,8 liegen. Nach Erreichen des Wertes wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und in eisgekühlte Zentrifugenbecher überführt. Die Zellernte erfolgte durch 15 minütige Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C. Zum Waschen wurden die Zellen wiederholt in 500 ml, 250 ml und 50 ml Wasser resuspendiert. Die Zentrifugationen erfolgten wie oben beschrieben. Nach diesen Schritten wurde das Pellet in 10 ml eines 10 %igen Glycerin-Wasser-Gemisches resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden wieder 500 μ l des Glycerin-Wasser-Gemisches zugegeben. Diese Bakteriensuspension wurde in 40 μ l Aliquots aufgeteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.3.3 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens wurde angezogen, um Pflanzen stabil zu transformieren. *Agrobakterien* wurden für 2 Tage auf DYT-Medien-Platten mit entsprechenden Antibiotika bei 28 °C kultiviert. Die Lagerung von Kolonien auf Agarplatten erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

2.2.3.4 Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung einer Vorkultur wurde *A. tumefaciens* (GV3101-PMP90) für 2 Tage bei 28 °C mit entsprechenden Antibiotika auf DYT-Platten angezogen. 5 ml DYT-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 2 Tage bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Die Vorkultur wurde zum Animpfen der 500 ml DYT-Medium-Hauptkultur benutzt. Diese sollte bei 28°C und 180 rpm zu einer OD von 0.5 heranwachsen. Zur Bestimmung der OD wurde ungefähr nach 4 h alle 10-15 min ein Aliquot unter sterilen Bedingungen abgenommen und bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Photometer vermessen. Nach Erreichen einer OD von 0.5 wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und in eisgekühlte Zentrifugenbecher

überführt. Die Zellernte erfolgte durch 15-minütige Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 ml eisgekühltem ddH₂O resuspendiert und in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation (siehe oben) wurde das Pellet in 800 µl eisgekühltem 10 % Glycerol resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde in 50 µl Aliquots aufgeteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.3.5 Elektroporation von *E. coli*, *A. tumefaciens*

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA musste diese in einen Bakterienstamm integriert werden. Der Vorgang erfolgte über Elektroporation (Micro Pulser, Bio-Rad), indem ein Aliquot der elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl der Plasmid-DNA vermischt wurde. Nach 1 min wurde das Gemisch in eine eisgekühlte 1 mm-Elektroporationsküvette (Thermo-Electra) überführt und danach sofort in die Apparatur gestellt. Für *E. coli* und *A. tumefaciens* wurden die entsprechenden Elektroporationsprogramme laut Hersteller genutzt. Anschließend wurden die Bakterien in 500 µl vorgewärmtes LB-Medium (37 °C) oder DYT-Medium (28 °C) ohne Antibiotika-Zusatz aufgenommen. Nach Überführung der Bakteriensuspension in ein Eppendorf-Röhrchen erfolgte eine 45-60 minütige Inkubation bei 37 bzw. 28 °C, bei der das Röhrchen die gesamte Zeit geschüttelt wurde. Zum Schluss wurden die Kulturen in unterschiedlichen Volumina (10 µl und 490 µl) auf LB-Platten oder DYT-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 (*E. coli*) bzw. 28 °C (*A. tumefaciens*) inkubiert.

2.2.3.6 Glycerolkulturen zur Langzeitlagerung

Um die Bakterien längere Zeit lagern zu können, wurden diese nach Zugabe von Glycerin als Frostschutzmittel eingefroren. Dazu wurden 800 µl einer Bakterienkultur mit 200 µl sterilem 60 % (v/v) Glycerin versetzt. Danach erfolgte sofort eine gründliche Mischung der Bakteriensuspension und eine Schockfrostung in flüssigem Stickstoff. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -70 °C. Aus diesen Glycerolkulturen konnte bei Bedarf mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers etwas Material entnommen, auf entsprechendem Medium ausgestrichen und wie oben angegeben inkubiert werden.

2.2.4 Blattflächenvermessung

Mit einer Digitalkamera wurden Bilder von *A. thaliana*-Blattrosetten oder *N. benthamiana* aufgenommen. Die Blattfläche wurde mit einem Bildanalyseprogramm (Datinf GmbH, Tübingen) ausgewertet. Der Durchmesser der Kulturtöpfe wurde als interner Standard für die Normalisierung der Blattfläche verwendet.

2.2.5 Generell gesammelte Daten

Zu den Zeitpunkten 7, 14, 21, 28, 35 "days post inoculation (dpi)" wurden je nach Versuchsziel neben der Blattfläche das Frischgewicht und die Anzahl von chlorotische (≥ 50 % der Blattfläche) und nekrotischen (≥ 50 % der Blattfläche) Blättern bestimmt.

2.2.6 Pharmakologische Behandlungen

3 dpi alte *A. thaliana* Pflanzen wurden alle drei Tage bis zum Zeitpunkt 24 dpi mit 50 μM 6-Benzylaminopurin (BAP= synthetisches Cytokinin) oder 10 μM 2-chloro-6-(3-methoxyphenylamino) purine (INCYDE= Cytokinin-Oxidase Inhibitor (Zatloukal *et al.*, 2008) besprüht. Die Sprühlösung enthielt zusätzlich 0,01% Tween zur besseren Benetzung der Blätter; die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank. Die Kontrollen wurden parallel mit den entsprechenden Lösungsmitteln behandelt. BAP wurde in 1 M NaOH gelöst und INCYDE in DMSO.

2.2.7 Färbungen

2.2.7.1 Trypan-Blau Färbung von infizierten Pflanzen/Blättern

Zum Nachweis von Pilzhyphen in infiziertem Blattgewebe erfolgte die Färbung mit dem Farbstoff Trypan-Blau. Dazu wurden inokulierte Rosettenblätter in einer siedenden Trypan-Blau-Färbelösung (1 Vol. Lactophenol-Trypan-Blau (10 ml Milchsäure, 10 ml Phenol, 10 ml Glycerol, 10 ml ddH₂O, 10 mg Trypan-Blau), 1 Vol. 96 % (v/v) Ethanol) etwa 1 min

inkubiert und anschließend in ddH₂O gewaschen. Zum Entfärben der Blätter erfolgte eine zweitägige Inkubation in Chloralhydrat (2,5 g/ml) bei Raumtemperatur (RT), wobei die Entfärbelösung mindestens einmal erneuert wurde. Nach dem Entfärben wurden die Blätter in 60 % (v/v) Glycerol aufbewahrt. Die mikroskopische Analyse der gefärbten Blätter erfolgte im Hellfeld (Leica, Typ DM 5000B).

2.2.7.2 Propidiumiodid-Färbung

Für die Färbung der gesamten Wurzel wurde Propidiumiodid verwendet. Propidiumiodid interkaliert in Zellwände und emittiert das Licht bei einer Wellenlänge von 618 nm. Das Absorptionsmaximum liegt bei 535 nm. Von der Stammlösung 0,05% (w/v) mit 0,01% (v/v) Silvet wurde eine 1:1000-Verdünnung in 2% Glycerol direkt für die Mikroskopie benutzt. Die mikroskopische Analyse (Leica, SP5) erfolgte mittels Laser Scanning Mikroskopie (LSM).

2.2.7.3 Histologische GUS-Färbung

Bei der histochemischen GUS-Analyse wurde die enzymatische Aktivität der β -Glucuronidase zur Spaltung von X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-glucuronsäure) zur zellspezifischen Lokalisation von Genexpressionen in der Pflanze benutzt. Das bei der enzymatischen Reaktion freigesetzte Indolderivat ist als blaues Präzipitat zu erkennen. Frisches Pflanzenmaterial wurde mit eiskaltem Aceton für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit einem 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7.2), 10 mM EDTA, 0,5 mM K₃[Fe(CN)₆], 0,5 mM K₄[Fe(CN)₆] × 3H₂O und 0,2 % Triton X-100 wurden die Pflanzen mit einer Färbelösung (2 mM X-Gluc (50 mg/ml) in Waschpuffer) für 30 sek vakuumfiltriert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen mit 96 % (v/v) Ethanol wurde das Chlorophyll entfernt und die Blätter anschließend in 70 % (v/v) Ethanol, 2 % Glycerol gelagert. Die mikroskopische Analyse der gefärbten Blätter erfolgte im Hellfeld (Leica, Typ DM 5000B).

2.2.7.4 Fluorometrischer GUS-Assay

Bei dem fluorometrischen GUS-Assay wurde die enzymatische Aktivität der β -Glucuronidase in Proteinextrakten bestimmt. Als Substrat wurde 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG) eingesetzt, das durch die β -Glucuronidase zu 4-Methyl-Umbelliferon (4-MU) umgesetzt wird (Jefferson *et al.*, 1987). Die Bildung von 4-MU wurde fluorometrisch vermessen (360 nm Anregungswellenlänge, 460 nm Emissionswellenlänge; Cytofluor, Series 4000, PerSeptive Biosystems). Zur Herstellung der Proteinextrakte wurde das Pflanzenmaterial (ganze Rosette) in 0,7-1 ml GUS-Extraktionspuffer (50 mM Naphosphatpuffer (pH 7.2), 10 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0,1 % (v/v) Sarkosyl, 0,1 % (v/v) Triton X-100) gemörsert. Nach 7 min Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C wurde der Überstand zur Proteinbestimmung und Aktivitätsbestimmung der β -Glucuronidase verwendet. Die Proteinbestimmung wurde mit 1:5 verdünnter Bradford-Lösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Als Standard wurde BSA in GUS-Extraktionspuffer benutzt und eine Eichgerade mit 0, 1, 3, 6 μ g BSA erstellt. 2 μ l des Proteinextraktes wurde für den Bradford eingesetzt, der in Mikrotiterplatten mit einem Volumen von 200 μ l durchgeführt wurde. Anschließend wurde die Extinktion der Platte mit einem Spektralphotometer (MRXTM, Dynex) bei 595 nm gemessen. Zur Aktivitätsanalyse wurden je 50 μ g Gesamt-Protein des Überstandes in 100 μ l GUS Extraktionspuffer zusammen mit 100 μ l 4 mM MUG bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Kinetik der Reaktion wurde in Zeitabständen von 10 und 70 min verfolgt (Endpunktbestimmung). Nach 10 min wurden 100 μ l der Probe mit 100 μ l 0,2 M Na₂CO₃ abgestoppt. Die restlichen 100 μ l der Probe wurden nach 70 min abgestoppt und vermessen.

2.2.7.5 Safranin-O-Färbung

21 dpi alte Blätter wurden an der Petiolen-Basis der Rosette abgeschnitten und sofort in wässrige 1 % (w/v) Safranin-O Lösung für 2 h inkubiert (Methode nach Freeman *et al.*, 2009 modifiziert). Nach der Inkubation wurden die Petiolen in Wasser gewaschen und die Blätter für die Mikroskopie vorbereitet. Dazu wurden vorsichtig die Epidermis und die Mesophyll-Schichten mit einer Rasierklinge entfernt, um die Xylemgefäße freizulegen. Es wurde im Hellfeld mikroskopiert (Leica DM 5000B)

2.2.7.5 Einbetten und Färben von Blatt- und Hypokotylquerschnitten

Blätter, Hypokotylbereiche von infizierten und Kontroll-Pflanzen zum Zeitpunkt 21 dpi wurden in 37 % Formaldehyd, 100 % Essigsäure und 70% Ethanol (FAE, 5:5:90, v/v/v) zur Fixierung eingelegt. Eingebettet wurde das komplette Hypokotyl und ein 5*5 mm großes Blattfragment der abaxialen Seite inklusive der Mittelrippe. Die Proben wurden nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert: 70 % Ethanol für 12 h, 70 % Ethanol für 2 h, 80 % Ethanol für 2 h, 90 % Ethanol für 2 h, 96 % Ethanol für 2 h, 96 % Ethanol für 12 h, 100 % Ethanol für 2 h, 100 % Ethanol:100 % Aceton (1:1) für 2 h, 100 % Aceton für 2 h (2 mal), Aceton:Plastik (1:1) für 4 h, Aceton:Plastik (1:3) für 12 h, 100 % Plastik für 12 h (2 mal). Bei dem Plastik handelte es sich um eine Mischung aus Styrol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Butyl Methacrylate (Sigma) (1:1), die 2 % Dibenzoylperoxid mit 50 % Phthalsäure (Peroxid Chemie GmbH) beinhaltet. Anschließend wurden die Proben in Gelatine-Kapseln (Plano GmbH) überführt und mit frischer Plastik-Lösung überschichtet, die zum Polymerisieren für drei Tage bei 60 °C und für weitere 10 Tage bei 35 °C inkubierten. Von den eingebetteten Proben wurden Querschnitte mittels Mikrotom (Autocut, Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland) angefertigt. Es wurden immer frisch produzierte Glasmesser (Knifemaker 7800, LKB) verwendet. Anschließend wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger (0.5 % (w/v) Gelatine, 1,77 mM $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ in ddH₂O platziert. Für histologische Untersuchungen wurden die Querschnitte mit 0,05 % Toluidin-Blau für 10 min bei 60 °C gefärbt und in Glycerol gelagert. Die Proben wurden im Hellfeld mikroskopiert (Axioskop, Zeiss). Bilder der Autofluoreszenz wurden mit einer Filterkombination von G365/FT395/LP420 bei einer Belichtungszeit von 1,5 sek aufgenommen.

2.2.8 Samensterilisation

Arabidopsis-Samen wurden mit Ethanol oberflächensterilisiert. Dazu wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß ca. 200-300 Samen gefüllt und mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol plus 0,05 % Tween für 5 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Ethanol verworfen und gegen 96 % (v/v) Ethanol ersetzt und für weitere 5 min geschüttelt. Das 96 % Ethanol wurde wieder verworfen und die Samen im Heizblock bei 35 °C für 15-30 min getrocknet.

2.2.9 Chlorophyllbestimmung

Für die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert. Jeweils 20 mg Blattpulver wurden mit je 2 ml 80 % (v/v) Acetonlösung versetzt, 10 min im Dunkeln inkubiert und anschließend bei 14000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wurde bei den Wellenlängen 663, 646, 470 nm bestimmt. Als Leerwert diente 80 % (v/v) Aceton. Die Konzentrationen der Pigmente wurden gemäß der Gleichung von Lichtenthaler und Wellburn (1983) berechnet:

$$\text{Chl}^a \text{ } \mu\text{g/ml} = 12.21 \times A_{663} - 2.81 \times A_{646}$$

$$\text{Chl}^b \text{ } \mu\text{g/ml} = 20.13 \times A_{646} - 5.03 \times A_{663}$$

$$C^{x+c} \text{ } \mu\text{g/ml} = \frac{1000 \times A_{470} - 3.27\text{Chl}^a - 104\text{Chl}^b}{229}$$

2.2.10 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana*

Zur Herstellung von stabil transformierten Pflanzen wurde die Methode des Agrobakterien vermittelten Gentransfers benutzt. *A. 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). Der integrierte Bereich wird T-DNA genannt. Das Ti-Plasmid wurde speziell für die gezielte Integration von Genen in das pflanzliche Genom modifiziert. In der Natur nutzt *Agrobacterium* dieses System, um spezifische Gene in das pflanzliche Genom zu integrieren, die zur besseren Besiedlung eine Tumorbildung auslösen. DNA-Sequenzen des *gene of interest* lassen sich durch Klonieren zwischen den T-DNA Border-Sequenzen integrieren. Diese DNA-Sequenzen werden nach *Agrobakterien*-Infektion stabil in das Genom der Pflanze eingebaut.

Für die *Agrobakterien*-vermittelte Transformation von *A. thaliana* wurde die „Floral-dip“-Methode angewendet (Clough und Bent, 1998). Für die Transformation wurden 5 ml DYT-Medium mit entsprechenden Antibiotika (Rifampicin 100 µg/ml, Gentamicin 25 µg/ml und Kanamycin 50 µg/ml = Resistenzmarker des binären Vektors) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28 °C, 180 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde vollständig in eine 500 ml Hauptkultur (DYT-Medium) überführt und diese erneut über Nacht bei 28 °C, 100 rpm kultiviert. Die Kultur wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C

sedimentiert und das Pellet in dem Infiltrationsmedium (5 % Saccharose, 0,05 % Silwet-L77) resuspendiert. Diese Suspension wurde auf eine OD₆₀₀ von 0.8 eingestellt. Für die Transformation wurden die *Arabidopsis*-Blütenstände (alte Blüten wurden zuvor entfernt) in die *Agrobakterien*-Suspension getaucht und, um eine gute Benetzung zu erreichen, leicht geschwenkt. Anschließend wurden die Pflanzen mit einer Haube abgedeckt (zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit + Transformationsrate). Am nächsten Morgen konnte die Haube entfernt werden. Die Pflanzen wurden bis zum Abreifen der Samen unter Langtagbedingungen kultiviert und über die Kanamycin-Resistenz *nptII* (Neomycin Phosphotransferase II) selektiert.

2.2.11 Selektion auf Kanamycin-Resistenz

Sterilisierte Samen wurden auf 1/2 MS-Platten (7,5 g Plant-Agar/l, Duchefa) mit Kanamycin 50 µg/ml locker verteilt. Die Agar-Konzentration wurde so gering gewählt, damit die Wurzel besser hineinwachsen und das Antibiotikum aufnehmen konnte. Nach 1-2 Wochen wurden die überlebenden Pflanzen in Erde überführt und analysiert. Die Primär-Transformanden (F₀-Generation) bildeten nur hemizygote Samen aus. Um homozygote Pflanzen zu bekommen, war es notwendig, über mehrere Generationen Samen von Einzelpflanzen zu mustern und diese auf ihre Aufspaltung zu testen. Frühestens konnte nach Selektion mit einer homozygoten Linie in der F₂-Generation gerechnet werden.

2.2.12 Analyse von Pflanzen mittels Plant Phire PCR-Kit

Zur Analyse von stabil transformierten Pflanzen oder Genotypisierung wurde das Phire® Plant Direct PCR Kit (Finnzymes) verwendet. Das Kit wurde strikt nach Herstellerangaben benutzt. Die Primer wurden so gewählt, dass sie ein ca. 500-1000 kb großes Fragment des integrierten Gens amplifizierten.

2.2.13 ¹⁴C-Glukose Transportversuch

Für den Transportversuch mit ¹⁴C-markierter Glukose wurden 21 dpi alte Pflanzen einer Erdinfektion aus Kurztagbedingungen verwendet. Das siebte bis zehnte Blatt der Kontroll-

und VI43-infizierten Pflanzen wurde für die Markierung benutzt, wobei auf eine deutliche Symptomausprägung der infizierten Blätter geachtet wurde. Für die Markierung wurde die Blattoberfläche leicht aufgeraut, 5 µl 10µCi ^{14}C -Glukose auf die Stelle gegeben und für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde das ^{14}C -Blatt entfernt, die nicht aufgenommene ^{14}C -Glukose abgespült und die Aktivität des Spülwassers gemessen, so dass berechnet werden kann, wie viel der Glukose in das Blatt eingedrungen ist. Von den Pflanzen wurden 6 h und 24 h nach Applikation der ^{14}C -Glukose jeweils 5 Proben von jedem Ansatz geerntet und anschließend im Heizschrank für 24 h bei 80 °C getrocknet. Danach wurden die Blätter der Rosette der Blattreihenfolge entsprechend auf einen Träger aufgeklebt. Durch Exposition der Proben auf einer Phosphoimager-Folie für 24 - 72 h in einer Bleikammer wurde ein Radiogramm der Proben erstellt. Abschließend wurde das Probenmaterial in drei Datensätze aufgeteilt: Blätter vor ^{14}C -Blatt (*source*-Bereich), nach ^{14}C -Blatt (*source*- plus *sink*-Bereich), Spross-Spitze (*sink*-Bereich) und im Oximat zur direkten Becquerel-Bestimmung verbrannt. Nach der Verbrennung wurden die Becquerel im Szintillationszähler gemessen. Die Arbeiten wurden im Labor für Radioaktive Isotope (LARI) des Instituts für Forstbotanik durchgeführt.

2.2.14 Molekulargenetische Methoden

2.2.14.1 Plasmid-DNA Isolation

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden unterschiedliche Methoden und Kits verwendet. Die Isolation von DNA ist Voraussetzung für alle molekularbiologischen Arbeiten. Je nach gewünschter DNA-Menge unterscheidet man Mini-, Midi- und Maxi-Präparationen. Um Bakterienklone zu testen, wurde die kostengünstige "1, 2, 3 Puffersystem" Mini-Präparation benutzt und für Sequenzierungen das Mini-Präparation Kit von Fermentas.

1, 2, 3 Puffersystem"- Mini - Präparation

3 ml einer über Nacht gewachsenen *E. coli*-Kultur wurden bei 4000 rpm für 1 min in einem Eppendorfgefäß pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl P1 (0,05 M Tris HCl, 0,01 M Na₂ EDTA, 100 mg/l (70 Units/mg) RNase) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl P2 Lysispuffer (0,2 M NaOH, 0,1 % (w/v) SDS) erfolgte der Zellaufschluss. Anschließend wurden 300 µl P3 Neutralisationspuffer (3 M Kaliumacetat)

hinzugegeben. Nach jeder Pufferzugabe wurden die Proben 5-6 mal invertiert. Danach wurde 10 min bei 14800 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl Isopropanol zur Fällung versetzt, 30 min bei RT inkubiert und erneut für 10 min bei 14800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet in 500 µl 75 % Ethanol gewaschen und bei 4 °C 10 min bei 14800 rpm zentrifugiert. Nach möglichst vollständiger Entfernung des Überstands wurde die DNA kurz bei 50 °C getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

Mini-Präparation mit Säulen (Fermentas)

Zur Sequenzierung ist hochreine DNA nötig, die die "Puffer 1, 2, 3-Methode" nicht liefern konnte. Deshalb wurde zu Sequenzierungszwecken die DNA mit Hilfe von einem Säulen-Kit isoliert und aufgereinigt. Es wurde das "GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit" von Fermentas verwendet. Das Prinzip basiert auf der alkalischen Lyse der Zellen und der anschließenden Bindung der DNA an eine Matrix (Säule), von der sie nach Waschschritten in sehr reiner Form eluiert werden kann. Das Kit wurde entsprechend den Herstellerangaben zur Isolation von Plasmid-DNA von 3 ml einer Über-Nacht-Kultur eingesetzt.

2.2.14.2 Extraktion genomischer DNA aus Pflanzen und Pilzen

Zur Extraktion von genomischer DNA aus Pflanzen und Pilzen wurde das "DNeasy Plant Mini Kit" von Quiagen benutzt. Das Kit wurde entsprechend der Herstellerangaben benutzt.

2.2.14.3 Extraktion von *Arabidopsis*-Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis*-Rosetten wurden zwei Methoden verwendet. Die erste Methode basiert auf einer Phenol/Chloroform Extraktion. Dazu wurden 200 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff aufgemörsert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Auf das gemörserte Pflanzenmaterial wurden 300 µl Extraktionspuffer bestehend aus 0,1 M Tris, 0,6 M NaCl, 40 mM EDTA, 4 % N-Lauroylsarcosin, 1 % SDS und 300 µl 10 M sterilfiltrierte Urea-Lösung gegeben. Nach starkem Vortexen wurden 300 µl Wasser gesättigtes Phenol auf die Proben gegeben und wieder gevortext. Anschließend wurde 600 µl eines Phenol/Chloroform-Mixes im Verhältnis 1:1 hinzugefügt. Zum Lösen der RNA wurde

das Reaktionsgefäß auf einem Vortexer fixiert und für 5 min gevortext. Es folgte ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm und 4 °C. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen Chloroform versetzt und gemischt. Es folgte eine weitere 10 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde wieder überführt und zur Fällung mit 0,7 Vol Isopropanol durch Invertieren vermischt. Abschließend wurden die Proben 2 h bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 250 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren 10-20 minütigen Zentrifugationsschritt bei 12000 rpm und 4° C wurde der Überstand abgenommen, verworfen und das RNA-Pellet 20 min luftgetrocknet. Die RNA wurde in 35 µl RNase-freiem ddH₂O resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Bei der zweiten Methode wurde die RNA mittels innuPrep RNA KIT (AnalytikJena, Biometra) extrahiert. Für die Isolierung wurde nach Anleitung des Handbuches gearbeitet.

2.2.14.4 cDNA-Synthese

Für die cDNA Synthese wurde das "RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" von Fermentas benutzt. Vor der cDNA Synthese wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um Spuren genomischer DNA aus den RNA-Proben zu entfernen. Dazu wurden 1 µg RNA, 1 µl DNaseI (Fermentas), 1 µl 10x DNaseI-Puffer mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und dieser Reaktionsansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNaseI durch Zugabe von 1 µl EDTA und 10 minütiger Behandlung bei 65 °C deaktiviert. Für die cDNA Synthese wurde der 11,5 µl Reaktionsansatz aus dem DNase-Verdau mit 1 µl Oligo dT₁₈ (100 mM), 4 µl 5x Reaktionspuffer, 0,5 µl RibolockTM RNase Inhibitor (20 u/µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl) versetzt, gemischt und für 60 min bei 42 °C im PCR-Cycler inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt und die cDNA anschließend bei 4 °C gelagert. Für die Verwendung in der qRT-PCR wurde die cDNA 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

2.2.14.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA, RNA)

Die Messung der Konzentration von DNA und RNA erfolgte am Photometer (Tecan) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dazu wurde die "Nanodrop"-Funktion des Gerätes genutzt. 2 µl der DNA oder RNA in wässriger Lösung wurden nach Standardisierung auf die Platte gegeben und vermessen. Für die Standardisierung wurde immer die entsprechende Elutionslösung benutzt.

2.2.14.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Visualisierung eines PCR-Produkts oder einer mit Restriktionsenzymen verdauten DNA wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt. Das Prinzip basiert auf der Eigenschaft der negativ geladenen DNA-Phosphatgruppen, in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Größe und Konformation zur Anode zu wandern. In der vorliegenden Arbeit wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele (Agarose in 1x TAE-Puffer) verwendet. 1x TAE Puffer wurde aus 20x TAE Puffer (0,8 M Tris, 2,3 % (v/v) Essigsäure, 20 mM EDTA) hergestellt. Zur Färbung der DNA wurden die Gele vor dem Ausgießen mit Ethidiumbromid (EtBr) versetzt (1µl/100ml Gel). Nach Aushärten der Gelmatrix wurden die DNA-Proben mit 6x-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die angelegte Spannung betrug 100-120 V. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Größenmarkers zugeordnet. Hierfür wurde die „1 kb DNA Ladder“ von Fermentas verwendet.

2.2.14.7 DNA-Elution aus Agarosegelen

Zur Weiterverwendung ausgewählter DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung wurden diese aus dem Agarosegel eluiert. Die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Für die Aufreinigung der DNA aus den Gelblöcken wurde das Kit "NucleoSpin Extract II Kit" der Firma Macherey und Nagel (Düren) nach Handbuch benutzt.

2.2.14.8 Restriktionsverdau

Bei Klonierungsarbeiten wird meistens das Ziel verfolgt, ein DNA-Fragment in einen Vektorhintergrund einzubringen. Mit Restriktionsverdauen können Fragmente ausgeschnitten und Vektoren linearisiert werden. Die Klonierung sollte möglichst gerichtet ablaufen, so dass das Gen in einer Orientierung in den Vektor ligiert wird. Verwendet werden dazu meist zwei Restriktionsenzyme, die verschiedene *Sticky*-Ends produzieren. Restriktionsendonucleasen (Restriktionsenzyme) erkennen spezifische Sequenzen von circa 4-6 Basenpaaren, die meist Palindrome darstellen. Sie führen innerhalb dieser einen Doppelstrangbruch durch. Dabei können je nach Enzym *Blunt*-Ends oder *Sticky*-Ends entstehen. Verdaue werden zur Analyse der Fragmentgröße durchgeführt oder um Fragmente für Klonierungen zu gewinnen. Die Restriktionsverdaue im Rahmen dieser Arbeit waren meist folgendermaßen zusammengesetzt und wurden 2-16 h oder bei "Fast Digest" Enzymen (Fermentas) 5-15 min bei 37 °C inkubiert:

DNA	0,2-1 µg
Fast Digest/Puffer	2 µl
Enzym (10u/µl)	1 µl
ddH ₂ O	X µl
Gesamtvolumen	20 µl

2.2.14.9 Ligation

In der Ligation erfolgt der Einbau des Fragmentes in den Vektor mittels T4 DNA-Ligase ("Rapid DNA Ligation Kit", Fermentas), die die Knüpfung einer Phosphodiesterbindung zwischen den 3'-Hydroxy- und dem 5'-Phosphatende katalysiert. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 22 °C. Danach konnte 1 µl zur Transformation von *E. coli* oder *A. tumefaciens* eingesetzt werden. Folgende Komponenten wurden in einem Ligationsansatz eingesetzt:

Insert	ca. 150 ng
Vektor	ca. 50 ng
Ligationspuffer	4 µl
T4 Ligase (5 u/µl)	1 µl
ddH ₂ O	X µl
Gesamtvolumen	25 µl

2.2.14.10 Dephosphorylierung von DNA mit Alkalischer Phosphatase

Um die Religationsrate des Vektors bei der Klonierung zu reduzieren, wurden die durch Restriktionsverdau geschnittenen Enden des Vektors dephosphoryliert. Dazu wurde "FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase" (Fermentas) direkt nach dem Verdau benutzt. Das Enzym wurde entsprechend den Herstellerangaben benutzt.

2.2.14.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Fragmente vervielfältigt werden. Dies geschieht durch Bindung bestimmter Primer (Annealing) nach Denaturierung der DNA und Elongation des 3'-Endes dieser Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Werden diese Schritte in vielen Zyklen wiederholt, können aus wenigen DNA-Fragmenten große Mengen derselben gewonnen werden. Besonders interessant ist diese Methode für die Molekularbiologie, da die Primer mit Sequenzen versehen werden können, die Punktmutationen oder neue Restriktionsschnittstellen einführen. Die Klonierung und Untersuchung von Genen wird dadurch erheblich vereinfacht. Bei Verwendung der PCR zu Klonierungszwecken wurde eine *Pfu*-Polymerase eingesetzt (Fermentas). Die *Pfu*-Polymerase besitzt 3'-5' Exonucleaseaktivität, wodurch während der PCR entstandene Fehlpaarungen korrigiert werden können (proof reading). Ein typischer PCR-Ansatz wurde wie folgt zusammengestellt:

10x Puffer + MgSO ₄	10 µl
dNTP-Mix (2 mM)	10 µl
Primer forward (10 mM)	2 µl
Primer revers (10 mM)	2 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 u/µl)	1 µl
Template	1 ng/µl
ddH ₂ O	X µl
Gesamtvolumen	100 µl

Die Annealingtemperaturen wurden zur Ermittlung der idealen Temperatur im Gradienten (55 °C bis 65 °C in 2 °C Schritte) des Thermocyclers variiert und die Elongationszeiten der Größe des zu amplifizierenden Fragments angepasst. Dazu wurde der Ansatz auf fünf Aliquots aufgeteilt. Die Elongationszeit (x) variierte je nach Länge des zu amplifizierenden Produkts und der Polymerase-Aktivität. Dabei wurde von einer Polymerisationsrate der *Taq*-Polymerase von circa 1 kb pro min ausgegangen.

initiale Denaturierung	94 °C	5 min	} 30x
Denaturierung	94 °C	1 min	
Annealing Gradient	55 °C - 65 °C	2 min	
Elongation	72 °C	X min	
finale Elongation	72 °C	10 min, 4°C ∞	

2.2.14.12 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. Für die qRT-PCR wurde das Referenzgen Ubiquitin 5 (UBQ5, At3g62250) eingesetzt (Czechowski *et al.*, 2005). Der PCR-Reaktionsmix setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

10x Biotaq-Puffer (Bioline)	2,5 µl
50 mM MgCl ₂ (Bioline)	1 µl
dNTP-Mix 10 mM (Fermentas)	0,25 µl
Primer-Mix 4 mM (Roche)	2,5 µl
1 µM Fluorescein (Bio-Rad)	0,25 µl
10x SybrGreen	0,25 µl
BIOTaq Polymerase (5 u/µl)	0,05 µl
Template cDNA (1:10 Verd.)	1 µl
ddH ₂ O	17,2 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Folgendes Programm wurde für die qRT-PCR verwendet:

initiale Denaturierung	95 °C	1,3 min
Denaturierung	95 °C	20 sek
Annealing Gradient	55 °C	20 sek
Elongation	72 °C	40 sek
finale Elongation	72 °C	4 min

} 40x

Während der Annealing- und der Elongationsphase von jedem 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 bei 55 °C mit anschließender Schmelzkurven-Bestimmung. Die relative Expressionsstärke der Transkripte wurde mit der 2^{-ΔΔCT}-Methode (Livak und Schmittgen, 2001) bestimmt. Dazu wurde zunächst die zu dem Referenzgen relative Expressionsstärke ΔCT bestimmt und diese dann auf eine Referenzbedingung (hier die ΔCT Werte der Kontroll-Pflanzen) normiert.

Das bedeutet: für die Auswertung der qRT-PCR Daten einer Infektion wurde Expression der Kontrollen auf den Wert Eins gesetzt und die Expression der infizierten Proben gegen die entsprechenden Kontrollen normiert, wobei alle Proben vorher mit Ubiquitin5 verrechnet wurden.

2.2.14.13 qRT-PCR für pilzliche-DNA Bestimmung

Die Bestimmung der *Verticillium longisporum*-DNA wurde in einem MyQi Cycler von BioRad durchgeführt. Für die PCR wurden die Primer OLG 70 und OLG 71 benutzt (siehe qRT-Primerliste), die auf ITS Sequenzen von *V. longisporum* basieren (PHD Thesis Tappe, 2008). Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

für OLG70/71	für act8	
10x Biotaq-Puffer (Bioline)	10x Immo-Puffer	2,5 µl
50 mM MgCl ₂ (Bioline)	50 mM MgCl ₂ (Bioline)	1,5 µl
dNTP-Mix 10 mM (Fermentas)	dNTP-Mix 10 mM (Fermentas)	0,5 µl
Primer Mix 4 mM	Primer-Mix 4 mM	1,5 µl
1 µM Fluorescein (BioRad)	1 µM Fluorescein (BioRad)	0,25 µl
10x SybrGreen (Cambrex Bio Science)	10x SybrGreen (Cambrex Bio Science)	0,25 µl
BIOTaq Polymerase (5 u/µl)	Immolase Taq (5 u/µl)	0,2 µl
Template 25 ng total DNA	Template 25 ng total DNA	10 µl
ddH ₂ O	ddH ₂ O	8,3 µl
Gesamtvolumen	25 µl	25 µl

Folgendes Programm wurde für die qRT-PCR verwendet:

initiale Denaturierung	95 °C	2 min	} 36x
Denaturierung	95 °C	20 sek	
Annealing Gradient	59 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	40 sek	
finale Elongation	72 °C	5 min	

Die Menge der *V. longisporum*-DNA wurde mit einer Eichgeraden, die mit Hilfe aufgereinigter pilzlicher DNA erstellt wurde, bestimmt. Zur Normalisierung (bezogen auf die Menge in Pflanzengewebe) wurde das Referenzgen *actin8* (At1G49240) aus *Arabidopsis* benutzt und für die PCR die Primer act8 forw und act8 rev (siehe qRT-Primerliste) verwendet. Des Weiteren wurde in der PCR zur Aktin-DNA-Bestimmung 2,5 µl 10x Immo-Puffer und 0,2 µl (5 U/µl) Immolase *Taq* (sehr sensitive) benutzt. Die Menge von Aktin-DNA in der Probe wurde über ein Referenz-Plasmid pSK-T berechnet, das für *actin8* kodiert. Die

Kopienanzahl des Plasmides errechnete sich aus dem CT-Wert (duplizierte Probe) über eine Eichgerade.

2.2.14.14 Semiquantitative Realtime (sqRT)-PCR

Bei der semiquantitativen Realtime-PCR wird die Transkriptmenge über einen visuellen Vergleich der Bandenintensität bestimmt. Daher ist diese Methode nur zweckmäßig, wenn von großen Unterschieden ausgegangen werden kann (Quantifizierung von Knockout-Mutanten oder zum Beispiel starke Induktion nach Pathogenbefall). Für die Bestimmung der Transkriptmenge wurde zuvor mRNA in cDNA umgeschrieben. Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

dream Taq Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2,5 µl
MgCl ₂	2 µl
Primer forward (4 mM)	1 µl
Primer revers (4 mM)	1 µl
<i>dream Taq</i> Polymerase (5u/µl)	0,25 µl
Template	1µl (1:10 Verdünnung.)
ddH ₂ O	14,75 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Das verwendete Programm wurde mit folgenden Temperaturen und Zeiten durchgeführt:

initiale Denaturierung	94 °C	4 min
Denaturierung	95 °C	30 sek
Annealing Gradient	55 °C	30 sek
Elongation	72 °C	45 sek
finale Elongation	72 °C	6 min, 4°C ∞

} 35x

2.2.14.15 Herstellung des Konstrukts pCamb2300/pSAG12:IPT

Das Ursprungsplasmid enthält das Isopentenyltransferase-Gen (IPT) von *Agrobacterium* (0,7 kb Fragment) unter der Kontrolle des "Senescence Associated Gene"(pSAG12) Promotors (2,2 kb Fragment) und wurde von Dr. R. M. Amasino (University of Wisconsin, Madison, WI) zur Verfügung gestellt (Gan and Amasino, 1995). Aus diesem Plasmid wurde der Bereich *pSAG12:IPT-Nos-ter* mit *SpeI* ausgeschnitten und in die "Multiple Cloning Site" (MSC) von pCamb2300 hinein ligiert, welcher die Kanamycin-Resistenz *nptII* (*Neomycin Phosphotransferase II*) trägt. pCamb2300 wurde zuvor mit *XbaI* linearisiert und anschließend dephosphoryliert. *SpeI* und *XbaI* bilden zueinander komplementäre Enden aus. Anschließend wurde der Vektor in den *A. tumefaciens* Stamm GV3101-PMP90 elektroporiert.

2.2.14.16 Herstellung des Konstrukts pCamb2300/pPer21:VND7-SRDX

Das Konstrukt pCamb2300/pPer21:VND7-SRDX wurde angefertigt in Anlehnung an das Konstrukt *p35S:VND7-SRDX* (Kubo *et al.*, 2005). Der 35S-Promotor wurde gegen den Promotor der Peroxidase 21 (AT2G37130) ausgetauscht. Die Sequenz wurde der Firma GenScript (USA) übermittelt, die diese synthetisierte und in den Binärvektor pCamb2300 über die Schnittstellen *BamHI* und *SalI* in die multiple MSC hineinklonierten.

2.2.14.17 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde nach der Kettenabbruch-Methode durch Didesoxyribonukleotide (Sanger *et al.*, 1977) von der Firma Seqlab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines sterilen *in vitro*-Infektionssystems zur Analyse der Penetration und der pilzlichen Proliferation über die Wurzel

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Etablierung eines sterilen *in vitro*-Infektionssystems. Dieses System sollte für eine zellbiologische Charakterisierung der Infektionsbiologie von *Verticillium longisporum* 43 (V143) benutzt werden. Dafür muss es möglichst vergleichbar mit der natürlichen Situation sein, um das Invasionsverhalten des Pilzes nicht zu beeinflussen. Der systemische Infektionsverlauf von V143 wurde weiter bis in die Blätter zellbiologisch analysiert und dabei insbesondere in Blattgeweben sowie selten im Übergangsbereich der Wurzel zum Hypokotyl ein Transdifferenzierungsphänomen beobachtet. Dieses wurde Gegenstand einer genaueren molekularen Analyse in Kapitel 3.3. Mit dem *in vitro*-System können später eventuell Mutanten oder transgene Linien von pilzlicher oder pflanzlicher Seite aus studiert werden. Es wurde so konzipiert, dass der Pilz nahezu keine Nährstoffe in der Umgebung hat und gezwungen ist, die Wurzel als Nährstoffbasis zu nutzen. Dafür wurden die Pflanzen auf 1/2 MS Medium mit Vitaminen und Zucker angezogen und anschließend auf Agarose-Platten transferiert, die komplett nährstofffrei waren. Nach Transfer der Pflanzen auf diese Platten wurden sie für zwei Tage inkubiert, damit sich eventuelle Wunden an der Wurzel oder den Wurzelhäarchen schließen konnten. Dadurch kann der Pilz nicht über Verletzungen der Wurzel eindringen und ist somit auf den natürlichen Penetrationsweg für die Etablierung der Infektion angewiesen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Pflanzen auf dem zuckerfreien Medium Wachstumsnachteile haben. Makroskopisch waren auf den zuckerfreien Medien keine Nährstoffmangelsymptome sichtbar. Nach der Inkubationsphase wurden die Wurzeln mit einer Sporensuspension besprüht und der Entwicklungsverlauf des Pilzes in 24 Stunden-Schritten mittels *Laser Scanning* Mikroskopie verfolgt. V143 ist GFP markiert und die Wurzeln wurden zur besseren optischen Visualisierung mit Propidiumiodid gefärbt, das spezifisch mit der Zellwand reagiert.

In **Abb. 7** ist repräsentativ der Infektionsverlauf von V143 auf *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wurzeln zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Inokulation (hpi) gezeigt. Die Sporen von V143 keimten innerhalb der ersten 24 Stunden und wuchsen auf der Wurzeloberfläche (**Abb. 7 A**). Zum Zeitpunkt 48 hpi penetrierte V143 zonenunabhängig die Epidermis und wuchs auf der Wurzeloberfläche sowie intrazellulär (**Abb. 7 B**). Bei der Penetrationsstruktur von V143 handelt es sich um eine Anschwellung der Hyphenspitze, die

auch als Hyphopodium bezeichnet wird (**Abb. 7 C**). Nach erfolgreicher Penetration konnte beobachtet werden, dass V143 im *Arabidopsis*-System meistens nur intrazellulär wuchs.

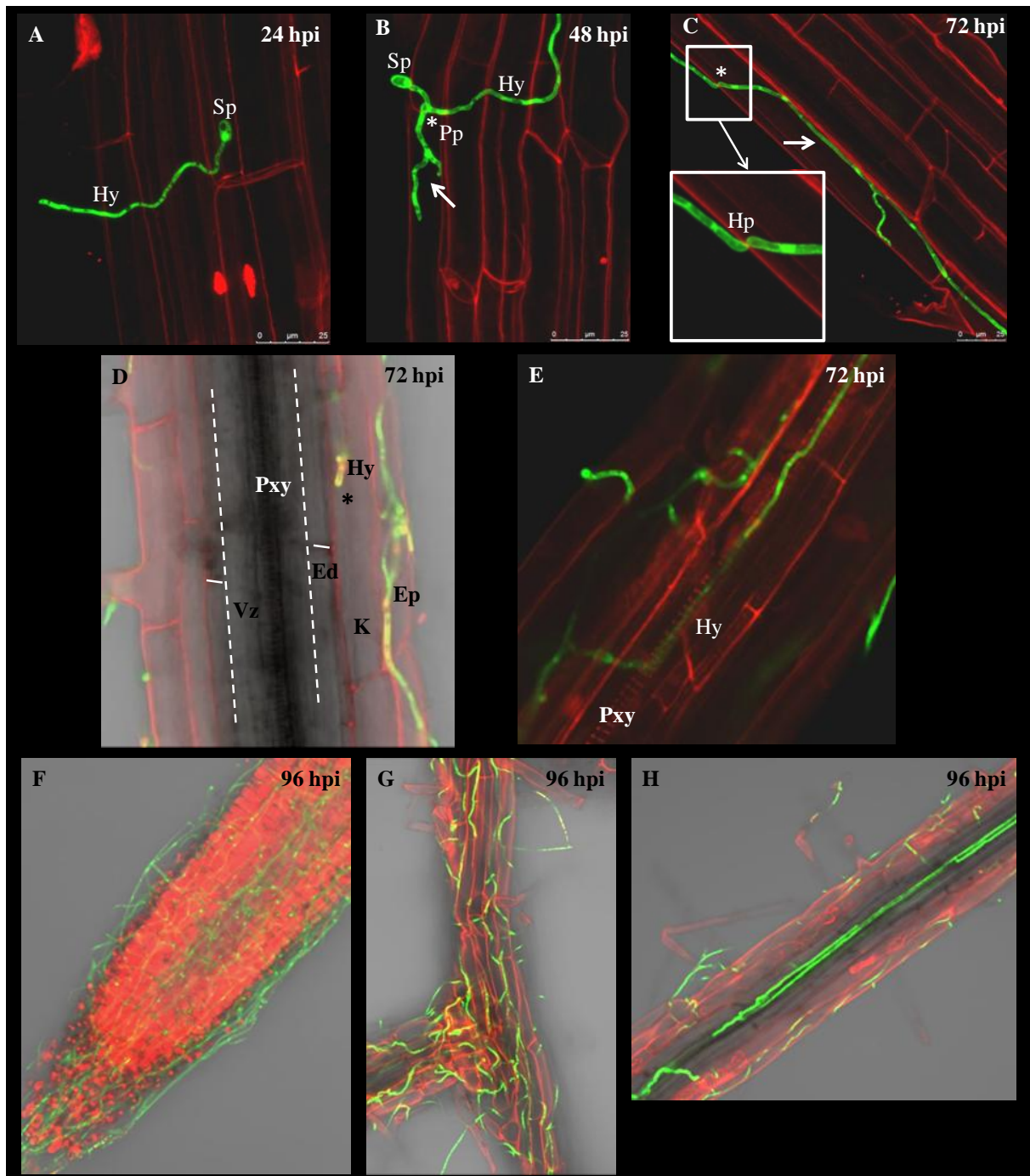


Abb. 7: Infektionsverlauf von V143-GFP in *A. thaliana* Col-0 Wurzeln im sterilen Platten-System. Wurzeln wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Gezeigt ist der Zeitverlauf von 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Inokulation (hpi). (A) Gekeimte Spore 24 hpi. (B) Hyphenwachstum und Penetration; Stern markiert die primäre Penetrationsstelle und der Pfeil intrazelluläres Wachstum 48 hpi. (C) Fortgeschrittenes Hyphenwachstum; Stern markiert die primäre Penetrationsstelle und der Pfeil intrazelluläres Wachstum 72 hpi; die gestrichelte Linie markiert die Endodermis. (E) V143 wächst im Leitgefäßsystem der Elongationszone der Wurzel 72 hpi. (F, G) Überwachsene Wurzelspitze und Wurzel 96 hpi. (H) V143 wächst im Leitgefäßsystem der Differenzierungszone. Abkürzungen: Ed (Endodermis), Ep (Epidermis), Hp (Hyphopodium), Hy (Hyphae), K (Kortex), Pp (Penetrationspunkt), Pxy (Protoxylem), Sp (Spore), Vz (Vaskulärer-Zylinder)

Bereits nach 72 hpi erreichte der Pilz generell die Endodermissschicht in der ganzen Wurzel, die ihn am Wachstum hinderte (**Abb. 7 D**). Die Aufnahme wurde in der Ebene des Protoxylems gemacht, wobei die Endodermiszellen nur schwach zu sehen sind (hervorgehoben durch gestrichelte Linien). Bei der Aufnahme handelt es sich zur besseren Strukturvisualisierung um einen *overlay* der Fluoreszenzkanäle und dem Durchlichtkanal, da die Endodermis eine Färbung des vaskulären Zentralzylinders verhindert. Gleiches gilt auch für die **Abb. 7 F-H**. Über die Wurzelspitze und das intrazelluläre Wachstum (nicht gezeigt) penetrierte V143 das Protoxylem in der Differenzierungszone (**Abb. 7 E**) direkt über der Elongationszone (nicht abgebildet). Nach 96 hpi überwuchs der Pilz allgemein die Wurzelspitze (**Abb. 7 F**) und die gesamte Wurzel (**Abb. 7 G**). Des Weiteren konnte kontinuierliches Wachstum von V143 im Leitgefäßsystem der Differenzierungszone der Wurzel zum selbigen Zeitpunkt beobachtet werden (**Abb. 7 H**). Innerhalb von 96 Stunden schaffte es V143 nicht, die Endodermissschicht der Wurzel zu durchdringen und besiedelte den vaskulären Zylinder nur über endodermisfreie Zonen.

3.2 Die Rolle von Cytokinin in der Symptomentwicklung während der Infektion mit *V. longisporum* 43

Aus der Literatur war bekannt, dass die *Verticillium*-Symptomentwicklung mit der Abnahme von Cytokinin korreliert. Beobachtet wurden diese Effekte in der Interaktion zwischen *Verticillium spec.* und Baumwolle beziehungsweise *V. dahliae* und Tomate (Misaghi *et al.*, 1972; Patrick *et al.*, 1977). In chlorotischen Bereichen konnten deutlich geringere Konzentrationen an Cytokinin als in symptomfreien Bereichen der Pflanze gemessen werden. Des Weiteren war auch im Xylemsaft von infizierten Pflanzen eine geringere Cytokininkonzentration vorhanden. Es wurde postuliert, dass die Symptomatik der *Verticillium*-Infektion mit der Cytokininabnahme korreliert und dass die Cytokininreduktion auf dem Vitalitätsverlust der Pflanze basiert.

In dieser Arbeit sollte der Mechanismus der Cytokininreduktion im *Arabidopsis* Modell-System näher erforscht werden. Im Vergleich zum Hauptwirt (Raps) von *V. longisporum* ist es in *Arabidopsis* besser möglich, die Korrelation zwischen Symptomentwicklung und Cytokininabnahme nachzuvollziehen. *Arabidopsis* weist einen deutlich kürzeren Generationswechsel als Raps auf und es stehen Promotor-Reporter-Linien und Mutanten zur Verfügung.

Über pharmakologische Behandlungen, Genexpressionsanalysen, Nutzung von Reporter-Konstrukten und transgene Linien konnten im Detail die molekularen Ursachen der Cytokininabnahme geklärt werden. In den Versuchen wurde unter Kurztagbedingungen mit einem Erdinfektions-System gearbeitet, da der Krankheitsverlauf in diesem System über Blattflächenvermessung und Frischgewichtsbestimmung quantifiziert werden konnte.

3.2.1 Symptomverlauf und Analyse der Cytokinin-Konzentrationen im *Arabidopsis*-*V. longisporum* 43-Pathosystem

Der Krankheitsverlauf einer V143-Infektion mit *A. thaliana* Col-0 wurde über einen Zeitraum von 7 bis 28 Tage nach Inokulation (dpi) dokumentiert (**Abb. 8**). Nach 7 dpi waren keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und infizierten Pflanzen zu sehen (**Abb. 8 A, E**). Ab 14 dpi traten bei den infizierten Pflanzen Wachstumsreduktionen (*stunting*), gerollte Blätter und das *yellow vein*-Symptom im Vergleich zur Kontrolle auf (**Abb. 8 B, F, F1**).

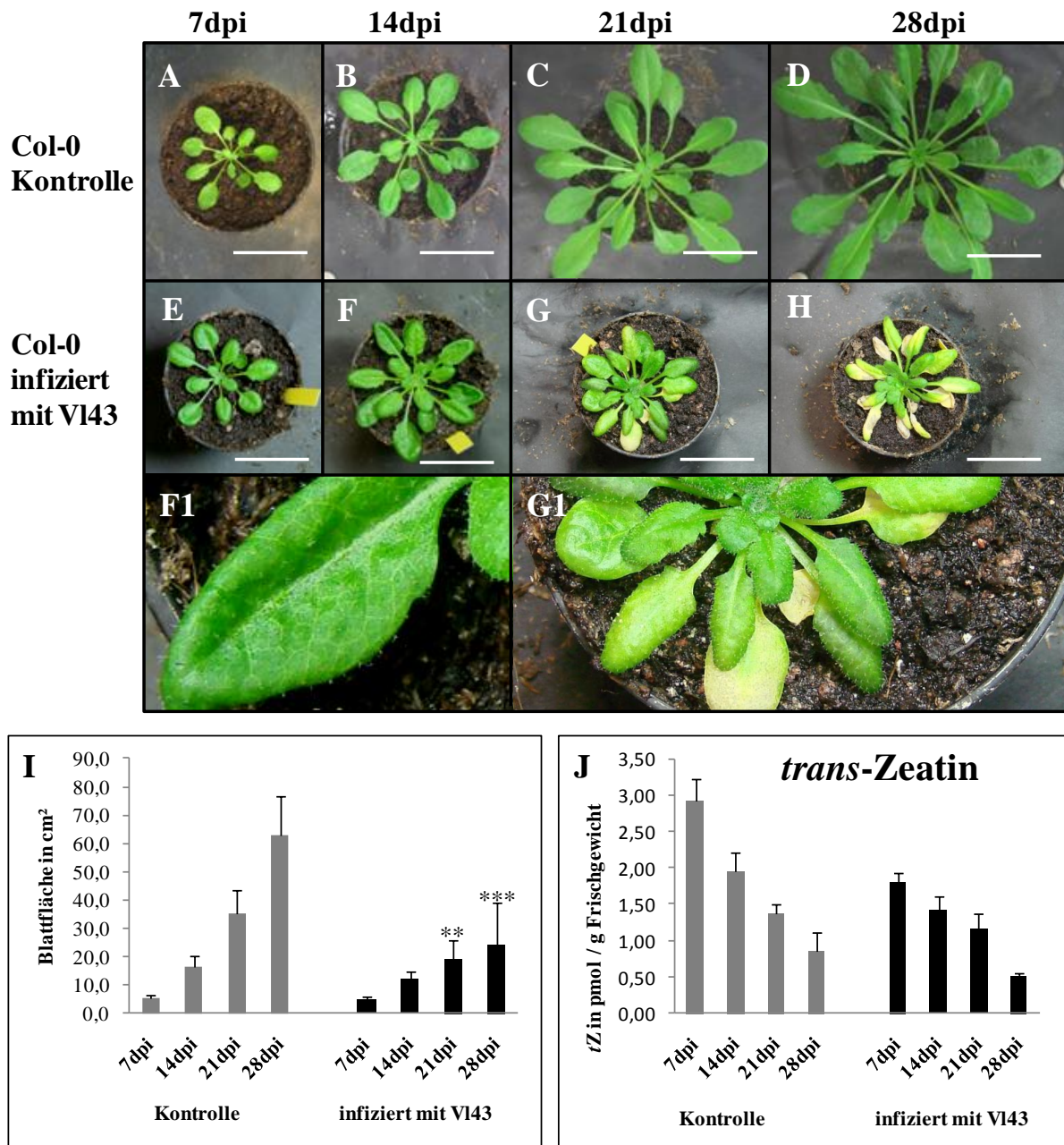


Abb. 8: Symptomausprägung von VI43-infizierten *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyp-Pflanzen (im Zeitverlauf 7, 14, 21 und 28 Tage nach Inokulation (dpi)) unter Kurztagbedingungen. (A-D) Kontroll-Pflanzen, (E-H) VI43-infizierte Pflanzen, (F1) Ausschnittsvergrößerung mit *yellow vein*-Symptom, (G1) Ausschnittsvergrößerung mit chlorotischen Blättern, (I) Vermessung der Blattfläche von Kontroll- und VI43-infizierten Pflanzen mit $n = 18$, (J) Vermessung der *trans*-Zeatin-Konzentration von Kontroll- und VI43-infizierten-Pflanzen mit $n = 9$ (3×3 vereinte Proben). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch zwei ($P \leq 0,01$) oder drei Sterne ($P \leq 0,001$) gekennzeichnet. Maßstab = 3 cm.

Zwischen 14 und 21 dpi entwickelten sich die ersten chlorotischen Blätter an der Rosettenbasis (Abb. 8 G, G1). In diesem Zeitraum induzierte der Pilz die vorzeitige Seneszenz in der Pflanze. Zum Zeitpunkt 28 dpi war das Krankheitsbild mit *stunting*, vielen chlorotischen und nekrotischen Blättern voll ausgeprägt (Abb. 8 H). Während des Versuchszeitraums kam es in den Kontrollen zu keinen Seneszenzerscheinungen (Abb. 8 A-D). Über die Blattflächenvermessung wurde das *stunting* quantifiziert, das ab 14 dpi zu

beobachten war und sich im Infektionsverlauf signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen ausprägte (**Abb. 8 I**). Der Unterschied zwischen Kontrolle und infizierten Pflanzen betrug bei 21 dpi circa (ca.) 46% und bei 28 dpi ca. 64 % pro Rosette. In Proben aus diesem Zeitverlaufsexperiment wurden von der Arbeitsgruppe M. Strnad (Palacky University & Institute of Experimental Botany) die Cytokininkonzentrationen gemessen. In **Abb. 8 J** ist die Abnahme der *trans*-Zeatin (*tZ*)- Konzentrationen während einer V143-Infektion abgebildet. *Trans*-Zeatin ist in der Pflanze das Cytokinin, welches die höchste Konzentration aufweist. Interessanterweise begann die *tZ*-Reduktion schon ab 7 dpi, als optisch noch kein Infektionsphänotyp an der Pflanze zu sehen war. Zu den Zeitpunkten 7 dpi und 28 dpi war mit ca. 38 % und ca. 41% die *tZ*-Reduktion im Vergleich zur Kontrolle am stärksten. Bei 14 dpi lag eine *tZ*-Reduktion von ca. 27 % vor und bei 21 dpi mit ca. 16 % die geringste Reduktion während des untersuchten Zeitraums.

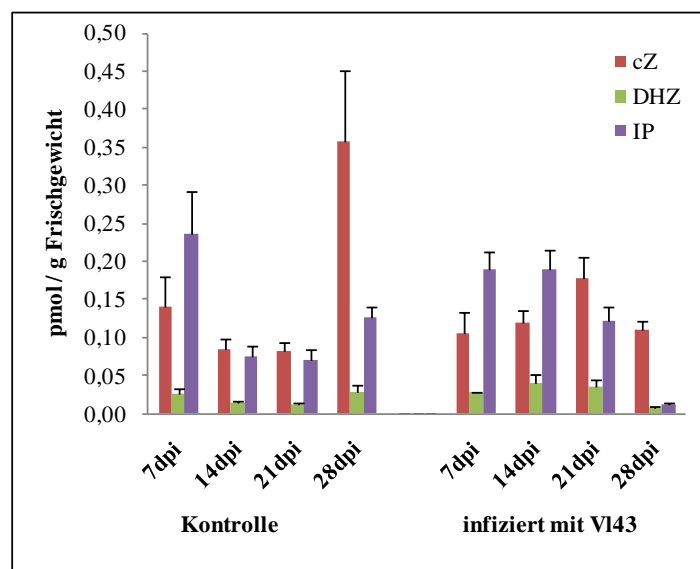


Abb. 9: Bestimmung der Konzentration von *cis*-Zeatin (*cZ*), Dihydrozeatin (DHZ) und Isopentenyladenin (IP) in Col-0 Kontroll- und V143-infizierten WT-Pflanzen unter Kurztagbedingungen (im Zeitverlauf 7, 14, 21 und 28 dpi). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte.

Neben *tZ* wurden auch die weiteren pflanzlichen Cytokinine gemessen (**Abb. 9**). Diese lagen im Vergleich zu *trans*-Zeatin in viel geringeren Konzentrationen vor. Zum Zeitpunkt 14 dpi und 21 dpi kam es zu einer leichten Konzentrationserhöhung von *cZ*, DHZ und iP in infizierten Pflanzen. Bei 7 dpi und 28 dpi waren die Konzentrationen leicht reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Neben den Cytokinen wurden auch deren Vorstufen und Speicherverbindungen analysiert. Die Ergebnisse hierzu sind im Anhang dargestellt (**Abb. 44 - Abb. 47**).

VI43-Infektion führte unter Kurztagbedingungen zu einer generellen Symptomentwicklung mit *stunting*, *yellow-veins* und verfrühter Seneszenz. Ab dem Zeitpunkt 7 dpi kam es zu einer starken Abnahme der *tZ*-Konzentration, jedoch nicht zu einer vergleichbaren der anderen Cytokinine.

3.2.2 Symptomverlauf der Infektion und indirekte Analyse der Cytokininkonzentrationen mittels einer Promotor-Reporter-Linie

In dem vorhergehenden Experiment wurden die Konzentrationen der pflanzlichen Cytokinine direkt gemessen, wobei *tZ* eine deutliche Konzentrationsabnahme im Zeitverlauf zeigte (Kapitel 3.2.1). Um die Relevanz dieser Daten zu überprüfen, wurden anschließend Experimente mit der *Arabidopsis* Promotor-Reporter-Linie *Response Regulator 5* (ARR5)-GUS Linie durchgeführt (Kudryakova *et al.*, 2008). ARR5 ist ein A-Typ *Response Regulator* der Cytokininsignaltransduktion und reagiert direkt auf Konzentrationsänderungen von Cytokinin. Aufgrund dieser Eigenschaft wird pARR5:GUS benutzt, um indirekt die Konzentrationsänderungen von Cytokinin nachzuweisen. Da sich das Konstrukt im WS Hintergrund befindet, wurde der Symptomverlauf einer *Verticillium*-Infektion auch in diesem Ökotyp dokumentiert, um die Anfälligkeit anderer *Arabidopsis* Ökotypen gegenüber VI43 zu überprüfen.

Der Infektionsverlauf von VI43 in pARR5:GUS *A. thaliana* WS Pflanzen (**Abb. 10**) unterschied sich grundlegend nicht von dem in Col-0 unter Kurztagbedingungen (**Abb. 8**). Die einzige Veränderung fand sich in der Infektionsvarianz, die geringer war als in Col-0. Die Kontrollpflanzen zeigten über den Versuchszeitraum normales kontinuierliches Wachstum, ohne Seneszenz auszubilden (**Abb. 10 A-D**). Nach 7 dpi waren keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und infizierten Pflanzen zu sehen (**Abb. 10 A, E**). Die infizierten WS Pflanzen bildeten signifikantes *stunting* und das *yellow vein-Symptom* ab 14 dpi aus (**Abb. 10 F**). In WS wurde auch zwischen 14 und 21 dpi die verfrühte Seneszenz induziert (**Abb. 10 G**). Das Krankheitsbild war vergleichbar zu Col-0 mit allen Symptomen zum Zeitpunkt 28 dpi voll ausgeprägt (**Abb. 10 H**). Der Infektionsverlauf wurde über die Frischgewichtsabnahme dokumentiert und zeigte eine gleichmäßige, signifikante Abnahme ab 14 dpi (**Abb. 10 I**). Die Messung der relativen GUS-Aktivität in der pARR5:GUS Linie zeigte zu allen Zeitpunkten eine signifikante ($P \leq 0,001$) Reduktion im Infektionsverlauf (**Abb. 10 J**). Im Vergleich zur Kontrolle war die GUS-Aktivitätsabnahme zu den Zeitpunkten 7, 21 und 28 dpi am stärksten

und etwas geringer zum Zeitpunkt 14 dpi. Die Promotoraktivität in den Kontrollen war relativ konstant und variierte nur geringfügig.

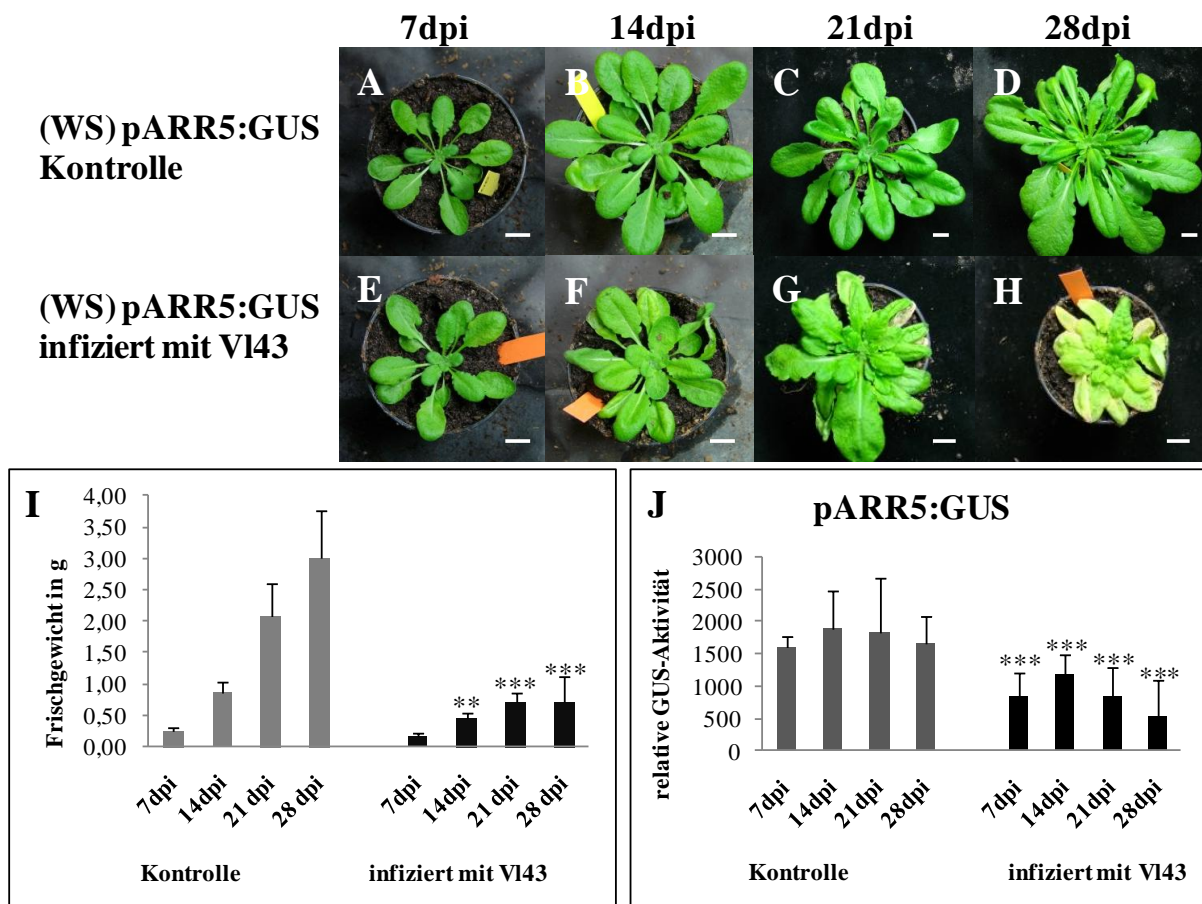


Abb. 10: Symptomausprägung und GUS-Aktivitätsbestimmung von VI43-infizierten *A. thaliana* WS pARR5:GUS-Pflanzen unter Kurztagbedingungen (im Zeitverlauf 7, 14, 21 und 28 dpi). (A-D) Kontroll-Pflanzen, (E-H) VI43-infizierte Pflanzen, (I) Messung des Frischgewichtes von Kontroll- und VI43-infizierten-Pflanzen mit $n = 18$, (J) Bestimmung der relativen GUS-Aktivität in Kontroll- und VI43-infizierten-Pflanzen mit $n = 12$ biologische Wiederholungen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch zwei ($P \leq 0,01$) oder drei Sterne ($P \leq 0,001$) gekennzeichnet. Maßstab = 1 cm.

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass sich die Ökotypen WS und Col-0 vergleichbar suszeptibel für VI43-Infektionen zeigten. Ab dem Zeitpunkt 7 dpi kam es zu einer starken Abnahme von *tZ* (Kapitel 3.2.1). Diese Reduktion war auch über einen indirekten Nachweis mit Hilfe der pARR5:GUS Linie möglich.

3.2.3 Quantitative RT-PCR ausgewählter B- und A-Typ ARRs

Im vorigen Kapitel 3.2.1 wurden Abnahmen der *tZ*-Konzentration durch VI43-Infektion gezeigt. Durch Veränderungen der Cytokininkonzentration werden Gene der

Cytokininsignaltransduktion gesteuert. Bei diesen Genen handelt es sich um A- und B-Typ ARR_s (Kapitel 1.8). Diese Gene weisen ein charakteristisches Expressionsprofil bei natürlicher Seneszenz auf, wobei A-Typ ARR_s herunterreguliert und B-Typ ARR_s hochreguliert sind (Analyse mittels eFP browser, <http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Daten nicht gezeigt). Sie reflektieren dabei indirekt die Veränderung der Cytokininkonzentration während der Seneszenz in der Pflanze. Durch qRT-PCR sollte überprüft werden, ob dieses Expressionsprofil auch in V143-infizierten Pflanzen zu beobachten ist, da der Pilz während des Infektionsverlaufs Seneszenz auslöst. Das analysierte Probenmaterial stammte aus Erdinfektionsversuchen unter Kurztagbedingungen.

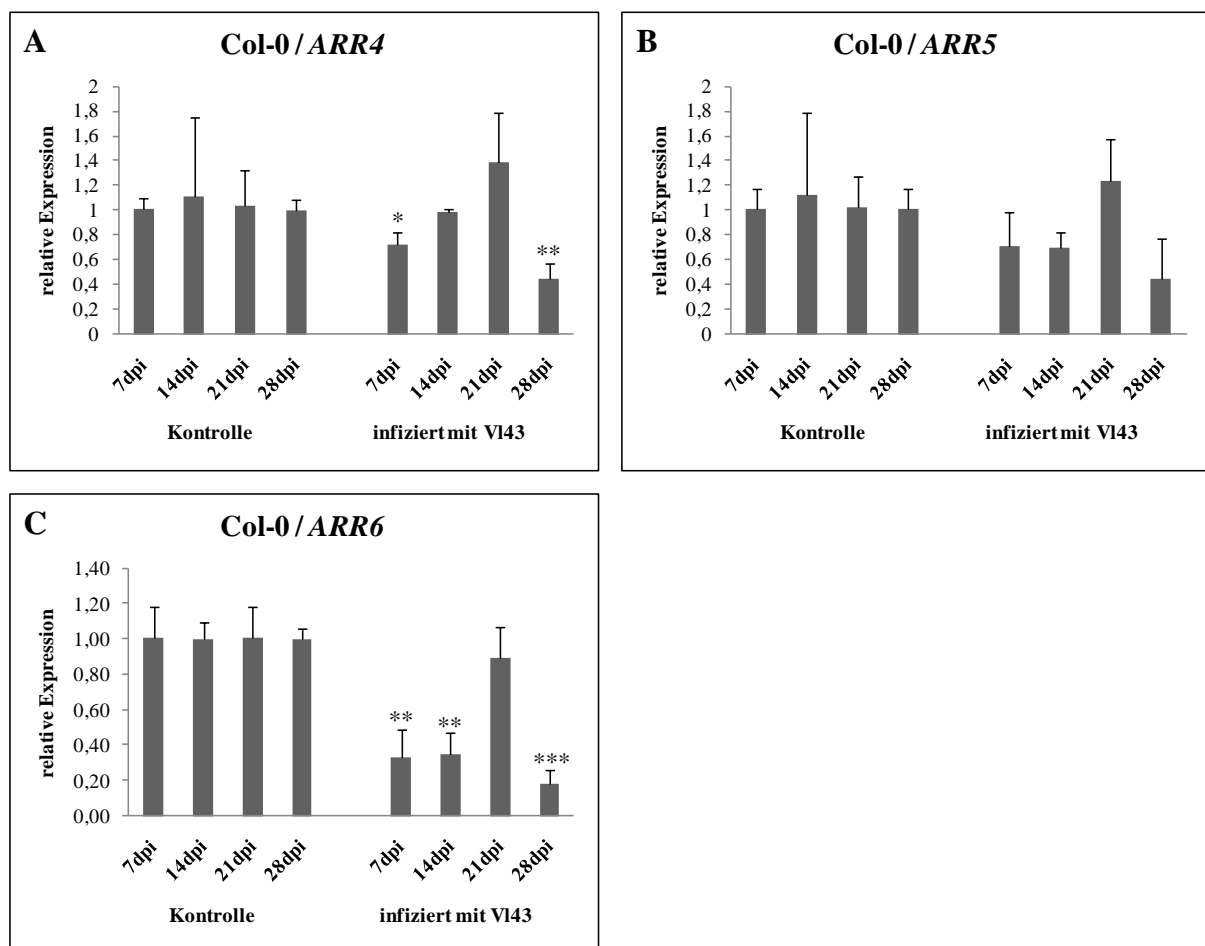


Abb. 11: Quantitative RT-PCR von V143-infizierten und Kontrollpflanzen der folgenden A-Typ *Arabidopsis Response Regulator* (ARRs): (A) *ARR4*, (B) *ARR5* und (C) *ARR6* im Ökotyp Col-0. Im Zeitverlauf von 7, 14, 21 und 28 dpi wurden die Pflanzen geerntet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 9 Pflanzen (3*3 vereinte Proben) aus drei biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch einen (P ≤ 0,05), zwei (P ≤ 0,01) oder drei Sterne (P ≤ 0,001) gekennzeichnet.

Die Expressionsprofile verschiedener A-Typ ARR_s (**Abb. 11**) und B-Typ ARR_s (**Abb. 12**) wurden im Zeitverlauf 7 - 28 dpi dokumentiert. Die Gene wurden zufällig aus den 23 ARR_s ausgewählt. Grundsätzlich zeigten alle A-Typ ARR_s im Vergleich zur Kontrolle eine

reduzierte Transkriptmenge, bis auf den Zeitpunkt 21 dpi und *ARR4* bei 14 dpi (**Abb. 11 A**). *ARR4* war signifikant herunterreguliert zum Zeitpunkt 7 und 28 dpi (**Abb. 11 A**). *ARR5* zeigte eine Expressionsreduktion vergleichbar mit der GUS-Aktivitätsabnahme der transgenen, infizierten pARR5:GUS Pflanzen (**Abb. 11 B**, **Abb. 10 J**). Die Expression von *ARR6* war zu den Zeitpunkten 7, 14 und 28 dpi signifikant reduziert in infizierten Pflanzen (**Abb. 11 C**).

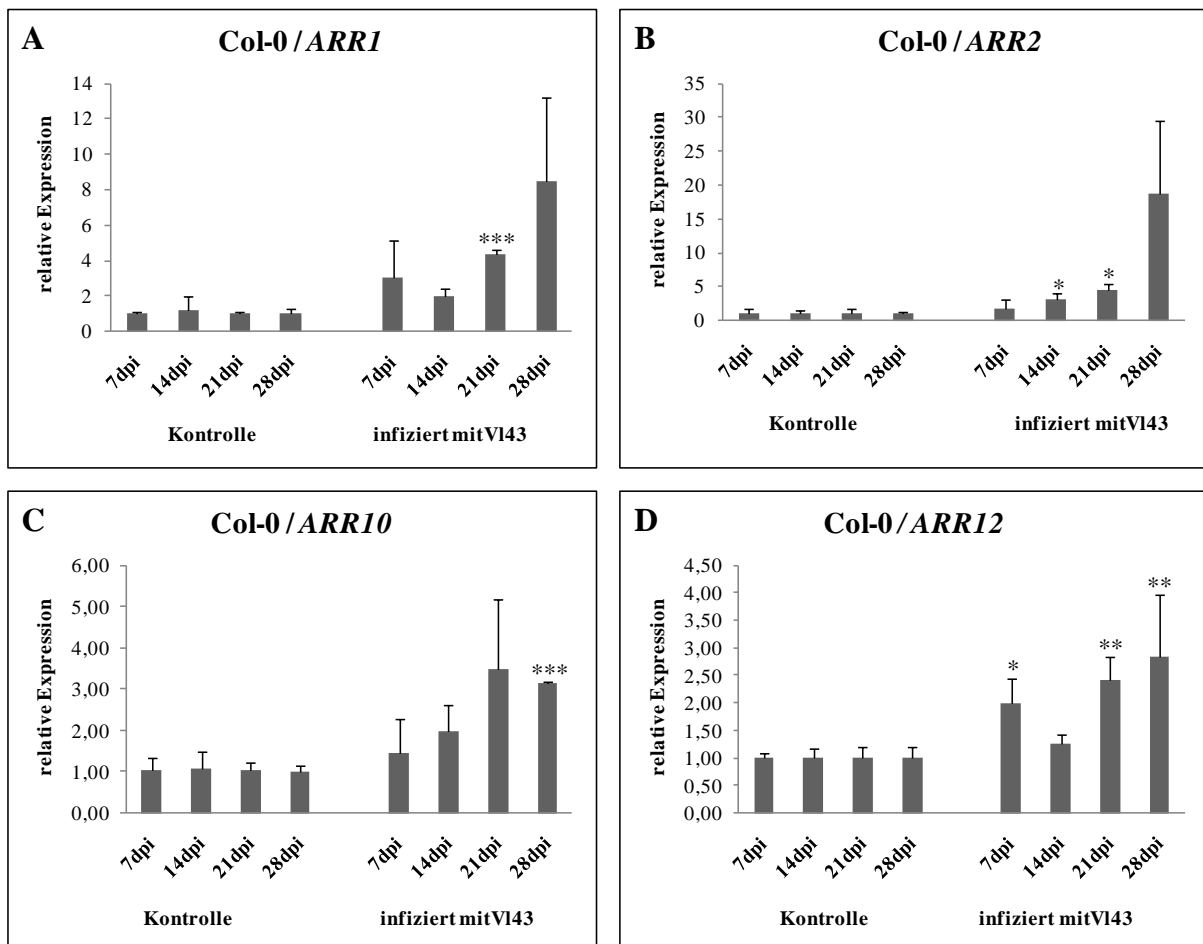


Abb. 12: Quantitative RT-PCR von V143-infizierten und Kontrollpflanzen der folgenden B-Typ *Arabidopsis Response Regulator* (*ARRs*): (A) *ARR1*, (B) *ARR2*, (C) *ARR10* und (D) *ARR12* im Ökotyp Col-0. Im Zeitverlauf von 7, 14, 21 und 28 dpi wurden die Pflanzen geerntet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von $n = 9$ Pflanzen (3×3 vereinte Proben) aus drei biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch einen ($P \leq 0,05$), zwei ($P \leq 0,01$) oder drei Sterne ($P \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Die B-Typ *ARRs* zeigten in V143-infizierten Pflanzen eine Induktion beginnend ab 7 dpi (**Abb. 12**). Die Transkriptmenge von *ARR1* war 2-fach bis 8-fach im Infektionsverlauf erhöht und zum Zeitpunkt 21 dpi signifikant (**Abb. 12 A**). Die Steigerung der Transkriptabundanz von *ARR2* nahm ab 7 dpi gleichmäßig im Zeitverlauf zu und war zum Zeitpunkt 28 dpi verhältnismäßig stark, allerdings mit einer großen Standardabweichung (**Abb. 12 B**). *ARR10* war im Vergleich zu *ARR1* und *ARR2* mit einem Maximum von ca. 3-fach nur schwach hochreguliert, aber im Zeitverlauf mit den anderen vergleichbar ansteigend (**Abb. 12 C**).

ARR12 verhielt sich im Expressionsprofil ähnlich wie *ARR10* und war auch nur gering, aber signifikant induziert (**Abb. 12 C**).

Die Expressionsanalysen zeigen, dass sich die Expressionsprofile aller überprüften ARRs in V143-infizierten Pflanzen wie bei natürlicher Seneszenz verhalten. Dementsprechend induziert V143 wahrscheinlich verfrühte Seneszenz.

3.2.4 Quantitative RT-PCR von Cytokininoxidasen (CKX) und Isopentenyltransferasen

Im Kapitel 3.2.3 wurde gezeigt, dass V143 wahrscheinlich verfrühte Seneszenz auslöst, da es zu Cytokininreduktionen in den infizierten Pflanzen kam (Kapitel 3.2.1). Allgemein wird die Cytokinin-Homöostase durch Cytokininoxidasen, Cytokininspeicherung oder Cytokinininaktivierung reguliert (Kapitel 1.7, Kapitel 1.8).

Durch Überprüfung der Genexpression der sieben *Arabidopsis* Cytokininoxidasen sollte geklärt werden, ob es einen möglichen Zusammenhang zwischen *CKX*-Induktion und Cytokininreduktion gibt. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob eine erhöhte Cytokininbiosynthese durch Induktion pflanzlicher *IPT*-Gene der pathogen-induzierten Cytokininreduktion entgegenwirkt. Die Ergebnisse der *IPT*-Expressionsanalysen sind im Anhang dargestellt (**Abb. 48**).

Die *CKX*-Gene waren zu verschiedenen Zeitpunkten in V143-infizierten Pflanzen hochreguliert (**Abb. 13**). *CKX1* zeigte 21 dpi eine signifikante Steigerung der Transkriptmenge (4-fach) (**Abb. 13 A**). Vergleichbar zu *CKX1* war auch *CKX3* zum gleichen Zeitpunkt am höchsten induziert (ca. 8-fach mit $P \leq 0,05$) (**Abb. 13 B**). Die Transkriptabundanz von *CKX2* stieg ab 14 dpi bis zu einer Stärke von 175-fach zum Zeitpunkt 28 dpi kontinuierlich an (**Abb. 13 B**). Die weiteren Expressionsprofile der restlichen *CKX*-Gene befinden sich im Anhang (**Abb. 49**).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine V143-Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten die Cytokininoxidasen der Pflanze induzierten. Dadurch wurde wahrscheinlich teilweise die Cytokininabnahme reguliert. Eine signifikante Induktion der *IPTs* fand nicht statt (**Abb. 50**).

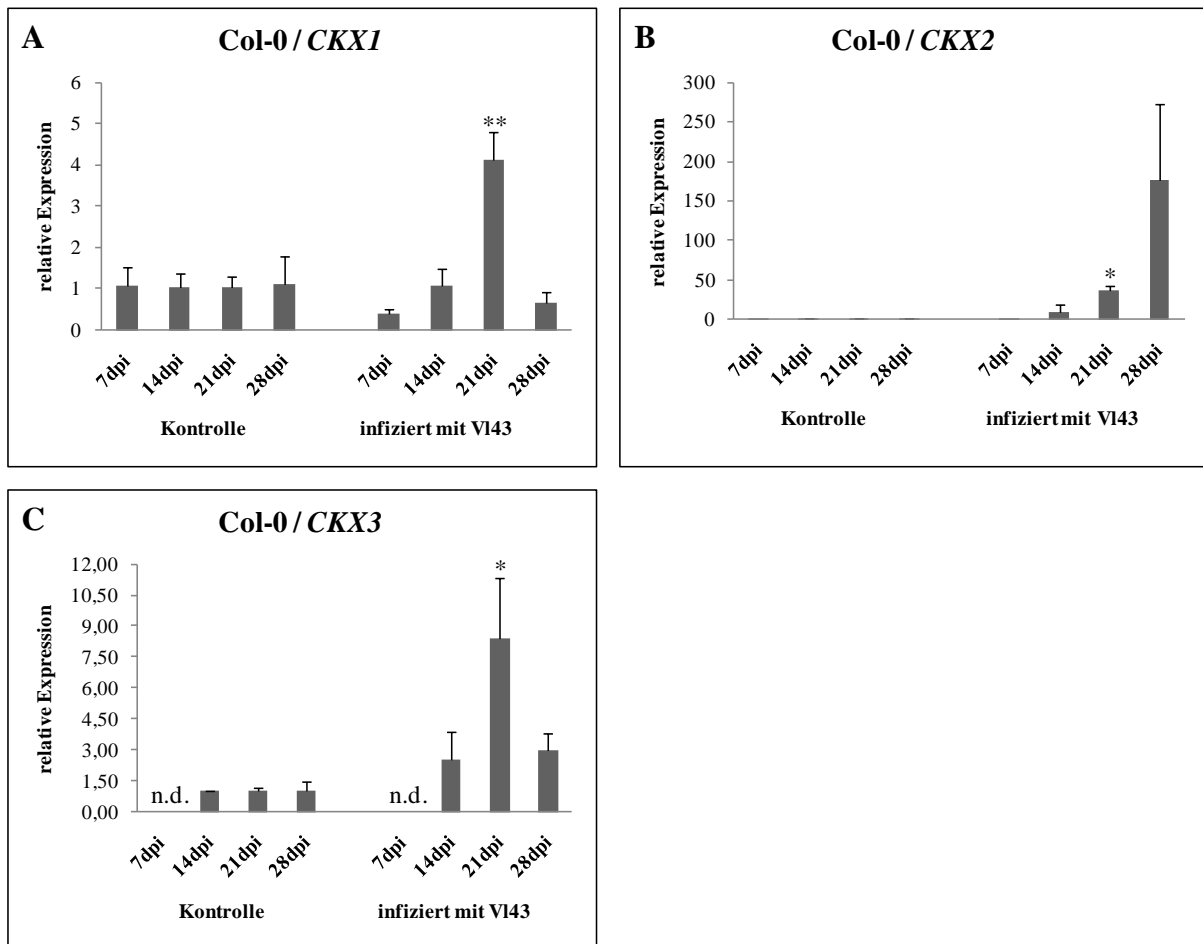


Abb. 13: Quantitative RT-PCR von V143-infizierten und Kontrollpflanzen der folgenden Cytokininoxidasen (CKX): (A) *CKX1*, (B) *CKX2* und (C) *CKX3* im Ökotyp Col-0. Im Zeitverlauf von 7, 14, 21 und 28 dpi wurden die Pflanzen geerntet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 9 Pflanzen (3*3 vereinte Proben) aus drei biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch einen ($P \leq 0,05$) oder zwei ($P \leq 0,01$) Sterne gekennzeichnet.

3.2.5 Pharmakologische Behandlung *V. longisporum* 43-infizierter *A. thaliana* Pflanzen mit BAP

Da V143-Infektion eine Cytokininreduktion in infizierten Pflanzen auslöst (Kapitel 3.2.1), sollte überprüft werden, ob die Stabilisierung der Cytokinin-Homöostase durch exogene Applikation des synthetischen Cytokinins 6-Benzylaminopurin (BAP) die Ausprägung des Infektionsphänotyps beeinflusst. Es wurde zusätzlich durch quantitative Bestimmung der DNA Menge dokumentiert, ob die Cytokiningabe die pilzliche Proliferation verändert. Mit der exogenen Applikation von BAP wurde drei Tage nach Inokulation der Pflanze mit V143 begonnen. Die *A. thaliana* Col-0 Wildtyp-Pflanzen wurden dann kontinuierlich alle drei Tage mit einer Konzentration von 50 μM BAP gleichmäßig bis zum Zeitpunkt 21 dpi besprüht. Die restlichen sieben Tage des Versuchs wurde keine Cytokininbehandlung durchgeführt, da BAP

relativ stabil ist und deshalb langsam abgebaut wird. Die relativ hohe Konzentration von 50 μM BAP wurde gewählt, um einen möglichst starken Effekt auszulösen.

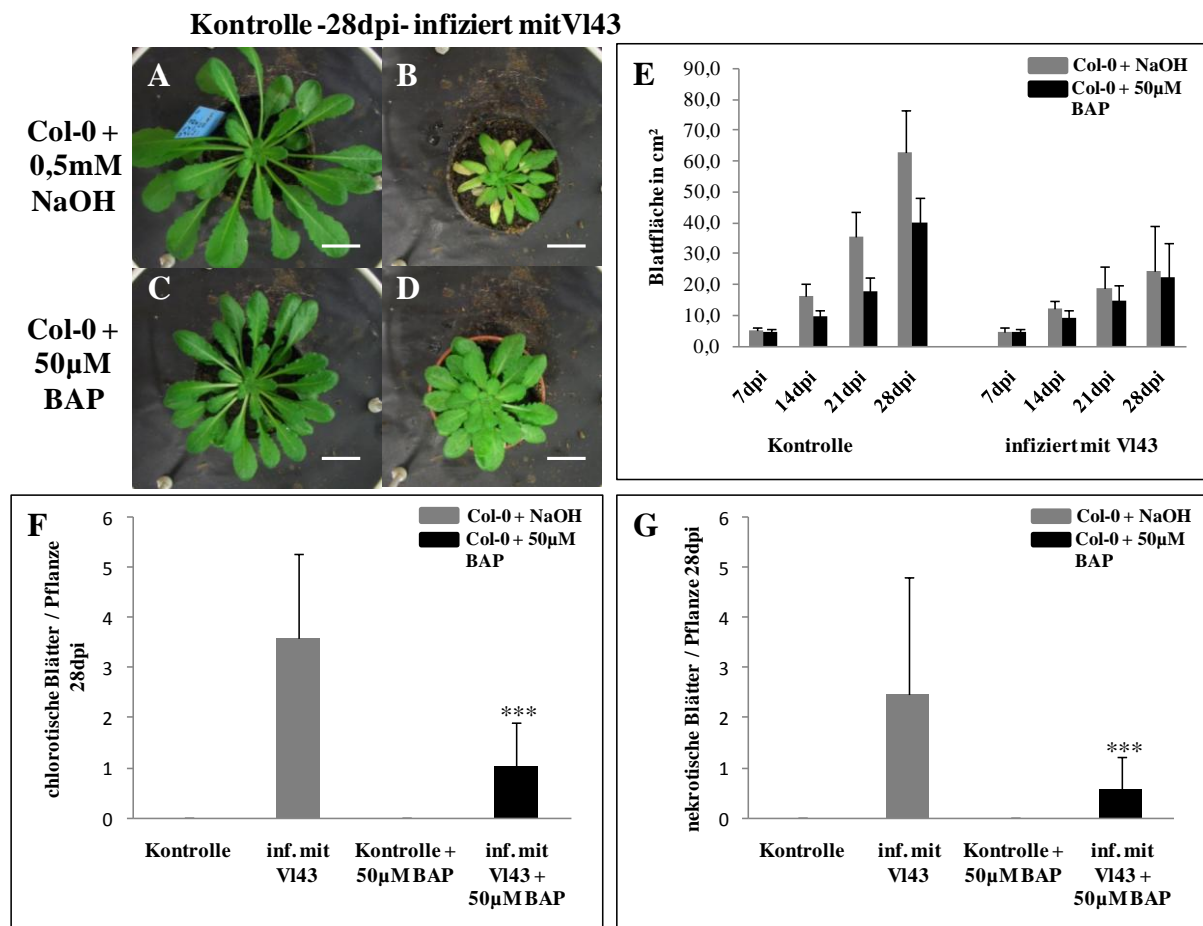


Abb. 14: Behandlung von Kontroll- und VI43-infizierten *A. thaliana* Col-0 WT-Pflanzen mit 50 μM 6-Benzylaminopurin (BAP) unter Kurztagbedingungen (im Zeitverlauf 7, 14, 21 und 28 dpi). (A) Kontroll-Pflanze behandelt mit 0,5mM NaOH 28 dpi, (B) VI43-infizierte Pflanze behandelt mit NaOH 28 dpi, (C) Kontroll-Pflanze behandelt mit 50 μM BAP 28 dpi, (D) VI43-infizierte Pflanze behandelt mit 50 μM BAP 28 dpi, (E) Vermessung der Blattfläche der Kontroll (NaOH)- und BAP-Behandlung und (F, G) Bestimmung der Anzahl von chlorotischen und nekrotischen Blättern zum Zeitpunkt 28 dpi in Kontroll (NaOH)- und BAP-behandelten Pflanzen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von $n = 18$ biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede ($P \leq 0,001$) zwischen Kontrollpflanzen und mit BAP behandelten Pflanzen sind durch drei Sterne gekennzeichnet. Maßstab = 2 cm.

Die exogene Behandlung mit BAP führte zu einer drastischen Reduktion der VI43-induzierten Symptomausprägung, insbesondere der verfrühten Seneszenz (**Abb. 14**). Der Phänotyp der Pflanzen des Kontrollansatzes zum Zeitpunkt 28 dpi, die mit dem Lösungsmittel (0,5 mM NaOH) des Cytokinins behandelt wurden, entsprach dem einer normalen Infektion. Die nicht mit BAP behandelten Pflanzen zeigten deutliches *stunting*, gerollte Blätter und verfrühte Seneszenz (**Abb. 14 A/B**). Im Vergleich dazu zeigten die BAP-behandelten Pflanzen einen veränderten Phänotyp (**Abb. 14 C/D**). Die BAP-Kontrollpflanzen hatten eine um 35 % verringerte Blattfläche gegenüber den NaOH-behandelten Pflanzen 28 dpi (**Abb. 14 E**). Dieser Effekt war in infizierten Pflanzen nur zu ca. 6 % ausgeprägt. Die infizierten Pflanzen

zeigten auch *stunting*, aber eine deutliche Reduktion der induzierten Seneszenz. Die Blätter waren nicht gerollt und wiesen keine Chlorosen auf (**Abb. 14 D**). Das Ausmaß des *stuntings* war in der NaOH-behandelten Infektion mit ca. 64 % höher als in dem BAP-Ansatz, welcher 47% zum Zeitpunkt 28 dpi betrug (**Abb. 14 E**). Des Weiteren war die Anzahl von chlorotischen und nekrotischen Blättern 28 dpi bei BAP-behandelten, infizierten Pflanzen signifikant reduziert (**Abb. 14 F/G**). Jegliche Kontrollen, ob behandelt oder unbehandelt, hatten 28 dpi keine chlorotischen und nekrotischen Blätter. Im Vergleich hatten infizierte, BAP-behandelte Pflanzen im Schnitt ca. drei chlorotische und ca. zwei nekrotische Blätter weniger als NaOH-behandelte infizierte Pflanzen.

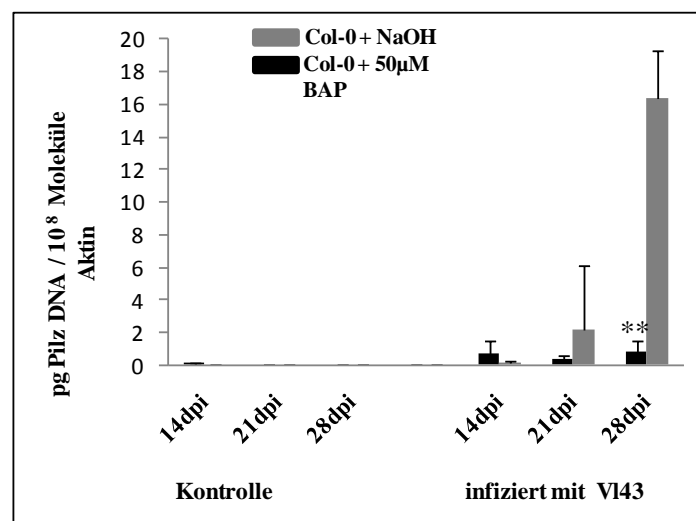


Abb. 15: Bestimmung der DNA-Menge mittels qRT-PCR von V143 in *A. thaliana* Col-0 Kontroll- und V143-infizierten WT-Pflanzen im Zeitverlauf 14, 21 und 28 dpi. Verglichen wurde die Pilzmenge von Col-0 mit NaOH- und Col-0 mit BAP-behandelten Pflanzen, jeweils infiziert und nicht infiziert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von $n = 9$ Pflanzen (3*3 vereinte Proben) aus drei biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede ($P \leq 0,01$) zwischen Kontrollpflanzen und mit BAP behandelten Pflanzen sind durch zwei Sterne gekennzeichnet.

Mittels quantitativer RT-PCR wurde im Zeitverlauf 14 - 28 dpi die pilzliche Proliferation in den Pflanzen verfolgt (**Abb. 15**). In beiden Kontrollen wurde keine pilzliche DNA gemessen. In der mit NaOH-behandelten Kontrollinfektion nahm die Menge an pilzlicher DNA von 14 dpi an zu. Von 21 dpi bis zum Zeitpunkt 28 dpi verachtfaachte sich die DNA Menge. Im Vergleich fand bei den BAP-behandelten infizierten Pflanzen kein Anstieg statt und 28 dpi war die pilzliche DNA Menge in diesen Pflanzen signifikant reduziert.

Um auszuschließen, dass die gemessene Reduktion der V143-Proliferation in BAP-behandelten Pflanzen auf einem toxischen Effekt des synthetischen Cytokinins basierte,

wurde in sterilen *in vitro*-Experimenten die Toxizität der Substanz getestet. Über einen Zeitraum von 28 Tagen wurde das Koloniewachstum durch Messung des Durchmessers von VI43 mit 0,5 mM NaOH oder 50 μ M BAP dokumentiert. In beiden Ansätzen kam es zu keinem Unterschied im Koloniewachstum von VI43 (Abb. 16 A). Die Bilder B und C zeigen die VI43 Kolonien auf CDB-Medium mit 0,5 mM NaOH oder 50 μ M BAP zum Zeitpunkt 28 dpi.

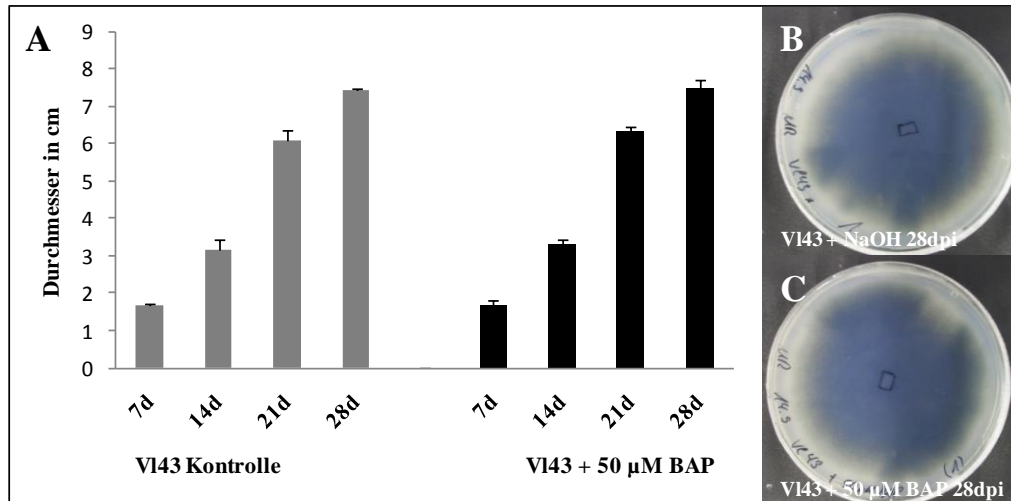


Abb. 16: Wachstumsexperiment von VI43 in Sterilkultur im Zeitverlauf 7, 14, 21 und 28 Tage (d). (A) Die grauen Balken repräsentieren das Wachstum von VI43 mit NaOH und die schwarzen Balken das Wachstum mit 50 μ M BAP. Es wurde jeweils der Durchmesser der Kolonie bestimmt. (B, C) Fotos von VI43 in Sterilkultur 28 dpi auf Medien mit der jeweiligen Chemikalie. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 4 biologischen Wiederholungen.

Abschließend lässt sich schlussfolgern, dass eine Stabilisierung der Cytokinin-Homöostase durch exogene BAP-Applikation die Symptomausprägung nach VI43-Infektion reduzierte.

3.2.6 Pharmakologische Behandlung VI43-infizierter *A. thaliana* Pflanzen mit INCYDE

Durch exogene Applikation von BAP konnte eine Stabilisierung der Cytokinin-Homöostase erreicht werden, die folglich zu einer Reduzierung der induzierten Seneszenz führte (Kapitel 3.2.5). In wie weit dies auch für die Chemikalie 2-chloro-6-(3-methoxyphenylamino)-purin (INCYDE) zutrifft, sollte geklärt werden (Zatloukal *et al.*, 2008). Bei INCYDE handelt es sich um ein Adeninderivat, das nicht als Cytokinin, sondern als Inhibitor der Cytokininantwort wirkt. Es hat die Eigenschaft, Cytokininoxidasen zu blockieren und dadurch den Abbauprozess von Cytokinin zu inhibieren. Hierdurch kommt es zu einer Anreicherung

pflanzeigener Cytokinine. INCYDE bindet trotz seiner Cytokinin-ähnlichen Struktur nicht an die Cytokininrezeptoren (AHKs). Damit inhibiert INCYDE den Cytokininabbau, ohne selbst als Cytokinin aktiv zu sein und hierdurch kann spezifisch die Hemmung des Abbaus untersucht werden. Die Chemikalie bietet dementsprechend eine Möglichkeit, in *Arabidopsis* alle sieben CKX zu blockieren, was einer multiplen *Knockdown*-Mutante entsprechen würde. Einzel-Mutanten der CKX-Gene zeigten vermutlich aufgrund von Redundanz keinen Phänotyp (Daten nicht gezeigt) und Mehrfachmutanten, in denen mehr als ein CKX-Gen ausgeschaltet ist, standen nicht zur Verfügung. Mit VI43-infizierte Einzel-Mutanten zeigten einen normalen Infektionsverlauf (Daten nicht gezeigt). Es konnten keine Rückschlüsse für die Klärung der Fragestellung, ob eine Korrelation zwischen Cytokininreduktion und VI43-induzierter Symptomausprägung besteht, gezogen werden.

Aus diesem Grund wurde INCYDE benutzt, um die Bedeutung von Cytokininoxidasen für den VI43-induzierten Cytokininabbau zu untersuchen. Die Phänotypen INCYDE-behandelter Pflanzen sollten mit denen der BAP-Behandlung verglichen und die Proliferation von VI43 in Kontroll- und INCYDE-behandelten *A. thaliana* Col-0 Pflanzen gemessen werden. Die Pflanzen wurden wie bei der BAP-Applikation im gleichen Zeitrahmen mit INCYDE oder dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle behandelt. Um einen deutlichen Phänotyp zu erzeugen, wurde für das Experiment eine Konzentration von 10 μM gewählt. Dies entspricht dem doppelten IC_{50} Wert in Bezug auf die Hemmung von heterolog exprimiertem AtCKX2 (Zatloukal *et al.*, 2008).

Es wurden der BAP-Behandlung vergleichbare Ergebnisse erzielt (Kapitel 3.2.5). Der Symptomverlauf einer DMSO-behandelten Kontrollinfektion entsprach dem Verlauf einer unbehandelten Col-0 Infektion mit VI43 (**Abb. 17 A, B**). 28 dpi zeigten die Pflanzen starkes *stunting* und verfrühte Seneszenz (**Abb. 17 B, E**).

Die INCYDE Behandlung führte zu ca. 28 % Wachstumsreduktion im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollpflanzen (**Abb. 17 A, C, E**). Bei infizierten Pflanzen war der Effekt sogar umgekehrt. INCYDE-behandelte, infizierte Pflanzen waren ca. 100 % größer als die entsprechenden infizierten Kontrollen (**Abb. 17 B, D, E**).

Der Phänotyp von VI43-infizierten, INCYDE-behandelten Pflanzen zeigte im Vergleich zu DMSO-behandelten, infizierten Pflanzen auch *stunting*, eine deutliche Reduktion der Seneszenz, keine gerollten Blätter und dichteren Blattwuchs (**Abb. 17 B/D**). Der *stunting*-Effekt einer INCYDE-Behandlung war im Vergleich zur Kontrolle mit 42 % zu 81 % relativ gering zum Zeitpunkt 28 dpi, so dass im Verhältnis eine größere Blattfläche vorlag. Die Daten

des Frischgewichts zeigten dieselbe Tendenz (**Abb. 17 F**). Bei Betrachtung der pilzlichen DNA Menge war diese in INCYDE-behandelten Pflanzen 5-fach geringer als im Kontrollansatz 28 dpi (**Abb. 17 G**).

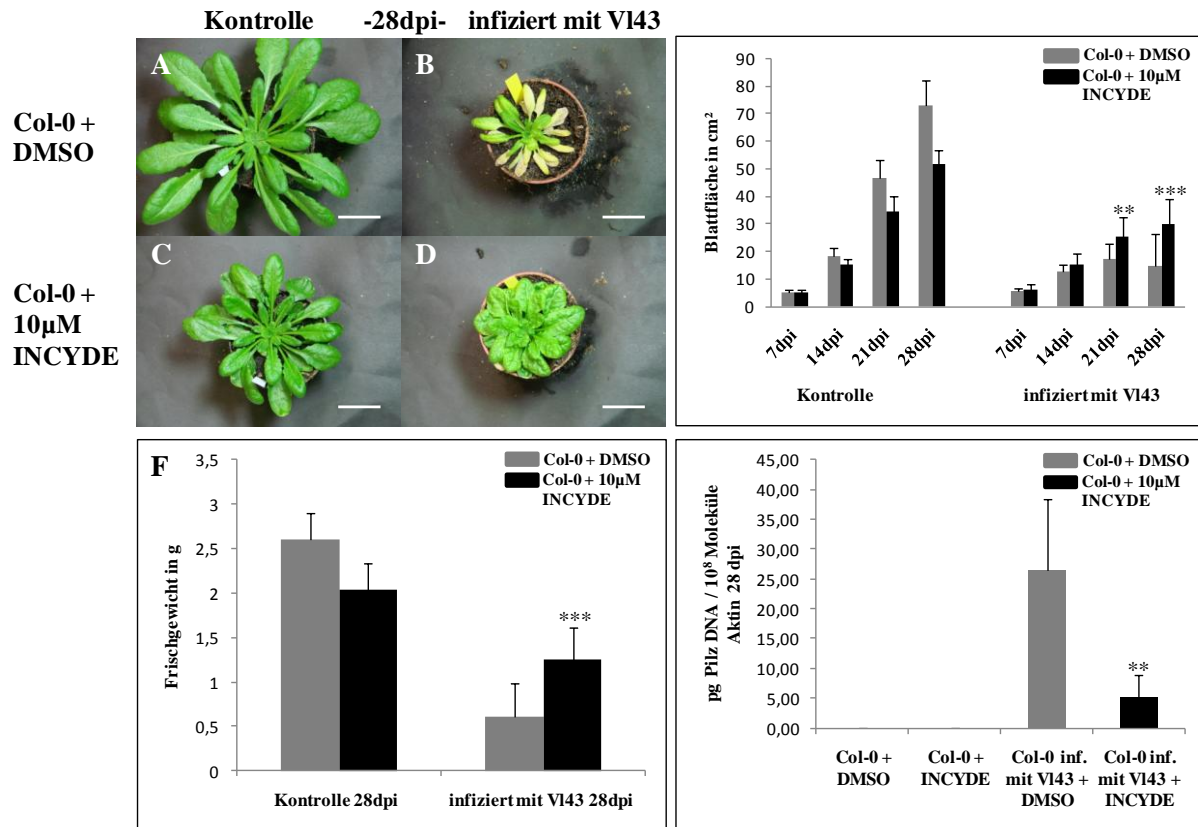


Abb. 17: Behandlung von Kontroll- und VI43-infizierten *A. thaliana* Col-0 WT-Pflanzen mit 10 μ M 2-chloro-6-(3-methoxyphenylamino) purine (INCYDE) unter Kurztagbedingungen (im Zeitverlauf 7, 14, 21 und 28 dpi). (A) Kontroll-Pflanzen behandelt mit DMSO 28 dpi, (B) VI43-infizierte Pflanzen behandelt mit DMSO 28 dpi, (C) Kontroll-Pflanzen behandelt mit 10 μ M INCYDE 28 dpi, (D) VI43-infizierte Pflanzen behandelt mit 10 μ M INCYDE 28 dpi, (E) Vermessung der Blattfläche im Zeitverlauf 7-28 dpi und (F) des Frischgewichtes 28 dpi der Kontrolle (DMSO)- und INCYDE-Behandlung. (G) zeigt die Bestimmung der pilzlichen DNA-Menge von VI43 in Col-0 behandelten Pflanzen mit DMSO und 10 μ M INCYDE in mit VI43-infizierten und Kontroll-Pflanzen 28 dpi. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. (A-F) repräsentieren n = 18 und (G) n = 18 (9*2 vereinte Pflanzen) biologische Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen und mit INCYDE-behandelten Pflanzen sind durch zwei ($P \leq 0,01$) oder drei ($P \leq 0,001$) Sterne gekennzeichnet. Maßstab = 3 cm.

Die Seneszenz wurde durch Zählen der chlorotischen und nekrotischen Blätter in Kontroll- und INCYDE-behandelten Pflanzen zum Zeitpunkt 28 dpi quantifiziert (**Abb. 18 A, B**). Die deutlich erkennbare Reduktion der Seneszenz in INCYDE-behandelten, VI43-infizierten Pflanzen spiegelte sich auch hier wieder. Alle Kontrollen hatten ca. 0,5 chlorotische oder nekrotische Blätter im Mittel. Die Anzahl von chlorotischen und nekrotischen Blättern in infizierten INCYDE- zu Kontroll-behandelten Pflanzen war signifikant reduziert.

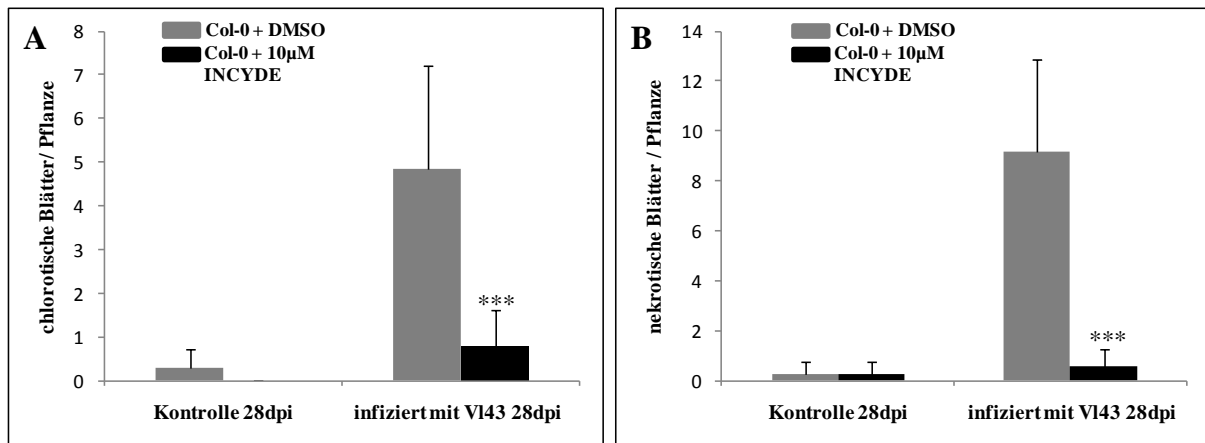


Abb. 18: Bestimmung der Anzahl von chlorotischen und nekrotischen Blättern zum Zeitpunkt 28 dpi in Kontroll (DMSO)- und INCYDE-behandelten Pflanzen, jeweils Kontrolle und mit VI43 infiziert (A, B). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n=18 biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede ($P \leq 0,001$) zwischen Kontrollpflanzen und mit INCYDE-behandelten Pflanzen sind durch drei Sterne gekennzeichnet.

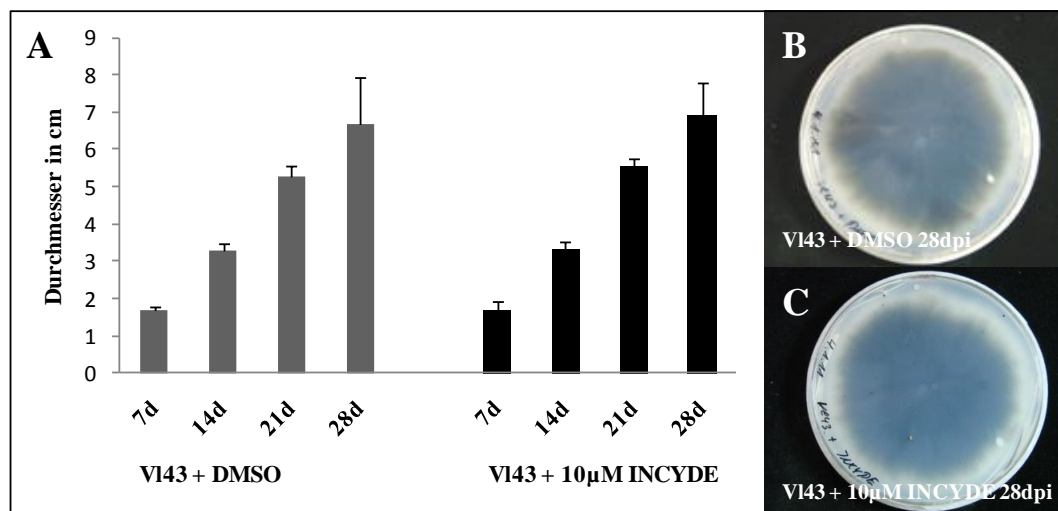


Abb. 19: Wachstumsexperiment von VI43 in Sterilkultur im Zeitverlauf 7, 14, 21 und 28 Tage (d). (A) Die grauen Balken repräsentieren das Wachstum von VI43 mit DMSO und die schwarzen Balken das Wachstum mit 10 µM INCYDE. Es wurde jeweils der Durchmesser der Kolonie bestimmt. (B, C) Fotos von VI43 in Sterilkultur 28 dpi auf Medien mit der jeweiligen Chemikalie. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 4 biologischen Wiederholungen.

Um auszuschließen, dass die gemessene Reduktion der VI43-Proliferation in INCYDE-behandelten Pflanzen auf einem toxischen Effekt des Inhibitors basierte, wurde in sterilen *in vitro*-Experimenten die Toxizität der Substanz getestet. Über einen Zeitraum von 28 Tagen wurde das Koloniewachstum auf CDB-Medium, das DMSO oder 10 µM INCYDE enthielt, durch Messung des Durchmessers von VI43-Kolonien dokumentiert. In beiden Ansätzen kam es zu keinem Unterschied im Koloniewachstum von VI43 (Abb. 19 A). Die Bilder B und C zeigen die VI43-Kolonien auf CDB-Medium mit DMSO oder 10 µM INCYDE zum Zeitpunkt 28 dpi.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass eine Stabilisierung der Cytokinin-Homöostase durch exogene INCYDE-Applikation die Symptomausprägung nach V143-Infektion reduzierte. Die Ergebnisse der INCYDE-Behandlung sind vergleichbar mit dem BAP-Experiment (Kapitel 3.2.5).

3.2.7 Charakterisierung des Infektionsphänotyps von transgenen pSAG12:IPT *A. thaliana* Pflanzen

Neben den pharmakologischen Applikationen mit BAP (Kapitel 3.2.5) und INCYDE (Kapitel 3.2.6) wurde ergänzend ein transgener Ansatz gewählt, um den Effekt der Stabilisierung der Cytokinin-Homöostase auf den Infektionsphänotyp von V143-infizierten *A. thaliana* Pflanzen zu testen.

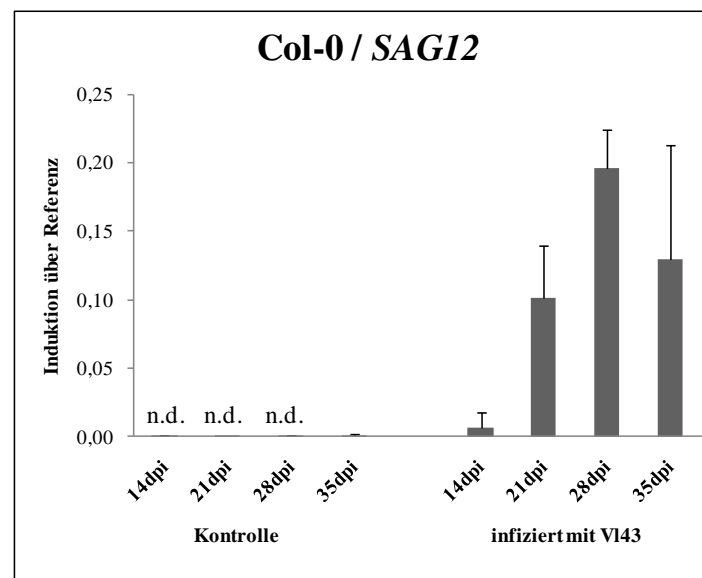


Abb. 20: Quantitative RT-PCR von V143-infizierten und Kontroll- *A. thaliana* Col-0 Pflanzen des *Senescence Associated Genes 12* (*SAG12*). Im Zeitverlauf von 14, 21, 28 und 35 dpi wurden die Pflanzen geerntet. Aufgetragen sind die $\Delta\Delta CT$ -Werte. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von $n = 9$ Pflanzen (3*3 vereinte Proben) aus drei biologischen Wiederholungen.

Dafür wurden stabil transformierte *A. thaliana* Col-0 Wildtyp-Pflanzen erstellt, die die Isopentenyltransferase (*IPT*) von *Agrobacterium tumefaciens* unter Kontrolle des *Senescence Associated Genes 12* (*SAG12*)-Promotors exprimierten (Gan *et al.*, 1995). Genexpressionsanalysen zeigten, dass V143 ab dem Zeitpunkt 14 dpi die Expression von *SAG12* induziert (Abb. 20). In diesem Experiment sollte der V143-induzierten

Cytokininreduktion mit pathogen aktivierter Cytokininproduktion entgegengewirkt werden, so dass die Cytokinin-Homöostase aufrechterhalten wird (Swartzberg *et al.*, 2008).

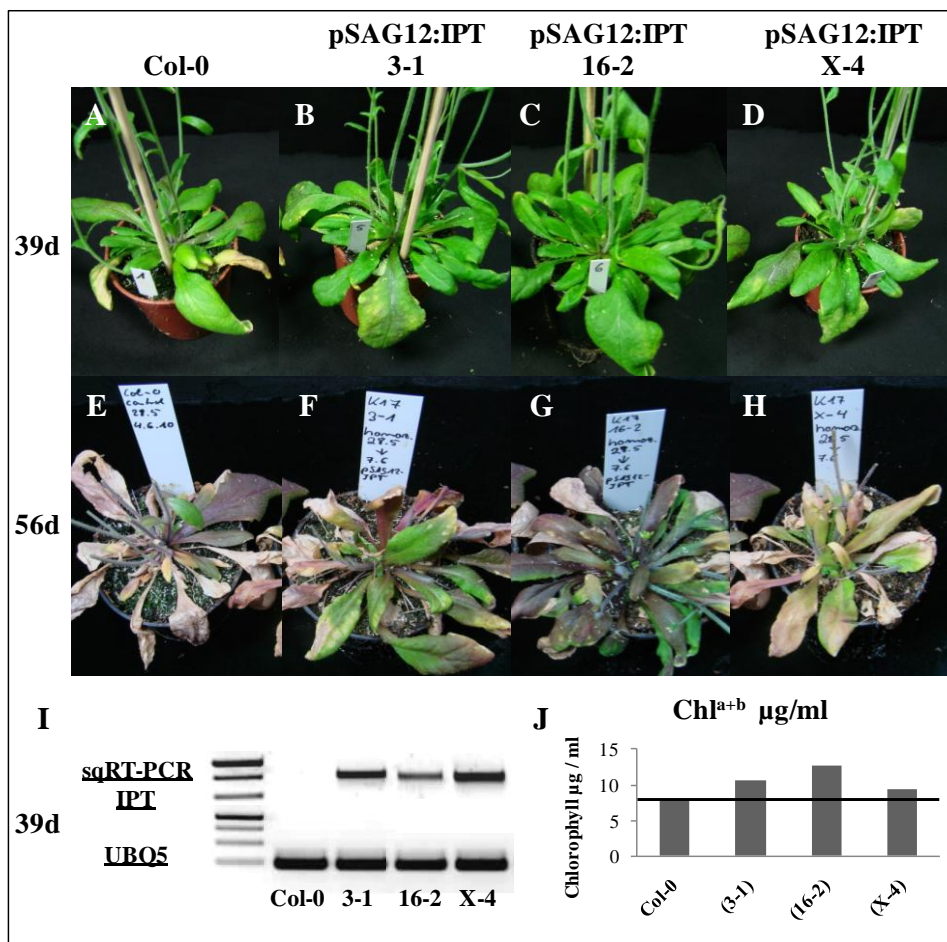


Abb. 21: Phänotypen der transgenen pSAG12:IPT Pflanzen im *A. thaliana* Col-0 Hintergrund zu den Zeitpunkten 39 und 56 dpi unter Langtagbedingungen. (A, E) Phänotyp von Col-0, (B, F) Phänotyp der pSAG12:IPT 3-1 Linie, (C, G) Phänotyp der pSAG12:IPT 16-2 Linie, (D, H) Phänotyp der pSAG12:IPT X-4 Linie. (I) sqRT-PCR des *IPT*-Gens von *A. tumefaciens* der transgenen Linien und Col-0 39 d. Ubiquitin5 diente als Referenz. (J) Bestimmung der Konzentration von Chlorophyll^{a+b} der transgenen Linien im Vergleich zu Col-0 39 d.

Es wurden drei unabhängige, stabil transformierte pSAG12:IPT Linien unter Langtagbedingungen im Zeitraum von 56 Tagen (d) charakterisiert. Dabei sollte vor Beginn der Infektionsexperimente der Effekt der seneszenzinduzierten *IPT*-Expression auf die Seneszenzausprägung in *Arabidopsis* bestimmt werden. Die Phänotypen der pSAG12:IPT Linien sind zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zu Col-0 gezeigt (Abb. 21 A-H). Im Allgemeinen sind die pSAG12:IPT Linien optisch etwas größer und grüner als Col-0 zum Zeitpunkt 39 d (Abb. 21 A-D). Es zeigte sich, dass der Chlorophyll^{a+b}-Gehalt in pSAG12:IPT Linien jeweils höher war als in Col-0 (Abb. 21 J). In der semiquantitativen RT-PCR ist die Expression von *IPT* (*A. tumefaciens*) der transgenen Linien zum Zeitpunkt 39 d im Verhältnis zur Referenz Ubiquitin5 gezeigt (Abb. 21 I). Das Transkript konnte in den ausgewählten

transgenen Linien nachgewiesen werden. Der Abreifungsprozess dauerte in pSAG12:IPT Linien etwa eine Woche länger als in Col-0 (Abb. 21 E-H). Des Weiteren produzierten pSAG12:IPT Pflanzen mehr Seitentriebe. Dies war besonders deutlich in der Linie 16-2 zu erkennen (Abb. 21 G). Diese drei charakterisierten Linien wurden im nächsten Schritt mit VI43 infiziert und der Symptomverlauf dokumentiert sowie die pilzliche DNA Menge bestimmt.

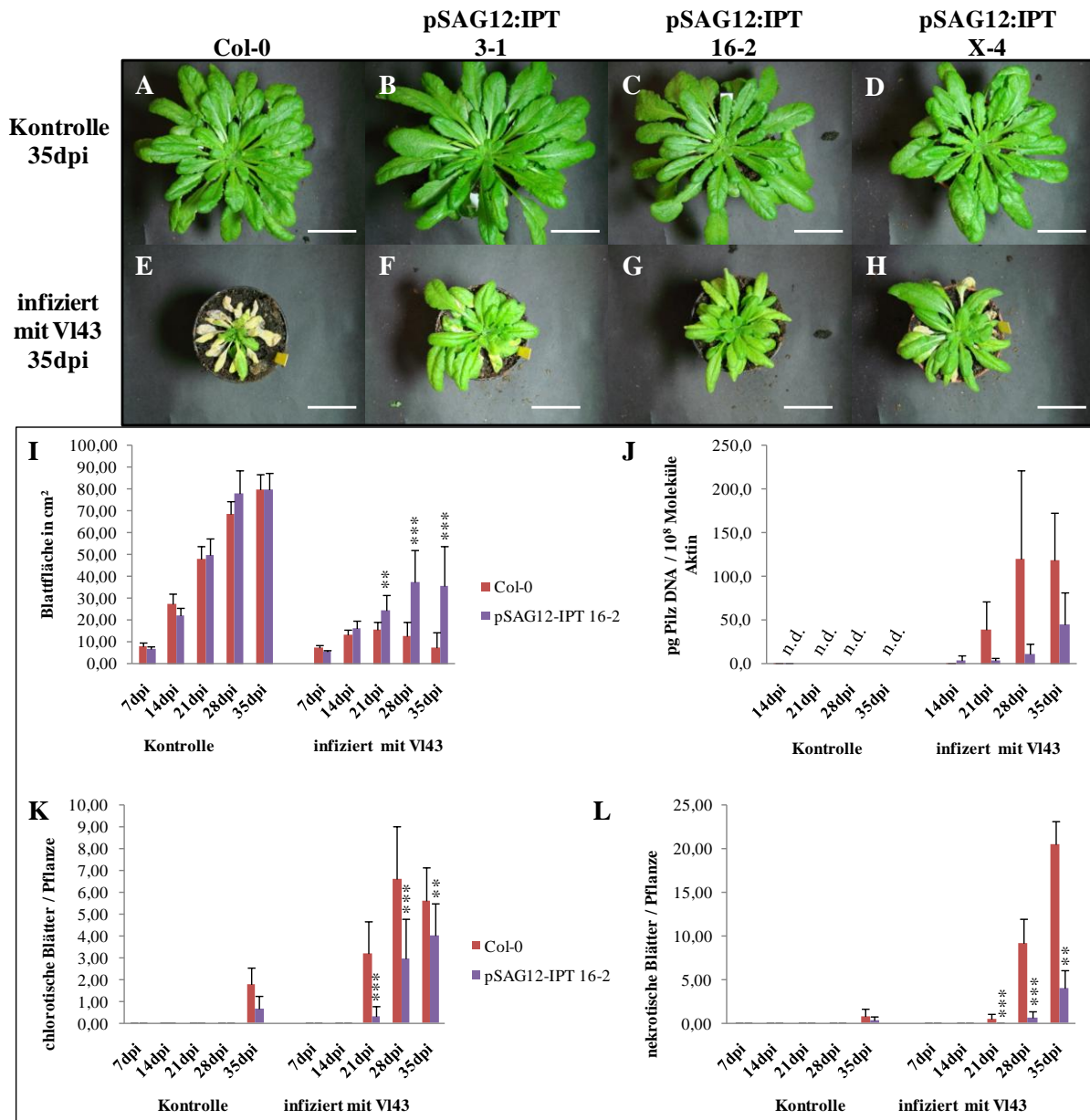


Abb. 22: Phänotypen von Kontroll- und VI43-infizierten *A. thaliana* Col-0 WT-Pflanzen und pSAG12:IPT transgene Linien im Zeitverlauf 7, 14, 21, 28 und 35 dpi unter Kurztagbedingungen. (A, E) Phänotyp von Col-0 Kontrolle und VI43-infiziert 35 dpi, (B, F) Phänotyp der pSAG12:IPT 3-1 Linie Kontrolle und VI43-infiziert 35 dpi, (C, G) Phänotyp der pSAG12:IPT 16-2 Linie Kontrolle und VI43-infiziert 35 dpi, (D, H) Phänotyp der pSAG12:IPT X-4 Linie Kontrolle und VI43-infiziert 35 dpi. (I) Vermessung der Blattfläche, (J) Bestimmung der pilzlichen DNA-Menge, (K) Bestimmung der chlorotischen und (L) der nekrotischen Blätter in Col-0 und pSAG12:IPT 16-2, jeweils Kontrolle und VI43-infiziert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte, mit allgemein $n = 18$ und (J) $n = 9$ (3×3 vereinte Proben) biologische Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch zwei ($P \leq 0,01$) oder drei ($P \leq 0,001$) Sterne gekennzeichnet. Maßstab = 3 cm.

Der Phänotyp der infizierten transgenen Linien entsprach ungefähr dem Phänotyp der pharmakologisch behandelten, infizierten Pflanzen (Kapitel 3.2.5, Kapitel 3.2.6).

Die uninfizierten pSAG12:IPT Pflanzen zeigten im Vergleich zu Col-0 keine Unterschiede im Phänotyp sowie in der Blattfläche im Zeitverlaufsexperiment 7 - 35 dpi unter Kurztagbedingungen (**Abb. 22** A-D, I). In den Graphen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Daten von Col-0 und pSAG12:IPT 16-2 gezeigt (**Abb. 22** I-L) und im Anhang die der Linien 3-1 und X-4 (**Abb. 51**). Die weiteren Linien wiesen die gleiche Tendenz wie die Linie 16-2 auf.

Der Phänotyp der stabil-transformierten pSAG12:IPT Linien zeigte nach VI43-Infektion im Vergleich zu einer normalen Col-0 Infektion 35 dpi auch *stunting* und gerollte Blätter (**Abb. 22** E-H). Die Seneszenz war jedoch deutlich reduziert. Des Weiteren waren die pSAG12:IPT Pflanzen optisch grüner als infizierte Col-0 Pflanzen (**Abb. 22** E-H). Ab 21 dpi war der Blattflächenzuwachs in L16-2 signifikant höher als in Col-0 Pflanzen (**Abb. 22** I). Die Blattflächenreduktion in L16-2 infizierten Pflanzen war mit ca. 58 % geringer als in der Kontrollinfektion mit ca. 90 % zum Zeitpunkt 35 dpi. Die Proliferation von VI43 war auch deutlich beeinträchtigt (**Abb. 22** J).

Zur Quantifizierung der Seneszenz wurde die Anzahl der chlorotischen und nekrotischen Blätter im Zeitverlauf 7 - 35 dpi bestimmt (**Abb. 22** K/L). Im Allgemeinen konnten 35 dpi die ersten chlorotischen und nekrotischen Blätter in den Kontrollen und ab 21 dpi in den infizierten Pflanzen gezählt werden. Die Anzahl von chlorotischen Blättern nahm in infizierten Col-0 Pflanzen von 21 - 35 dpi zu. Eine Zunahme gab es auch in der Linie 16-2, aber signifikant geringer als in Col-0 Pflanzen. Die ersten nekrotischen Blätter traten bei Col-0 infizierten Pflanzen nach 21 dpi auf und wurden mit zunehmender Infektion drastisch mehr. Die Anzahl der nekrotischen Blätter in pSAG12:IPT 16-2 nahm hingegen signifikant geringer zu als in Col-0.

Die Charakterisierung der VI43-infizierten pSAG12:IPT Linien ergab, dass Pathogen-induzierte Synthese von Cytokinin (beginnend ab 14 - 21 dpi (Anhang: **Abb. 50**) zu einer Reduktion der VI43-induzierten Seneszenz führte. pSAG12:IPT Linien zeigten geringere Blattflächenreduktion, eingeschränkte VI43-Proliferation und eine verminderte Bildung von chlorotischen sowie nekrotischen Blättern.

3.3 Charakterisierung der durch *V. longisporum* 43-induzierten Transdifferenzierung von Bündelscheidezellen

Bei der zellbiologischen Charakterisierung einer V143-Infektion in *A. thaliana* Col-0 wurden Transdifferenzierungsprozesse in Blättern beobachtet. Während der Transdifferenzierung wird eine bereits differenzierte Zelle dedifferenziert und differenziert anschließend zu einer Zelle mit neuer Bestimmung (Kapitel 1.10). Bei der V143-induzierten Transdifferenzierung dedifferenzieren Bündelscheidezellen (BSZ) und differenzieren später zu *de novo* Xylemelementen. Diese Art der Transdifferenzierung fand hauptsächlich in Blättern statt und selten transdifferenzierten Epidermiszellen im Übergang der Wurzel zum Hypokotyl. Es ist bekannt, dass *Verticillium*-Infektionen zu morphologischen Änderungen in der Pflanze führen. Diese resultieren auch in der Bildung von zusätzlichen Leitelementen, wie zum Beispiel die durch *V. albo-atrum*-induzierte Bildung von hyperplastischem Xylem in Hopfen (Talboys, 1958). Dieser Prozess, der wahrscheinlich zur Stabilisierung des Wasserhaushaltes der Pflanze dient und auf erhöhter kambialer Aktivität beruht, unterscheidet sich grundlegend von der V143-induzierten Transdifferenzierung. Bei der V143-induzierten *de novo* Xylembildung entstehen neue Leitelemente aus bereits differenzierten Zellen und werden nicht durch eine erhöhte Zellteilungsrate des Kambiums erzeugt.

In den folgenden Untersuchungen wurde die Transdifferenzierung charakterisiert und verschiedene Hypothesen getestet, um dem Prozess eine biologische Relevanz zuordnen zu können. Bei den Hypothesen wurde überprüft, ob die Transdifferenzierung zur Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes der Pflanze, der pilzlichen Proliferation oder der Blockierung der Nährstoffrückgewinnung dient.

3.3.1 Untersuchung des Phänotyps der Transdifferenzierung

Während mikroskopischer Analysen V143-infizierter, Trypan-Blau gefärbter Blätter wurde im *A. thaliana* Col-0 Ökotyp erstmalig der Prozess der Transdifferenzierung von BSZ zu *de novo* Xylem beobachtet. Zum Zeitpunkt 21 dpi war der Transdifferenzierungsphänotyp stark ausgebildet (**Abb. 23 B**). Das ursprüngliche Leitgefäßsystem, bestehend aus Xylem und Phloem, war mit *de novo* Xylemelementen ummantelt. Das Leitbündelsystem von Kontrollpflanzen zeigte im Vergleich keine Transdifferenzierung von BSZ (**Abb. 23 A**). Die transdifferenzierten BSZ scheinen sich strukturell aus zwei Typen von Xylemelementen

zusammensetzen, wobei netzartige Metaxylem (MXL)- und spiralförmige Protoxylem (PXL)-ähnliche Strukturen zu sehen waren (**Abb. 23 B**). Die Vergrößerung einer transdifferenzierten BSZ zeigt sowohl PXL als auch MXL in einer Zelle (**Abb. 23 B1**). Durch die Trypan-Blau Färbung waren auch Hyphen von VI43 angefärbt, die in **Abb. 23 B** durch rote Sterne markiert sind.

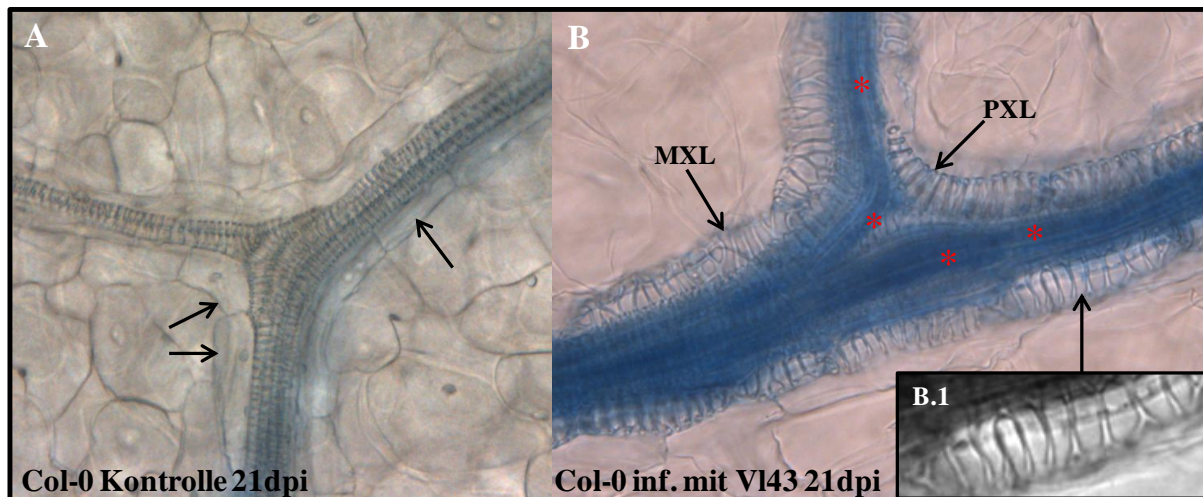


Abb. 23: Transdifferenzierung von BSZ in Trypan-Blau-gefärbte Blätter zum Zeitpunkt 21 dpi. (A) Blattleitgefäßsystem von Col-0; Pfeile markieren die BSZ. (B) VI43-infiziertes Leitgefäßsystem; Pfeile markieren transdifferenzierte BSZ, die Metaxylem (MXL) oder Protoxylem (PXL) ähnliche Strukturen aufweisen. Die Sterne markieren pilzliche Strukturen von VI43. (B.1) Vergrößerung einer transdifferenzierten BSZ.

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ab welchem Zeitpunkt der Infektion der Prozess der Transdifferenzierung beginnt. Dazu wurden im Zeitverlauf von 7 - 28 dpi Trypan-Blau-gefärbte Blätter mikroskopisch untersucht. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden in Graustufen dargestellt, um eine bessere Kontrastierung zum Hintergrund zu gewährleisten. Des Weiteren wurde auf Anhaltspunkte geprüft, welche weiteren Krankheitssymptome durch die Transdifferenzierung ausgelöst werden könnten. Dazu wurde Col-0 mit VI43 im Erdsystem unter Kurztagbedingungen infiziert. Der Infektionsverlauf wurde durch Blattflächenmessung und Frischgewichtsbestimmung in *A. thaliana* Col-0 Pflanzen dokumentiert, wobei der Infektionsphänotyp ab 14 dpi mit kontinuierlich fortschreitendem *stunting* begann (**Abb. 24 Q-R**). Infizierte Pflanzen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen *stunting*, *yellow-veins*, gerollte Blätter ab 14 dpi und verfrühte Seneszenz ab 21 dpi (**Abb. 24 A-D, I-L**). In den mikroskopischen Aufnahmen ist ausschnittsweise und repräsentativ das Leitgefäßsystem eines *A. thaliana* Blattes gezeigt. 7 dpi gab es keinen Unterschied zwischen der Kontrolle und dem Infektionsansatz (**Abb. 24 E, M**). Ab 14 dpi wurden die ersten transdifferenzierten BSZ in infizierten Pflanzen beobachtet (**Abb. 24 N**), deren Anzahl mit zunehmendem Infektionsverlauf anstieg (**Abb. 24 O, P**).

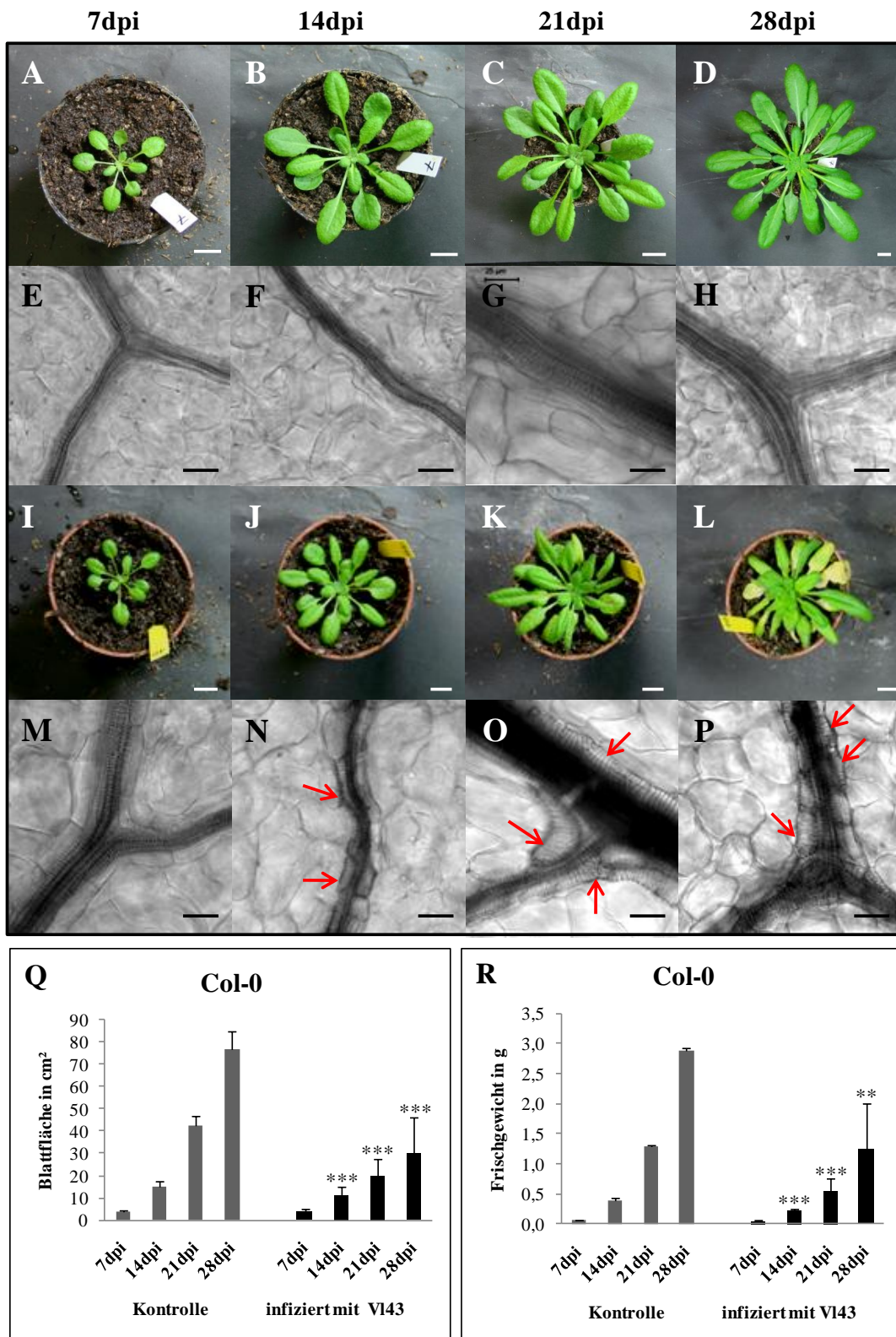


Abb. 24: Symptomausprägung und Transdifferenzierungsverlauf von VI43-infizierten *Arabidopsis thaliana* Col-0 WT-Pflanzen (im Zeitverlauf 7, 14, 21 und 28 dpi) unter Kurztagbedingungen. (A-D) Kontroll-Pflanzen 7-28 dpi, (E-H) Leitgefäßsystem der Kontrollblätter 7 - 28 dpi, (I-L) VI43-infizierte Pflanzen 7 - 28 dpi und (M-P) Leitgefäßsystem der VI43-infizierten Blätter 7 - 28 dpi. Pfeile zeigen transdifferenzierte Bündelscheidenzellen (BSZ). (Q) Vermessung der Blattfläche und (R) des Frischgewichtes von Kontroll- und VI43-infizierten Pflanzen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte mit $n = 18$ biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch zwei ($P \leq 0,01$) oder drei ($P \leq 0,001$) Sterne gekennzeichnet. Maßstab der Pflanzenfotos = 1 cm und Maßstab der Leitgefäßbilder = 25 μ M.

In gleichmäßig infizierten und Krankheitssymptom-zeigenden Pflanzen ist 28 dpi nahezu das komplette BSZ-System der Pflanze transdifferenziert (**Abb. 24 L, P**). In den Kontrollpflanzen konnte zu keinem Zeitpunkt Transdifferenzierung beobachtet werden (**Abb. 24 E-H**).

Interessanterweise begannen *stunting*, der Phänotyp des Blattrollens und die Ausbildung des *yellow vein*-Symptoms parallel zu der Transdifferenzierung und scheinen damit zu korrelieren (**Abb. 25 B/B1**). Kontrollpflanzen zeigten zu diesem Zeitpunkt keinerlei Veränderung der Blattstruktur (**Abb. 25 A/A1**). In der Ausschnittsvergrößerung einer infizierten Pflanze 21 dpi ist im Vergleich zum Zeitpunkt 14 dpi ein ausgeprägteres *yellow vein*-Symptom gezeigt (**Abb. 25 B/B1, C**).

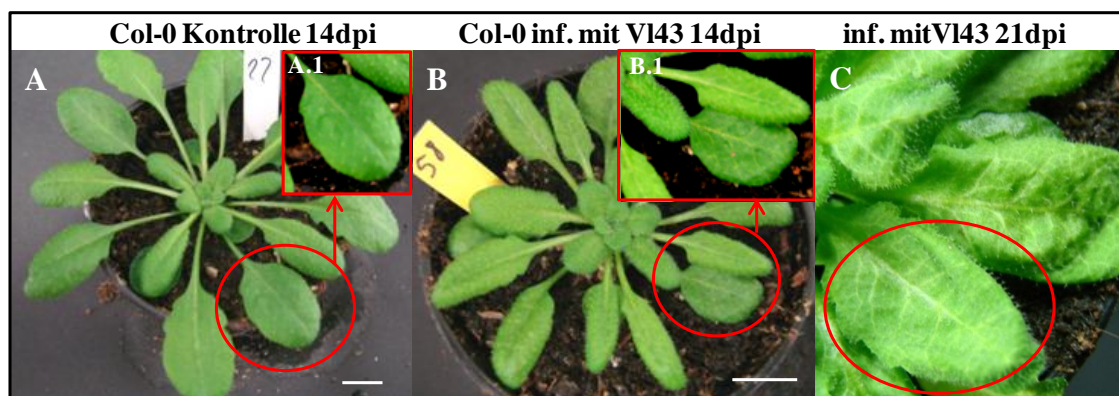


Abb. 25: Yellow vein-Symptom. (A) *A. thaliana* Col-0 WT Kontrollpflanze 14 dpi; (A.1) Blattvergrößerung. (B) VI43-infizierte Pflanze 14 dpi; (B.1) Blattvergrößerung zeigt Yellow vein-Symptom. (C) Blattvergrößerung mit stark ausgeprägten *yellow vein*-Symptom (21 dpi). Maßstab der Pflanzenfotos = 1 cm.

In einer folgenden Analyse wurde zum Zeitpunkt 21 dpi das Leitgefäßsystem der Mittelrippe VI43-infizierter Blätter von *A. thaliana* detailliert auf ektopische Xylembildung untersucht. Für die anatomische Untersuchung wurde das Experiment in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Polle durchgeführt. Dr. C. Drübert (AG Polle) fertigte von Kontroll- und infizierte Pflanzen zum Zeitpunkt 21 dpi Querschnitte des Leitgefäßsystems an, die anschließend mit Toluidin-Blau gefärbt wurden. Toluidin-Blau färbt unverholztes Gewebe violett und verholzte beziehungsweise lignifizierte Strukturen türkis-blau an.

In den Abbildungen sind repräsentativ Querschnitte des Leitgefäßsystems der Mittelrippe zu sehen, wobei das Leitgefäßsystem einer Kontrollpflanze im Vergleich zu dem einer VI43-infizierten Pflanze abgebildet ist (**Abb. 26**). In der Kontrolle umgibt parenchymatisches Gewebe das Leitgefäßsystem, das sich folgendermaßen von abaxial nach adaxial gliedert: Phloem, Kambium, Xylem und BSZ (**Abb. 26 A**). In 21 dpi infizierten Pflanzen waren zwei Veränderungen im Aufbau zu beobachten: Im Xylemabschnitt wurde viel hyperplastisches

Xylem (HX) gebildet und es transdifferenzierten BSZ *de novo* zu Xylemelementen (**Abb. 26 B**). Die Autofluoreszenz der transdifferenzierten Zellen zeigt im Vergleich zur Kontrolle, dass das neugebildete Xylem stark lignifiziert ist (**Abb. 26 B, C**). Pfeile markieren die transdifferenzierten BSZ, deren Struktur netzartig ist.

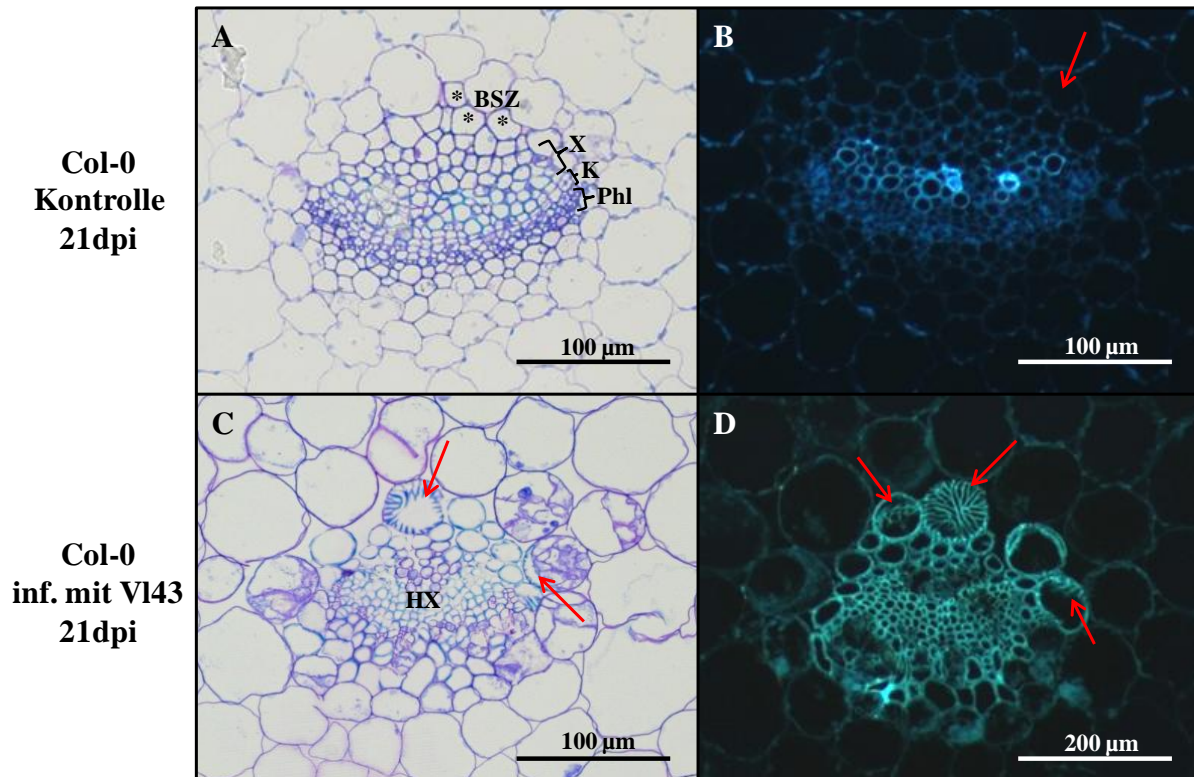


Abb. 26: Toluidin-Blau-gefärbtes Leitgefäßsystem der Mittelrippe von *A. thaliana* Col-0 WT Kontroll- und mit VI43-infizierte Pflanzen. (A) Leitgefäßsystem der Mittelrippe der Kontrolle 21 dpi und (B) Darstellung der Autofluoreszenz; Pfeile, Sterne markieren BSZ. (C) Leitgefäßsystem der Mittelrippe eines VI43-infizierten Blattes 21 dpi mit hyperplastischem Xylem (HX), transdifferenzierten BSZ und (D) Autofluoreszenz; Pfeile markieren transdifferenzierte BSZ. Maßstab in (A-C) = 100 µm und 200 µm in (D). Abkürzungen: BSZ (Bündelscheidezellen), K (Kambium), Phl (Phloem), X (Xylem).

Abschließend wurde mittels einer transgenen 35S:MAP4-GFP Reporterlinie infizierte Pflanzen auf ektopische Xylembildung untersucht. Bei *MAP4* handelt es sich um ein *Microtubule Associated Protein 4* aus der Maus, das durch Fusion mit GFP das Mikrotubulisystem markiert (Marc *et al.*, 1998). Mit dieser Linie besteht die Möglichkeit, transdifferenzierende Zellen in einem kurzen Zeitfenster *in vivo* zu visualisieren, da die Mikrotubuli an der Strukturgebung der Xylemelemente maßgeblich involviert sind. Im ersten Schritt kommt es zu einer Neuorientierung der Mikrotubuli, die den Cellulose-Synthase-Komplex leiten. Abschließend werden sekundäre Zellwandverdickungen eingelagert, bis die Zelle Apoptose durchläuft (Wightman und Turner, 2008). Es wurde die Epidermisschicht der ganzen Pflanze auf ektopische Transdifferenzierung untersucht. Eine Analyse tieferliegender Zellen im Hypokotyl oder in Blättern (Ebene des Xylems) war nicht möglich, da das

Probenmaterial für *laser scanning*-Mikroskopie zu dick war und deshalb unscharf erschien. In Blatt- oder Wurzelepidermiszellen konnte keine Veränderung gefunden werden. Lediglich im Übergangsbereich der Wurzel zum Hypokotyl wurde zum Zeitpunkt 14 dpi Transdifferenzierung von Epidermiszellen beobachtet (Abb. 27 A, B). Die Pfeile markieren ektopisch gebildet Xylemelemente, deren Struktur spiralförmig ist.

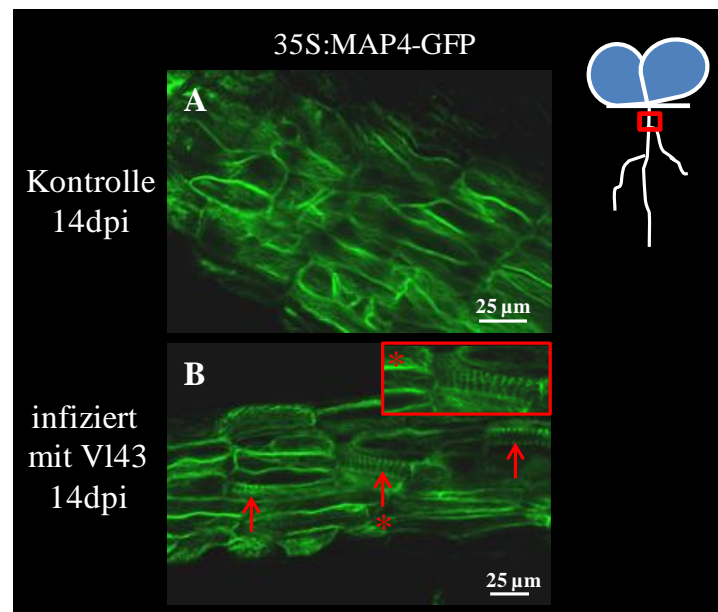


Abb. 27: GFP-Fluoreszenz der Mikrotubuli des Überganges von Wurzel zu Hypokotyl in *A. thaliana* Col-0 35S:MAP4-GFP Kontroll- und V143-infizierten Pflanzen 14 dpi. (A) Epidermisschicht der Kontrolle, (B) Epidermisschicht der V143-infizierten Pflanze; Pfeile markieren transdifferenzierte Epidermiszellen und der Stern zeigt eine Ausschnittsvergrößerung. Maßstab = 25 μ m.

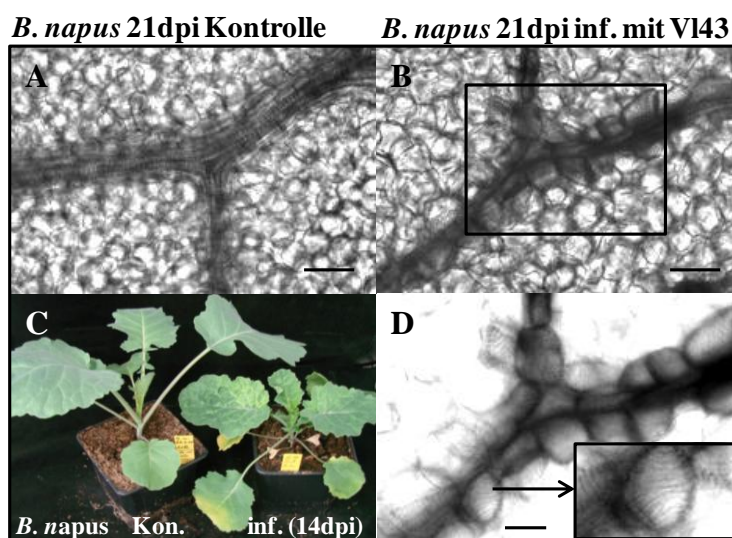


Abb. 28: (C) Mit V143-infizierte *Brassica napus* Pflanze im Vergleich zur Kontrolle 14 dpi. (A) Blattleitgefäßsystem einer *B. napus* Kontroll-Pflanze 21dpi und (B) einer V143-infizierten. (D) Vergrößerung des Ausschnittes aus B mit transdifferenzierten BSZ. (A, B) Maßstab = 50 μ m und (D) Maßstab = 25 μ m.

Zur Kontrolle des in *A. thaliana* beobachteten Transdifferenzierungsprozesses wurde der *V. longisporum* 43 Hauptwirt *B. napus* (Drakkar) mit VI43 infiziert. Dabei sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Transdifferenzierung um ein Artefakt handelt, das nur in der Interaktion VI43 mit *Arabidopsis* auftritt. *B. napus* wurde wie *A. thaliana* mit der *uprooting*-Methode infiziert und abweichend von den vorher beschriebenen Infektionsuntersuchungen, unter Langtagbedingungen kultiviert.

In **Abb. 28 C** ist links eine *B. napus* Kontroll- und rechts eine VI43-infizierte Pflanze gezeigt, die unter Laborbedingungen eine vergleichbare Symptomatik (*stunting*, Chlorose und *yellow veins*) wie infizierte *A. thaliana* Pflanzen ausbildete. Bei Betrachtung des Leitgefäßsystems einer infizierten Pflanze im Vergleich zur Kontrolle ließ sich auch in *B. napus* eine Transdifferenzierung von BSZ *de novo* zu Xylem beobachten (**Abb. 28 A, B, D**). Die Zeitverläufe der Transdifferenzierung in *B. napus* und *A. thaliana* Col-0 waren unter Laborbedingungen ähnlich.

Die Beobachtungen der vorausgehenden Abschnitte lassen sich wie folgt zusammenfassen: Während einer VI43-Infektion wurden in verschiedenen Zelltypen (BSZ und Epidermiszellen) Transdifferenzierungsprozesse induziert, die zu *de novo* Xylem-Bildung führten. Diese liefen sowohl in *A. thaliana* als auch im Hauptwirt *B. napus* ab.

3.3.2 Genetischer Mechanismus der Transdifferenzierung

Es sollte geklärt werden, in wie weit die genetischen Mechanismen, der in Kapitel 3.3.1 gezeigten Transdifferenzierung von BSZ zu *de novo* Xylem, denen der normalen Xylementwicklung entsprechen. Bei normaler Differenzierung spielen verschiedene hormonelle sowie genetische Prozesse eine wichtige Rolle. Kubo *et al.* (2005) konnten mittels einer *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur sieben Transkriptionsfaktoren identifizieren, die als *Vascular Related Nac-Domain`s* VNDS bezeichnet werden. In der *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur ist Transdifferenzierung vergleichbar induzierbar, wie in dem *Zinnia* Modell-System. Zwei dieser Faktoren sind wahrscheinlich die Regulatoren von Proto- (VND7) und Metaxylembildung (VND6). Überexpression von VND1 - VND5 in *Arabidopsis* führte zu keinem Phänotyp; hingegen bewirkte Überexpression von VND6 und VND7 ektopische Transdifferenzierung von vielen Zelltypen, wie Epidermiszellen (nur im Hypokotyl und Blatt), Parenchymzellen, Bündelscheidezellen, Endodermiszellen und

anderen. Transdifferenzierte Zellen, die entweder durch Überexpression von *VND6* bzw. *VND7* induziert wurden, weisen typischerweise entweder eine netzartige Metaxylem-ähnliche (*VND6*) bzw. eine spiralförmige Protoxylem-ähnliche (*VND7*) Struktur auf. Ausschaltung der *VND*-Gene resultierte in keinem Phänotyp. Über die Fusion von *VND6* und *VND7* an eine Repressionsdomäne (SRDX-Domäne) gelang der Arbeitsgruppe von Prof. T. Demura der Nachweis, dass *VND6* für Metaxylembildung und *VND7* für Protoxylembildung wichtig ist. Da *V. longisporum 43* in der Pflanze Transdifferenzierungsprozesse induziert, wurden mittels quantitativer RT-PCR die Expressionsprofile sämtlicher *VNDs* überprüft. Dadurch sollte ein Eindruck gewonnen werden, ob hier die gleichen Mechanismen wie bei natürlicher Differenzierung eine Rolle spielen. Das Probenmaterial stammte aus Erdinfektionsversuchen unter Kurztagbedingungen (im Zeitverlauf 7 - 28 dpi). In **Abb. 29** sind die Expressionsprofile von *VND6* und *VND7* dargestellt. Die Profile der Transkriptionsfaktoren *VND1-VND5* sind im Anhang (**Abb. 52**) zu finden, da ihnen in der Literatur noch keine spezifische Rolle zugeordnet werden konnte und deshalb ihre Rolle für die Xylemdifferenzierung ungeklärt ist.

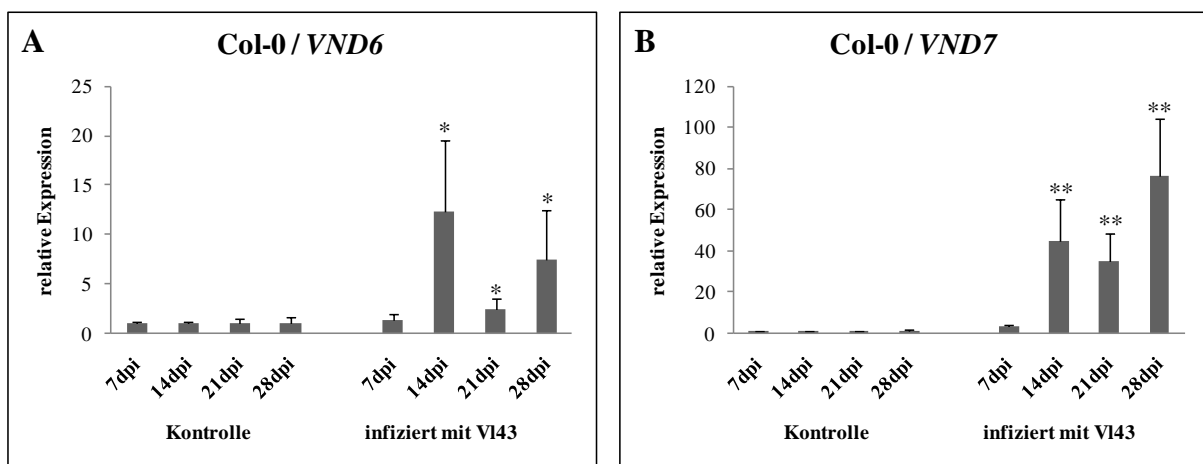


Abb. 29: Quantitative RT-PCR von V143-infizierten und Kontrollpflanzen der folgenden *Vascular Related Nac Domain* (VND) Transkriptionsfaktoren: (A) *VND6* und (B) *VND7* im Ökotyp Col-0. Im Zeitverlauf von 7, 14, 21 und 28 dpi wurden die Pflanzen geerntet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 9 Pflanzen (3*3 vereinte Proben) aus drei biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch einen ($P \leq 0,05$) oder zwei ($P \leq 0,01$) Sterne gekennzeichnet.

Beide *VNDs* zeigten eine Induktion im Infektionsansatz, die mit dem Transdifferenzierungsverlauf korrelierte. *VND6* war ab 14 dpi leicht aber signifikant hochreguliert und hatte ein Maximum von ca. 12-fach zum Zeitpunkt 14 dpi (**Abb. 29 A**). Die Transkriptmenge von *VND7* hingegen war vergleichbar mit *VND6* erhöht, aber deutlich stärker mit einer Signifikanz $P \leq 0,01$ zu allen Zeitpunkten ab 14 dpi (**Abb. 29 B**).

Zur Klärung, ob die starke Induktion von *VND7* mit der Transdifferenzierung korreliert, wurde die Lokalisation und Aktivität mit einem Promotor *VND7* Reporter GUS-Konstrukt bestimmt (Kubo *et al.*, 2005). Das Probenmaterial stammte aus Erdinfektionsversuchen unter Kurztagbedingungen und wurde für die relative GUS-Aktivitätsbestimmung im Zeitverlauf 7 - 28 dpi geerntet. Histologischen Untersuchungen wurden zu den Zeitpunkten 7 und 14 dpi durchgeführt. In den Kontrollen wurde zu beiden Zeitpunkten eine leichte GUS-Färbung im Leitgefäßsystem beobachtet (Abb. 30 A, C). Die BSZ zeigten dabei keine GUS-Aktivität. In VL43-infizierten Pflanzen war im Allgemeinen die GUS-Färbung im Leitgefäßsystem deutlich stärker (Abb. 30 B, D). Interessanterweise gab es 7 dpi eine deutliche Färbung in BSZ (markiert durch Pfeile) (Abb. 30 B). Diese Lokalisation war auch noch mit abgeschwächter Intensität 14 dpi in transdifferenzierten BSZ zu sehen (Abb. 30 D). Zu allen Zeitpunkten konnte in infizierten Pflanzen eine starke GUS-Aktivität gemessen werden, die ca. doppelt so stark war wie in den Kontrollen (Abb. 30 E).

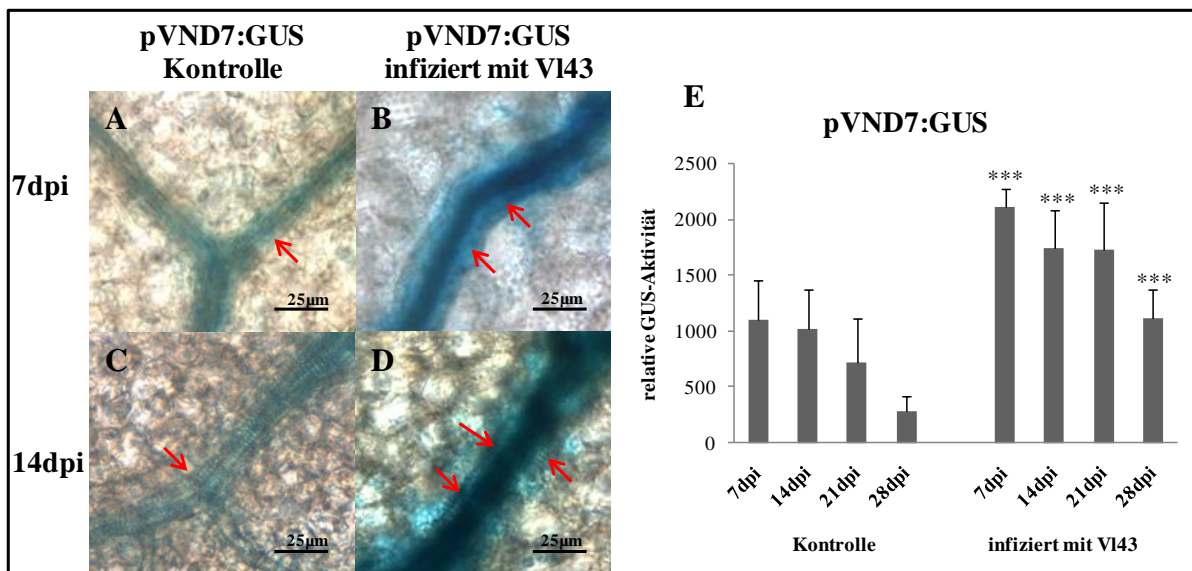


Abb. 30: Histologische GUS-Färbung und Aktivitätsbestimmung von *A. thaliana* Col-0 pVND7:GUS Kontroll- und VL43-infizierten Pflanzen im Zeitverlauf 7, 14, 21 und 28 dpi. (A, C) GUS-gefärbtes Blattleitgefäßsystem der Kontrolle 7 und 14 dpi; Pfeile markieren BSZ. (B, D) GUS-gefärbtes Blattleitgefäßsystem der VL43-infizierten Pflanzen. In (B) markieren die Pfeile gefärbte BSZ und in (D) transdifferenzierte BSZ mit Restfärbung. (E) Vermessung der relativen Gus-Aktivität im Kontroll- und Infektions-Ansatz 7 -28 dpi. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 8 Pflanzen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch drei ($P \leq 0,001$) Sterne gekennzeichnet. Maßstab = 25 μ m.

Aus der Literatur war bekannt, dass *Asymmetric Leaves2-Like19* (*ASL19*) und *ASL20* in einer *feedback*-Schleife mit *VND6* und *VND7* wirken (Soyano *et al.*, 2008). Sie greifen somit regulatorisch in die Xylemdifferenzierung ein. Zur Kontrolle wurde auch von diesen beiden Genen die Expression bestimmt, um zu überprüfen, ob sie in VL43-infizierten Pflanzen induziert sind.

Die Expressionsanalysen beider Gene verhalten sich ähnlich wie *VND6* und *VND7* mit einer Transkripterhöhung ab 14 dpi (**Abb. 31**). *ASL19* war im Zeitverlauf in VI43-infizierten Pflanzen relativ stark von 30-fach 21 dpi bis ca. 60-fach 28 dpi induziert (**Abb. 31 A**). *ASL20* hingegen war ab 14 dpi kontinuierlich konstant mit 30 - 40-fach über der Kontrolle hochreguliert (**Abb. 31 B**).

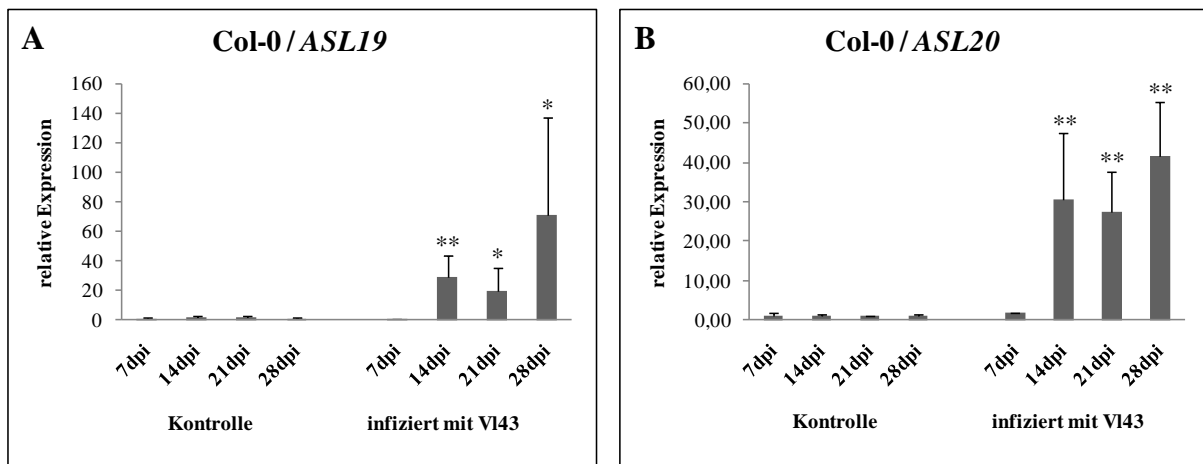


Abb. 31: Quantitative RT-PCR von VI43-infizierten und Kontrollpflanzen der folgenden *Asymmetric Leaves2-Like* (*ASL*) Gene: (A) *ASL19* und (B) *ASL20* im Ökotyp Col-0. Im Zeitverlauf von 7, 14, 21 und 28 dpi wurden die Pflanzen geerntet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte der Standardabweichung von n = 9 Pflanzen (3*3 vereinte Proben) aus drei biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch einen ($P \leq 0,05$) oder zwei ($P \leq 0,01$) Sterne gekennzeichnet.

Die Ergebnisse des Kapitels 3.3.2 zeigen, dass der VI43-induzierte Transdifferenzierungsprozess (Kapitel 3.3.1) mit den Expressionsprofilen der Transkriptionsfaktoren *VND6*, *VND7* und *ASL19*, *ASL20* korreliert. Unterstützt werden die Daten durch die GUS-Lokalisation von pVND7:GUS in BSZ ab 7 dpi und entsprechender GUS-Aktivitätsbestimmung. Dementsprechend scheint der genetische Mechanismus der Transdifferenzierung vergleichbar mit dem der normalen Xylementwicklung zu sein.

3.3.3 Einfluss der Transdifferenzierung auf die Proliferation von VI43

In diesem Kapitel wird untersucht, ob VI43 die *de novo* Xylemelemente (Kapitel 3.3.1) aktiv induziert, um sie für eine bessere Proliferation in der Pflanze zu nutzen. Zur Klärung wurden drei unterschiedliche experimentelle Ansätze überprüft:

Im ersten Ansatz wurde eine Überexpressionslinie von *VND7* benutzt, bei der verschiedene Zelltypen ektopisch in Xylemelemente transdifferenzierten (Kubo *et al.* 2005). Die Linie zeigte einen deutlichen Zwergwuchsphänotyp durch Störung der Zellelongation. Mit ihr sollte

überprüft werden, wie sich die Proliferation von V143 und Symptomatik durch ektopische Xylembildung verändert.

Im zweiten Ansatz wurde in einem Zellkultur-Transdifferenzierungssystem getestet, inwieweit Ethylacetat, n-Butanol Extrakte einer V143-Flüssigkultur, Überstände von *Potato Dextrose Broth* (PDB-) und *Czapek Dox Broth* (CDB)-Medium einer V143-Flüssigkultur, *Brassica napus* Xylemsaft sowie apoplastische Waschflüssigkeit (AWF) infizierter Pflanzen und *A. thaliana* AWF V143-infizierter Pflanzen aktiv Transdifferenzierung auslösen können.

Der dritte Ansatz nutzt Lokalisationsstudien von V143 in infiziertem Blattmaterial zum Zeitpunkt 28 dpi, insbesondere in BSZ nach Trypan-Blau-Färbung.

3.3.3.1 Symptomausprägung in 35S:VND7 Linien nach V143-Infektion

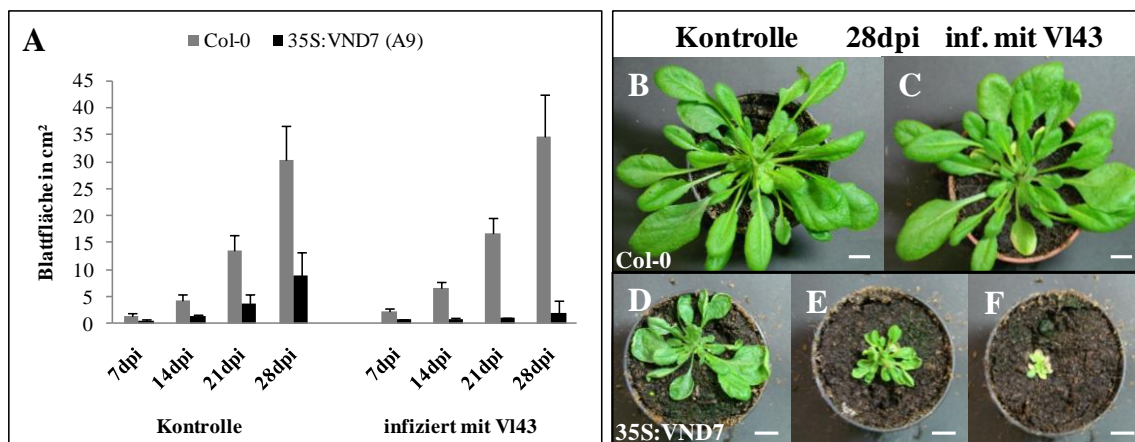


Abb. 32: Phänotypen von Kontroll- und V143-infizierten *A. thaliana* Col-0 WT-Pflanzen und einer 35S:VND7 transgenen Linie (Col-0 Hintergrund) (im Zeitverlauf 7, 14, 21, 28 dpi) unter Kurztagbedingungen. Die Pflanzen wurden im sterilen Platten-System inokuliert und in Erde pikiert. (A) Vermessung der Blattfläche beider Linien im Kontroll- und Infektionsansatz. (B) Col-0 Kontrolle 28 dpi und (C) Col-0 mit V143 infiziert. (D) 35S:VND7 Kontrolle 28 dpi und (E, F) mit V143-infizierte 35S:VND7 Pflanzen 28dpi. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 18 biologischen Wiederholungen. Maßstab = 1 cm.

In diesem Experiment sollte untersucht werden, inwieweit eine ektopische Xylembildung für die *Verticillium*-Proliferation von Vorteil ist. Um einen direkten Vergleich ziehen zu können wurde das Infektionssystem für die folgenden Untersuchungen modifiziert. Die Penetration der *Arabidopsis*-Wurzel sollte dabei nicht durch Verletzung, sondern natürlich ablaufen. Dafür wurden die Pflanzen unter Sterilbedingungen angezogen, die Wurzeln mit Sporen besprüht und 96 hpi in Erde transferiert, ohne sie stark mechanisch zu verletzen. Im Zeitverlauf von 7 - 28 dpi wurde der Krankheitsverlauf mittels Blattflächenmessung und durch Fotos dokumentiert.

In diesem Infektionssystem waren die Pflanzen generell kleiner als im Erdinfektionssystem. V143-infizierte Col-0 Pflanzen hatten im Vergleich zur Kontrolle eine sehr geringe Symptomausprägung zum Zeitpunkt 28 dpi (**Abb. 32 B/C**). Diese Pflanzen zeigten kein *stunting* und geringe Seneszenz mit Bildung einiger chlorotischer Blätter. Im Blattflächenzuwachs waren keine Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Col-0 Pflanzen aufgrund des geringen *stuntings* vorhandenen (**Abb. 32 A**). Die Überexpressionslinie 35S:VND7 zeigte von Beginn an in der Kontrolle Zwergwuchs mit einem späteren Unterschied zu Col-0 von ca. 70 % zum Zeitpunkt 28 dpi (**Abb. 32 A, D**). Nach Infektion mit V143 kam es zu einer dramatischen Symptomausprägung in den Überexpressionslinien. Die Pflanzen zeigten mittleres bis starkes *stunting* und fortgeschrittene Seneszenz zum Zeitpunkt 28 dpi (**Abb. 32 E/F**). Die Analyse der Blattflächen ergab, dass die Überexpressionslinie nach V143-Infektion eine Blattflächenreduktion von ca. 77 % im Vergleich zur Kontrolle aufwies, während die Wildtyp-Pflanzen keine Reduktion zeigten (**Abb. 32 A**).

35S:VND7 infiziert mit V143

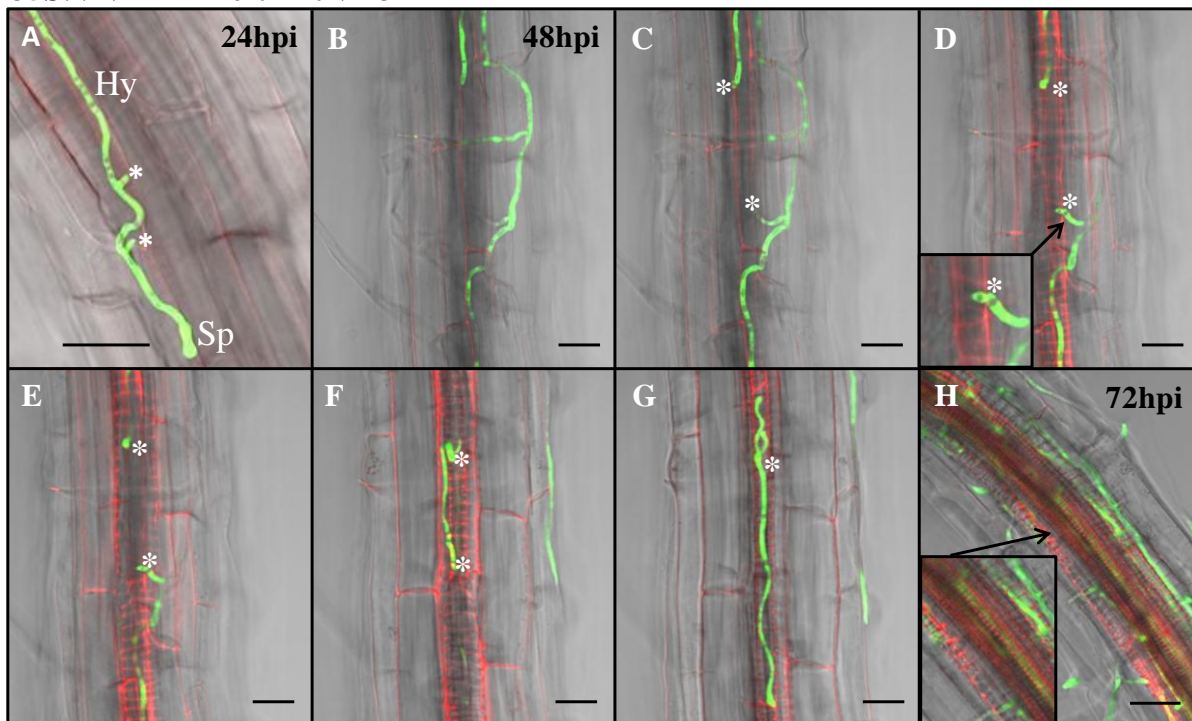


Abb. 33: Infektionsverlauf von V143-GFP auf 35S:VND7 *A. thaliana* Wurzeln im sterilen Platten-System. Wurzeln wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Gezeigt ist der Zeitverlauf von 24, 48 und 72 hpi. Sterne zeigen jeweils Penetrationsabläufe. (A) Gekeimte Spore, deren Hyphe zwei Penetrationsstrukturen ausgebildet hat 24 hpi. (B-G) Pilzliche Proliferation durch verschiedene Zellschichten, die zu Protoxylem transdifferenzierten 48 hpi. (H) V143-GFP wächst im Leitgefäßsystem der Wurzel-Differenzierungszone 72 hpi. Abkürzungen: Sp (Spore), Hy (Hyphe). Maßstab =25 μ M

In Kapitel 3.1 wurde der Infektionsverlauf von V143 in Col-0 Wurzeln zellbiologisch charakterisiert. Dieser sollte mit dem Infektionsverlauf in 35S:VND7-Wurzeln verglichen

werden, der parallel mikroskopiert wurde. Zur Gegenüberstellung wurde die Differenzierungszone der Wurzel betrachtet, da dort starke ektopische Xylembildung stattgefunden hat. Das Parenchym, die Endodermis und Zellen des Zentralzylinders zeigten Transdifferenzierung, während die Epidermis nicht betroffen war. Zu den Zeitpunkten 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi ist der Infektionsverlauf von VI43 in 35S:VND7-Wurzeln repräsentativ gezeigt (**Abb. 33**). Für eine bessere Visualisierung sind die Aufnahmen als *overlay* (Fluoreszenzkanäle plus Durchlichtkanal) dargestellt. Nach 24 hpi keimten die Sporen und bildeten, vergleichbar mit Col-0, erste Penetrationsstrukturen aus (**Abb. 33 A**). 48 hpi war die Proliferation deutlich vorangeschritten und weiter ausgeprägt als bei Col-0 (**Abb. 33 B-G**). Gezeigt sind von oben nach unten mehrere Ebenen einer Maximalprojektion. Sterne markieren in den Abbildungen den Hyphenverlauf. Bereits 48 hpi bewuchs VI43 in 35S:VND7 nach erfolgreicher Penetration drei Zellschichten: Epidermis (**Abb. 33 B-D**) und zwei transdifferenzierte Parenchymzellen (**Abb. 33 E-G**). Im Allgemeinen war VI43 zu diesem Zeitpunkt in Col-0 nur in der Epidermis nachzuweisen und in seltenen Fällen auch in der ersten Zellschicht des Kortex zu beobachten. Bereits nach 72 hpi hatte VI43 das Leitgefäßsystem der Differenzierungszone erreicht (**Abb. 33 H**). Im deutlichen Gegensatz hierzu wurde in Col-0 Wildtyppflanzen generell ein Proliferationsarrest an der Endodermis beobachtet.

Die vermehrte Proliferation von VI43 in 35S:VND7 Wurzeln konnte auch deutlich durch den oberflächlichen Hyphen-Bewuchs der Wurzeln gezeigt werden. In den Übersichtsaufnahmen sind VI43-infizierte Col-0 und 35S:VND7 Wurzeln zu den Zeitpunkten 24 hpi und 48 hpi abgebildet. 24 hpi gab es noch keinen Unterschied zwischen Col-0 und der Überexpressionslinie (**Abb. 34 A, B**). 48 hpi später hingegen war 35S:VND7 optisch deutlich stärker überwachsen als Col-0 (**Abb. 34 C, D**).

Die Analysen der 35S:VND7-Linie zeigen, dass sich VI43 durch ektopisch gebildetes Xylem in 35S:VND7 Wurzeln schneller und stärker ausbreiten kann als in Col-0 Wurzeln. Hauptverantwortlich ist dafür möglicherweise die teilweise fehlende Endodermiszellschicht.

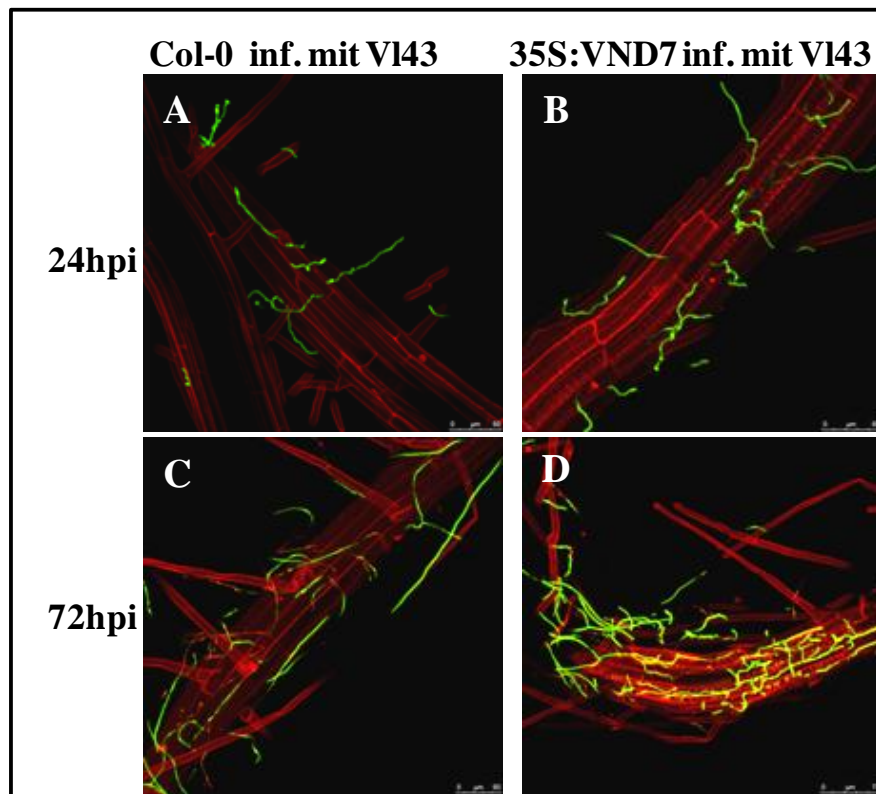


Abb. 34: Oberflächliche Proliferation von VI43-GFP auf *A. thaliana* Col-0 und 35S:VND7 Wurzeln im sterilen Platten-System zu den Zeitpunkten 24 hpi und 72 hpi. Wurzeln wurden mit Propidiumiodid gefärbt. (A, C) Oberflächliche Proliferation auf Kontrollwurzeln und (B, D) oberflächliche Proliferation auf 35S:VND7 Wurzeln.

3.3.3.2 Analyse verschiedenster "Pilzfaktoren" auf Transdifferenzierungsaktivität

In diesem Experiment wurden "Pilzfaktoren" auf ihre Fähigkeit untersucht, aktiv Transdifferenzierung in *Arabidopsis* und Tabak- Zellsuspensionskulturen auszulösen oder die Transdifferenzierungsrate zu erhöhen (Kubo *et al.*, 2005). Bei den "Pilzfaktoren" handelt es sich um apoplastische Waschflüssigkeit (AWF) einer Col-0 VI43-Infektion, um AWF sowie Xylemsaft (XS) einer *B. napus* VI43-Infektion, um Überstände von VI43-Flüssigkulturmedien (CDB und PDB) und um Ethylacetat- und n-Butanol-Extrakten einer VI43-Flüssigkultur. Der Xylemsaft wurde von 21 dpi alten *B. napus* Pflanzen gewonnen, in dem die Pflanze über dem Hypokotyl abgeschnitten wurde. Anschließend wurden die Tropfen mit einer feinen Spritze abgesaugt. Die apoplastische Waschflüssigkeit wurde aus Blättern zum Zeitpunkt 21 dpi mittels spezieller Puffer und Zentrifugation gewonnen (AG. Polle). Von Flüssigkulturmedien, auf denen der Pilz jeweils für 10 Tage wuchs, wurden nach Zentrifugation die Überstände für den Zellkulturassay benutzt. Die Extrakte wurden aus 21 Tage altem *xylem simulating*-Kulturmedium, auf dem VI43 oberflächlich wuchs, über gängige Extraktionsmethoden von der AG. Karlovsky hergestellt.

Bei dem Experiment sollte der prozentuale Anteil an toten, lebenden und transdifferenzierten Zellen in den behandelten Zellkulturen bestimmt werden. In **Abb. 35** sind repräsentativ für die ganzen Versuche, die Ergebnisse der AWF von *Arabidopsis* dargestellt. Die weiteren Daten befinden sich im Anhang (**Abb. 53 - Abb. 55**). Die Versuche wurden von Dr. Arata Yoneda im Labor von Prof. Dr. Taka Demura (Yokohama Institut, *Productivity Systems Research Group, Plant Science Center Plant Riken*) durchgeführt.

Zusammenfassend lassen sich die Resultate folgendermaßen darstellen: keine der Behandlungen induzierte Transdifferenzierung oder erhöhte die Transdifferenzierungsrate in den eingesetzten Zellsuspensionskulturen. Wahrscheinlich ist die Transdifferenzierung durch massive Elizitorschwemme überdeckt oder der Pilz gibt keine Metabolite ab und der Prozess wird aktiv von der Pflanze gesteuert.

Apoplastische Waschflüssigkeit Col-0 21dpi

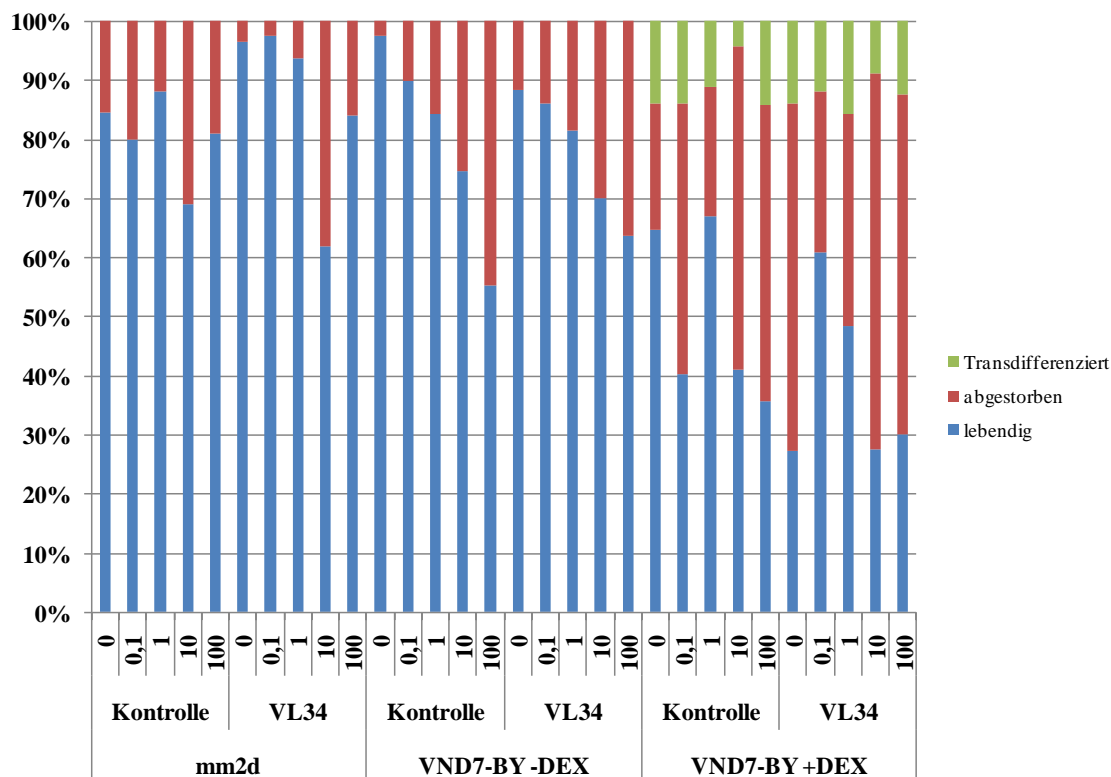


Abb. 35: Untersuchung von apoplastischer Waschflüssigkeit (AWF) von *A. thaliana* Col-0 Kontroll und VL34-infizierten Pflanzen 21 dpi im Transdifferenzierungs-Testsystem der Gruppe Taka Demura (Durchgeführt von Dr. Arata Yoneda). Benutzt wurden mm2d-*Arabidopsis*-Suspensionszellen und Dexamethason induzierbare VND7-BY-Tabaksuspensionszellen. Getestet wurden jeweils 0; 0,1; 1; 10 und 100 µl der AWF und dabei wurde der prozentuale Anteil der transdifferenzierten, toten und überlebenden Zellen bestimmt. Die AWF wurde von der AG Polle zur Verfügung gestellt. Abkürzungen: mm2s = Arabidopsiszellkultur, VND7-BY = Tabakzellkultur (Dexamethason-induzierbar (Dex.))

3.3.3.3 Lokalisationsstudie von *V. longisporum* 43 in Bündelscheidenzellen

Im Kapitel 3.3.3.1 wurde gezeigt, dass ektopisch gebildetes Xylem die Proliferation von VI43 unterstützt. Da VI43 in seiner biotrophen Phase im Leitgefäßsystem der Pflanze wächst, könnten die *de novo* gebildeten Xylemelemente zu verbesserten pilzlichen Akkomodationsbedingungen in Form von mehr Proliferationsgewebe führen. Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen, wurden VI43-Lokalisationsstudien in chlorotischen Blättern (28 dpi) durchgeführt. Nekrotische Blätter konnten aufgrund der Blattqualität nicht benutzt werden, zumal diese meistens auch schon vollständig überwachsen waren.

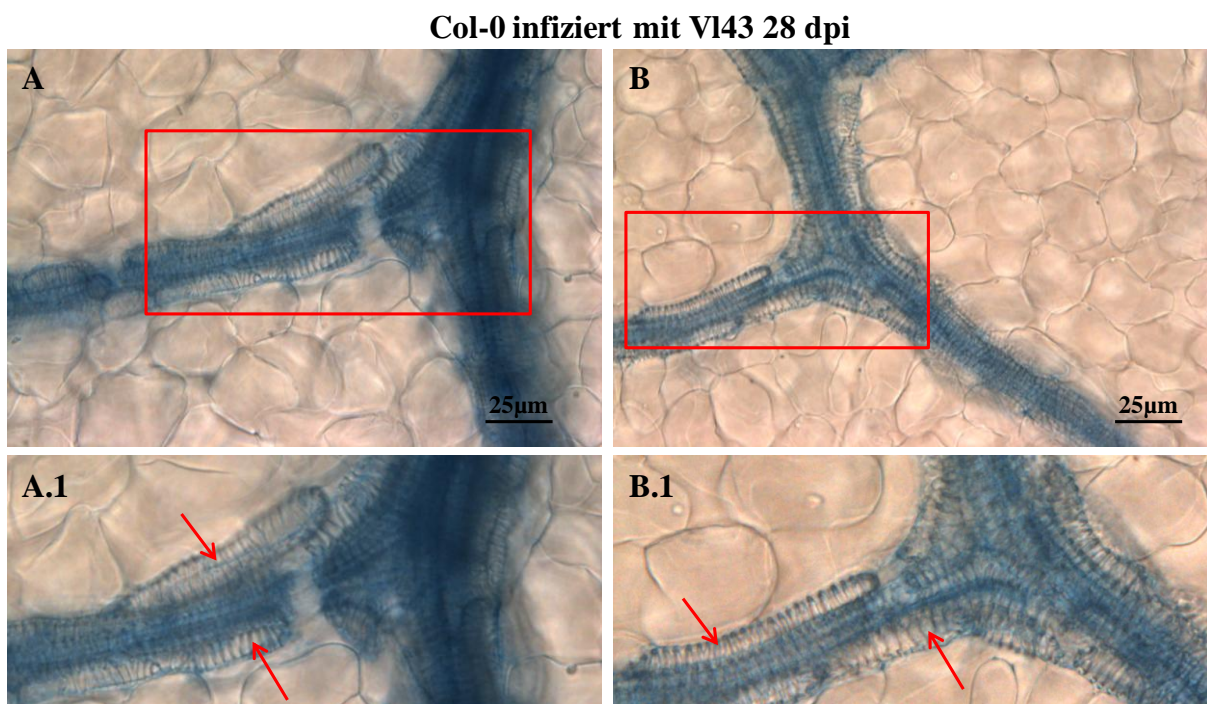


Abb. 36: (A, B) Trypan-Blau-gefärbtes Blattleitgefäßsystem von *A. thaliana* Col-0 WT einer VI43-infizierten Pflanze 28 dpi. (A.1, B.1) Vergrößerungen der in (A) und (B) gesetzten Quadrate. Pfeile markieren transdifferenzierte BSZ. Maßstab = 25 μm .

In VI43-infizierten, chlorotischen Blättern wurden die transdifferenzierten BSZ auf pilzliche Hyphen untersucht (**Abb. 36** A, B). In den Vergrößerungen markieren die Pfeile die *de novo* Xylemelemente (**Abb. 36** A.1/B.1). Mikroskopisch wurde eine Ebene gewählt, die trotz der Zelldicke und des Durchlichtverfahrens keine technischen Schwierigkeiten bereitete und es erlaubte, die lateralen *de novo* Xylemelemente in Aufsicht zu mikroskopieren. Zum untersuchten Zeitpunkt konnten in transdifferenzierten BSZ keine pilzlichen Strukturen wie Hyphen und Sporen gefunden werden.

Es wurde gezeigt, dass ektopische Xylembildung in 35S:VND7 Überexpressionslinien die Proliferation von V143 unterstützt (Kapitel 3.3.3.1). Dennoch scheinen die transdifferenzierten BSZ in Wildtyppflanzen nicht besiedelt zu werden (Kapitel 3.3.3.3). Des Weiteren induzierten isolierte Extrakte, Medienüberstände, Xylemsaft und AWF keine Transdifferenzierung in Zellkultur (Kapitel 3.3.3.2). Es erscheint also unwahrscheinlich, dass V143 die *de novo* Xylembildung für eine bessere Proliferation aktiv induziert und nutzt.

3.3.4 Untersuchungen zur Korrelation zwischen *de novo* Xylemelementen und Welke

In Kapitel 3.3.3 wurde gezeigt, dass V143 wahrscheinlich die Xylembildung nicht aktiv für eine bessere Proliferation induziert. Eine zweite Arbeitshypothese geht davon aus, dass durch die *de novo* gebildeten Xylemelemente die Wasserleitfähigkeit beziehungsweise die Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes gewährleistet und somit das Krankheitssymptom Welke verhindert wird. In vielen Interaktionen mit *Verticillium dahliae* kommt es zu Welkeerscheinungen, die durch Verstopfungen und Toxine ausgelöst werden (Kapitel 1.1, 1.2). Die Pflanzen sind nicht in der Lage, dem entgegenzuwirken. Die Ursache hierfür sind eventuell fehlende Transdifferenzierung oder Detoxifizierungs-Mechanismen. In *V. longisporum*-infizierten Rapsfeldern sowie unter Laborbedingungen wurde noch keine Welke beobachtet, da diese möglicherweise durch transdifferenzierte BSZ verhindert wird. Die hier untersuchte Hypothese setzt voraus, dass die *de novo* Xylembildung aktiv von der Pflanze gesteuert wird und *de novo* gebildetes Xylem in Form von "Umleitungen" wirkt. Damit könnte der durch blockierte Leitgefäße bedingte Wassertransportverlust kompensiert und der Transpirationssog aufrechterhalten werden. Für die Überprüfung der Hypothese wurden verschiedene Ansätze wie Funktionalitätstest des *de novo* gebildeten Xylems, Analyse von *V. dahliae* infizierten Tabak- sowie Tomatenpflanzen und Inhibierung der Transdifferenzierung gewählt.

3.3.4.1 Überprüfung der Funktionalität von *de novo* Xylemelementen

Damit eine Funktionalität der *de novo* Xylemelemente gewährleistet ist, müssen diese an das ursprüngliche Leitgefäßsystem angeschlossen sein. Das wiederum bedeutet, dass die

Elemente dann über Tüpfel miteinander in Verbindung stehen. Dementsprechend sollten diese auch mit Xylemsaft gefüllt sein. Zur Visualisierung der transdifferenzierten BSZ und des Xylemsaftes wurde der Farbstoff Safranin-O benutzt (Freeman *et al.*, 2009), der den Xylemsaft sowie verholzte Xylemstrukturen rosa-rot anfärbt. Zur Überprüfungen wurden Kontroll- und VI43-infizierte Leitgefäße mikroskopisch zum Zeitpunkt 21 dpi untersucht und miteinander verglichen (**Abb. 37**).

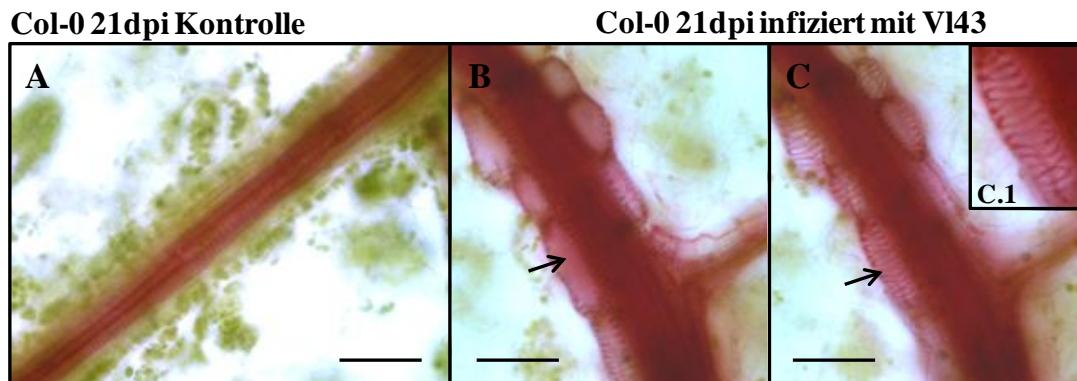


Abb. 37: Safranin-O-gefärbtes Blattleitgefäßsystem, gefärbter Xylemsaft von *A. thaliana* Col-0 WT Kontroll- und VI43-infizierten Pflanzen 21 dpi. (A) Blattleitgefäßsystem der Kontrolle. (B) VI43-infiziertes Blattleitgefäßsystem mit Fokussierung auf die mittlere Ebene einer transdifferenzierten BSZ, Pfeil markiert gefärbten Xylemsaft. (C) VI43-infiziertes Blattleitgefäßsystem mit Fokussierung auf die Oberfläche einer transdifferenzierten BSZ, durch Pfeil markiert. (C.1) Vergrößerung der markierten Zelle. Maßstab = 50µm.

Das Leitgefäßsystem der Kontrolle war gleichmäßig gefärbt (**Abb. 37 A**). Bei Fokussierung auf die mittlere Ebene und die Oberfläche der transdifferenzierten BSZ zeigte sich, dass diese mit gefärbtem Xylemsaft gefüllt und die lignifizierte Xylemstrukturen gefärbt waren (**Abb. 37 B, C**). In infizierten Blättern konnten keine ungefärbten Bereiche im ursprünglichen Leitgefäßsystem gefunden werden. Aus dem Experiment lässt sich schließen, dass die *de novo* Xylemelemente an das ursprüngliche Leitgefäßsystem angeschlossen und funktional sind.

3.3.4.2 Infektion von Tomate und Tabak mit *V. dahliae*

Nachdem erfolgreich die Funktionalität der *de novo* Xylemelemente gezeigt wurde (Kapitel 3.3.4.1), sollten Infektionen mit *V. dahliae* weitere Hinweise liefern, in wie weit ein Zusammenhang zwischen Welke und *de novo* Xylembildung bestehen könnte. *V. dahliae* löst in vielen Interaktionen mit Pflanzen Welke oder in Bäumen vorzeitige Entlaubung aus. Diese Symptomatik basiert sowohl auf Verstopfung der Leitgefäßsysteme als auch auf Abgabe von Toxinen (Kapitel 1.2). In zwei Wirtssystemen sollte geklärt werden, ob Vd830 in der Lage ist, Transdifferenzierung auszulösen und ob eine Korrelation zwischen fehlender

Transdifferenzierung und Welke besteht. Als Pathosysteme wurden Vd830-*Solanum lycopersicum* und Vd830-*Nicotiana benthamiana* für die Untersuchungen ausgewählt. Vd830 zeigte eine schwach kompatible Interaktion mit *Solanum lycopersicum* die zu Chlorosen führte und eine hoch kompatible Interaktion mit *Nicotiana benthamiana*, bei der Welke ausgelöst wurde. Beide Experimente wurden unter Langtagbedingungen durchgeführt und die Krankheitssymptome im Zeitverlauf 7 - 21 dpi dokumentiert. Kontroll und Vd830-infizierte Blätter wurden Trypan-Blau-gefärbt und die mikroskopischen Aufnahmen zur besseren Visualisierung in Graustufen dargestellt.

Vd830-Infektion führte in *S. lycopersicum* zu einer geringeren Symptomentwicklung als in *N. benthamiana*. Auf den Abbildungen sind repräsentativ eine Kontrolle und eine Vd830-infizierte Tomatenpflanze zu den Zeitpunkten 7 dpi sowie 21 dpi zu sehen (**Abb. 38** A-F). Die infizierte Pflanze zeigte *stunting*, kürzere Petiolen und Chlorosen an den Blatträndern (**Abb. 38** D, F). Das Wachstum der Pflanzen wurde über Höhenmessungen quantifiziert und war in infizierten Pflanzen im untersuchten Zeitraum signifikant reduziert (**Abb. 38** K). In der Übersichtsaufnahme des Leitgefäßsystems eines Kontrollblattes und der Detailaufnahme sind Xylemelemente und BSZ dargestellt (**Abb. 38** G/I). In infizierten Proben waren transdifferenzierte BSZ zu finden (**Abb. 38** H/J).

Die Interaktion zwischen Vd830 und *N. benthamiana* ist sehr stark, so dass der Krankheitsverlauf nur zu den Zeitpunkten 7 und 14 dpi dokumentiert werden konnte (**Abb. 39**), weil die Pflanzen bereits 21 dpi abgestorben waren. Bereits 7 dpi zeigte sich eine deutliche Symptomausprägung, bestehend aus *stunting*, Chlorose und Welke, in Vd830-infizierten Pflanzen im Kontrast zur Kontrolle (**Abb. 39** A, B). Zum Zeitpunkt 14 dpi waren infizierte Pflanzen fast abgestorben und bestanden nur aus nekrotischen, und chlorotischen Blättern; einzig der Vegetationspunkt war noch grün (**Abb. 39** D). Zur Quantifizierung des *stuntings* wurde die Blattfläche gemessen, die bereits ab 7 dpi signifikant in Vd830-infizierten Pflanzen reduziert war (**Abb. 39** E). Die Übersichtsaufnahme zeigt das Leitgefäßsystem eines Kontrollblattes in Kontrast zu einem infizierten, das in der Umgebung nekrotische Zellen hat (**Abb. 39** F, G). Eine Detailaufnahme abgestorbener Zellen oder nicht vollständig transdifferenzierter Zellen ist in der Aufnahme **Abb. 39** H zu sehen. Vereinzelt konnten *de novo* zu Xylemelementen transdifferenzierte BSZ in infizierten Blättern gefunden werden (**Abb. 39** K).

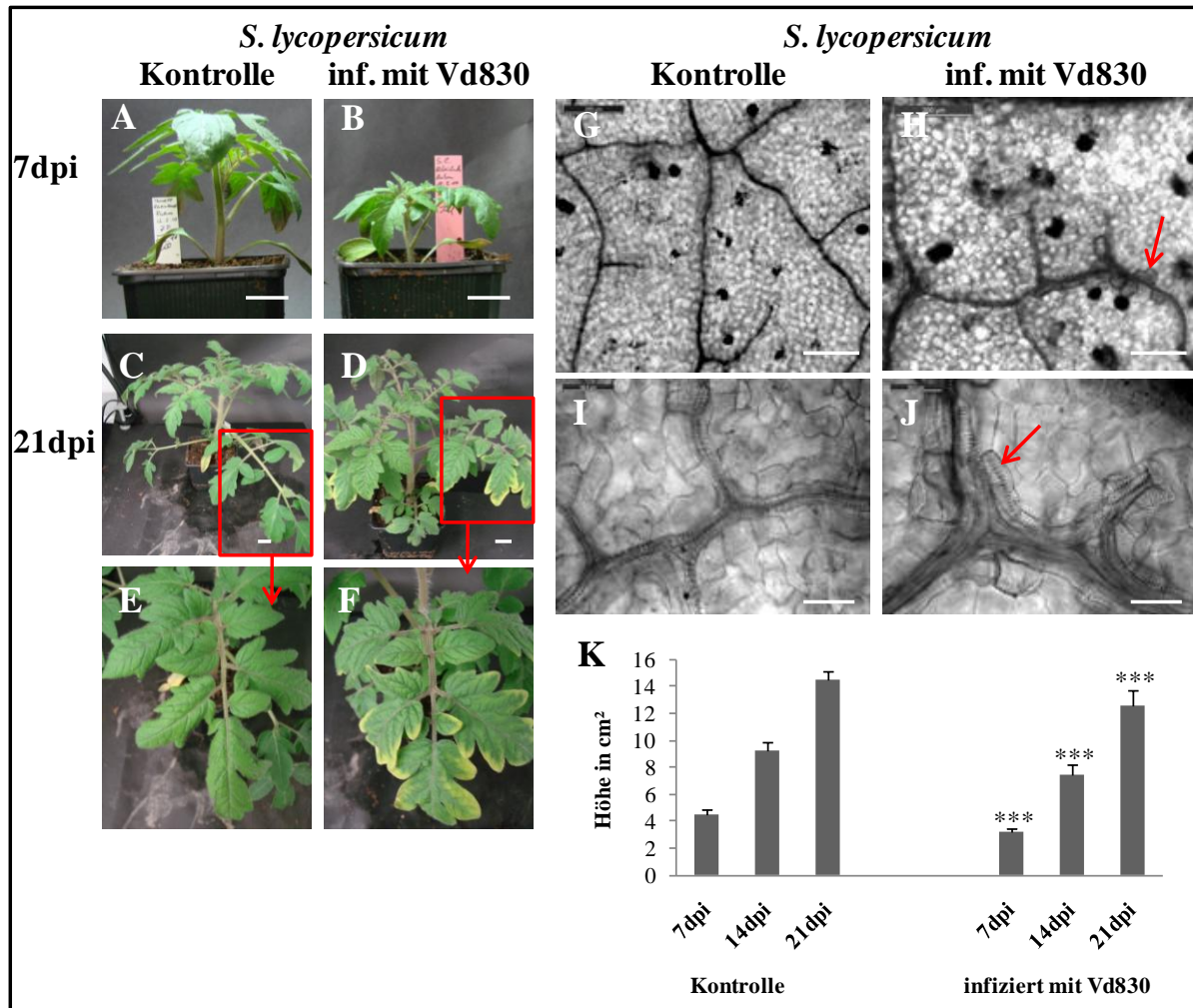


Abb. 38: Symptomausprägung, Trypan-Blau (in Graustufen dargestellt) gefärbte Transdifferenzierung von Kontroll- und Vd830-infizierten *Solanum lycopersicum* (RR = Rheinlands Ruhm) WT-Pflanzen im Zeitverlauf 7, 14 und 21 dpi unter Langtagbedingungen. (A, C) Kontrollpflanzen 7, 21 dpi und (E) Vergrößerung eines Kontroll-Blattes 21 dpi. (B, D) Vd830-infizierte Pflanzen 7, 21 dpi und (F) Vergrößerung eines infizierten Blattes mit Chlorose im Blattrandbereich. (G) Übersicht des Leitgefäßsystems eines Kontrollblattes und (I) Vergrößerung. (H) Übersicht des Leitgefäßsystems eines infizierten Blattes und (J) Vergrößerung; Pfeile markieren in beiden Bildern transdifferenzierte BSZ. (K) Vermessung der Höhe in Kontroll- und Vd830-infizierten Pflanzen im Zeitverlauf 7 - 21 dpi. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 15 biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede ($P \leq 0,001$) zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch drei Sterne gekennzeichnet. (A-D) Maßstab der *S. lycopersicum* Fotos = 2 cm, der (C, H) Mikroskopie-Übersichten = 200 μm und (I, J) der Mikroskopie-Detailaufnahmen = 50 μm .

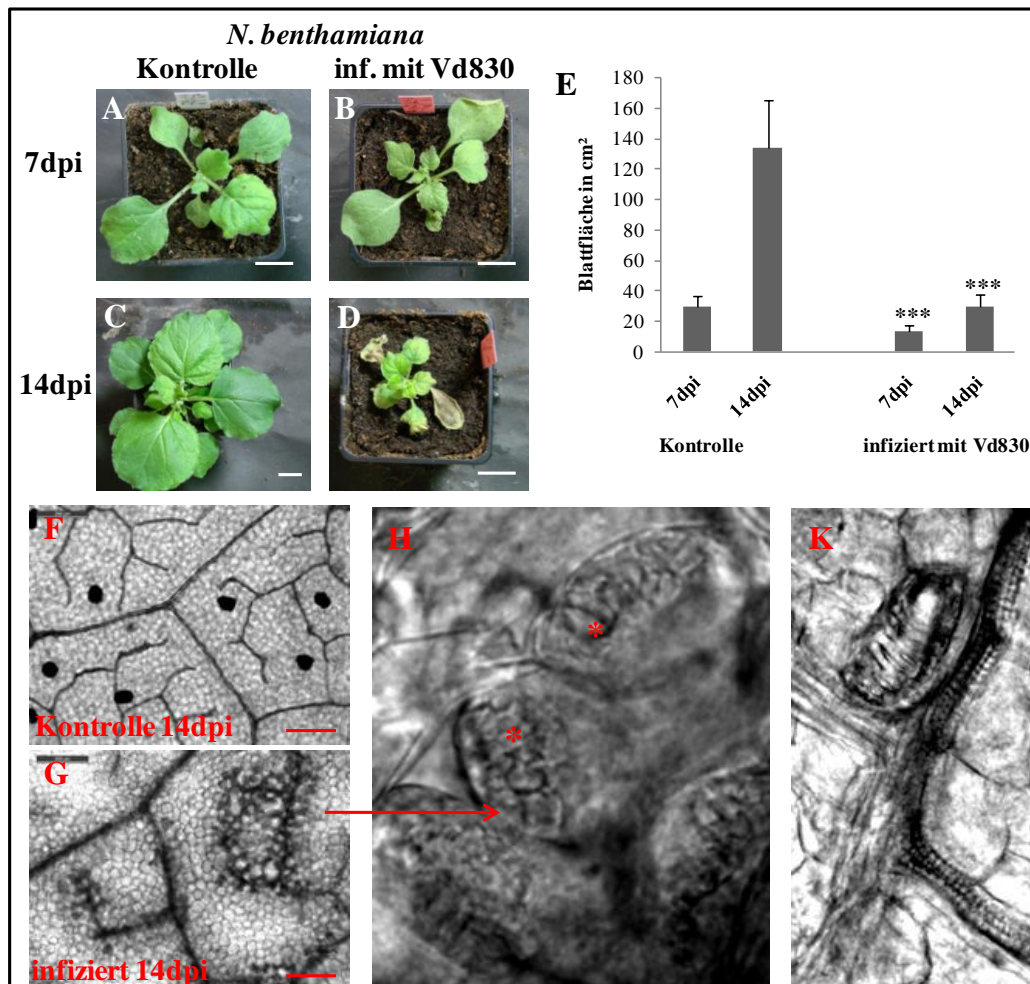


Abb. 39: Symptomausprägung, Trypan-Blau-gefärbter Zelltod (in Graustufen dargestellt), Transdifferenzierung von Kontroll- und Vd830-infizierten *Nicotiana benthamiana* WT-Pflanzen zu den Zeitpunkten 7 und 14 dpi unter Langtagbedingungen. (A, C) Kontrollpflanzen und (B, D) Vd830-infizierte Pflanzen. (E) Vermessung der Blattfläche in Kontroll- und Vd830-infizierten Pflanzen. (F) Übersicht des Leitgefäßsystems eines Kontrollblattes 14 dpi und (G) eines infizierten Blattes 14 dpi mit Zelltod ausgehend vom Leitgefäßsystem. (H) Vergrößerung toter oder im Transdifferenzierungsprozess befindlicher Zellen, markiert durch rote Sterne. (K) Transdifferenzierte BSZ in einem infiziertem Blatt 14 dpi. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 15 biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede ($P \leq 0,001$) zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch drei schwarze Sterne gekennzeichnet. (A-D) Maßstab der *N. benthamiana* Fotos = 2 cm und der (C, H) Mikroskopie-Übersichten = 200 µm.

Auf eine Vd830-Infektion reagiert *N. benthamiana* suszeptibler als *S. lycopersicum*. Die Induktion der Transdifferenzierung in Tomate und vereinzelte *de novo* Xylembildung sowie Welke in Tabak unterstützen die Hypothese des Kapitels 3.3.4. Demnach könnte ein Zusammenhang zwischen Transdifferenzierung und Welke bestehen.

3.3.4.3 Inhibition des Transdifferenzierungsprozesses durch VND7-Repression

Um zu überprüfen, inwieweit die neuen Xylemelemente den Wasserhaushalt von V143-infizierten Pflanzen beeinflussen, war es nötig, den Prozess der Transdifferenzierung zu

inhibieren. Dazu wurden transgene *A. thaliana* Col-0 Pflanzen mit dem Konstrukt pPer21:VND7-SRDX erzeugt (in Anlehnung an die Arbeit von Kubo *et al.* 2005). Wie bereits oben beschrieben (3.3.2) konnte die Arbeitsgruppe von T. Demura Protoxylembildung durch Überexpression von VND7-Fusionen mit einer Repressionsdomäne (SRDX-Domäne) inhibieren. Da die *de novo* Xylemelemente mehr Ähnlichkeit mit Protoxylem haben (Kapitel 3.3.1) und VND7 nach Infektion stark induziert war (Kapitel 3.3.2), wurde der 35S-Promotor der VND7 Überexpressionslinie gegen einen VI43-induzierbaren Promotor ausgetauscht. Die Transdifferenzierung sollte dem Zeitverlauf entsprechend inhibiert werden. Dafür wurde der Promotor des Gens der *Peroxidase 21* (*PER21*) benutzt, der in infizierten Pflanzen ab 9 dpi induziert ist (Tappe, 2008) und durch VI43-Infektion angeschaltet wird.

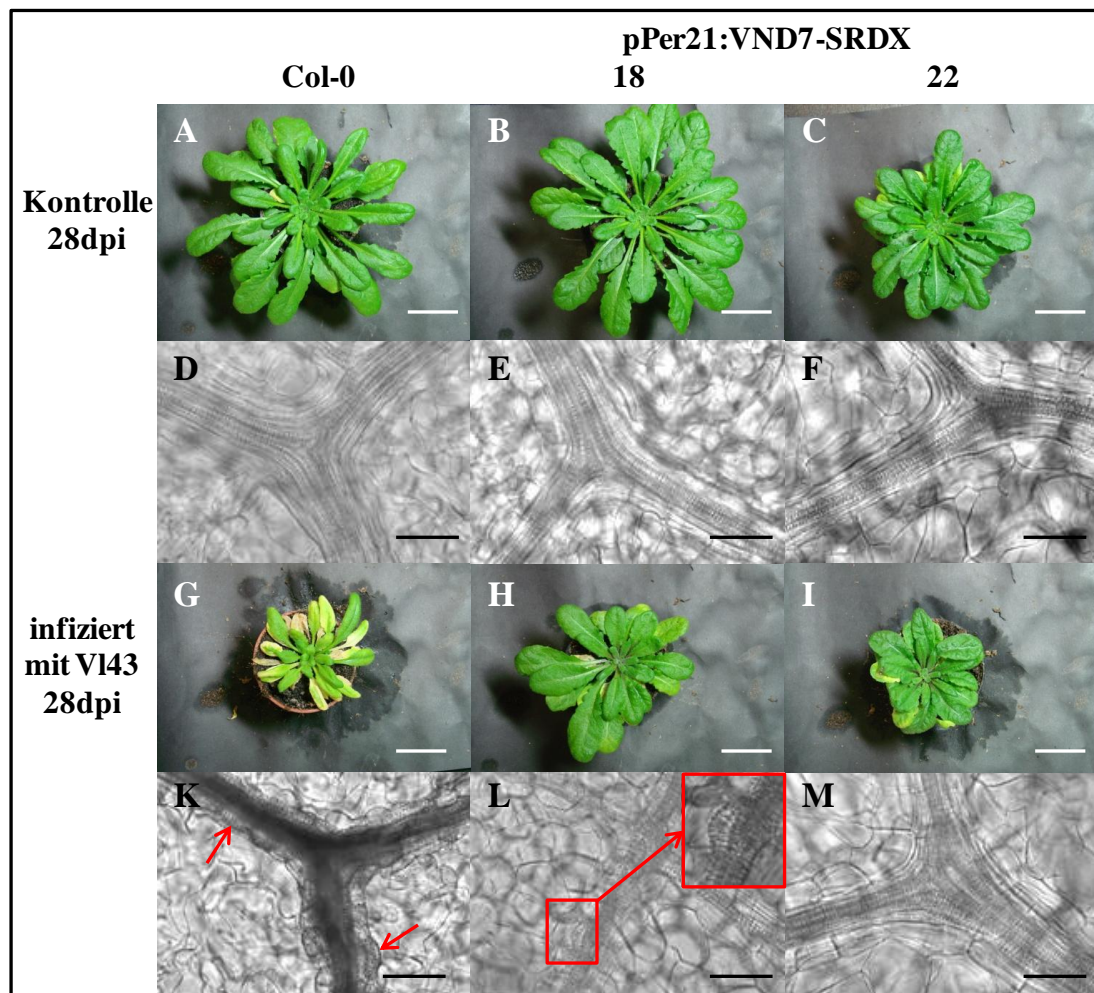


Abb. 40: Symptomausprägung, Transdifferenzierung von Kontroll- und VI43-infizierten *A. thaliana* Col-0 WT-Pflanzen und pPer21:VND7-SRDX im Col-0 Hintergrund zum Zeitpunkt 28 dpi unter Kurztagbedingungen. (A) Col-0 Kontrollpflanze und (D) Blattleitgefäßsystem. (G) Mit VI43 infizierte Col-0 Pflanze und (K) Blattleitgefäßsystem mit transdifferenzierten BSZ, markiert durch Pfeile. (B, C) pPer21:VND7-SRDX L18-, L22-Kontrollpflanzen und (E, F) zeigen entsprechende Blattleitgefäßsysteme. (H, I) Mit VI43 infizierte pPer21:VND7-SRDX L18, L22 Pflanzen und (L, M) zeigen die entsprechenden Blattleitgefäßsysteme. (L) Mit einem Quadrat markierte einzelne transdifferenzierte BSZ und entsprechende Vergrößerung.

Zum Zeitpunkt 28 dpi wurde der Phänotyp zweier unabhängiger transgener Linien im Vergleich zu Col-0 untersucht, wobei die Pflanzen unter Kurztagbedingungen wuchsen. Zusätzlich wurde mit Trypan-Blau das Blattleitgefäßsystem und mit Toluidin-Blau das Leitgefäßsystem der Mittelrippe gefärbt und auf Veränderungen untersucht.

Die Phänotypen der transgenen pPer21:VND7-SRDX Linien wurden neben den Infektionsanalysen unter Kurztagbedingungen charakterisiert. Während die Linie L18 phänotypisch dem Wildtyp entsprach (Abb. 40 A, B), zeigte die Linie L22 kürzere Petiolen, Seneszenz und geringes *stunting* zum Zeitpunkt 28 dpi (Abb. 40 C). Die Blattleitgefäßsysteme aller uninfizierten Kontrollpflanzen wiesen keine Unterschiede zu Col-0 auf (Abb. 40 D-F). In Infektionsuntersuchungen zeigte sich, dass sich der Infektionsphänotyp der transgenen Linien deutlich von Col-0 unterscheidet (Abb. 40 G-I). Beide Linien zeigten ein reduziertes *stunting*, keine sich rollenden Blätter, keine *yellow veins*, und eine physiologische Zweiteilung der Rosette; der untere Teil hatte deutliche Seneszenz-Symptome mit chlorotischen und nekrotischen Blättern, der obere Teil hingegen war grün und vital. Durch VND7-Repression wurden entgegen den Erwartungen keine Welke-Symptome ausgelöst. Bei Betrachtung der Leitgefäßsysteme waren in Col-0 infizierten Pflanzen die BSZ nahezu vollständig transdifferenziert (Abb. 40 K), in L18 waren nur vereinzelte transdifferenzierte BSZ zu beobachten (Abb. 40 L) und in L22 keine (Abb. 40 M).

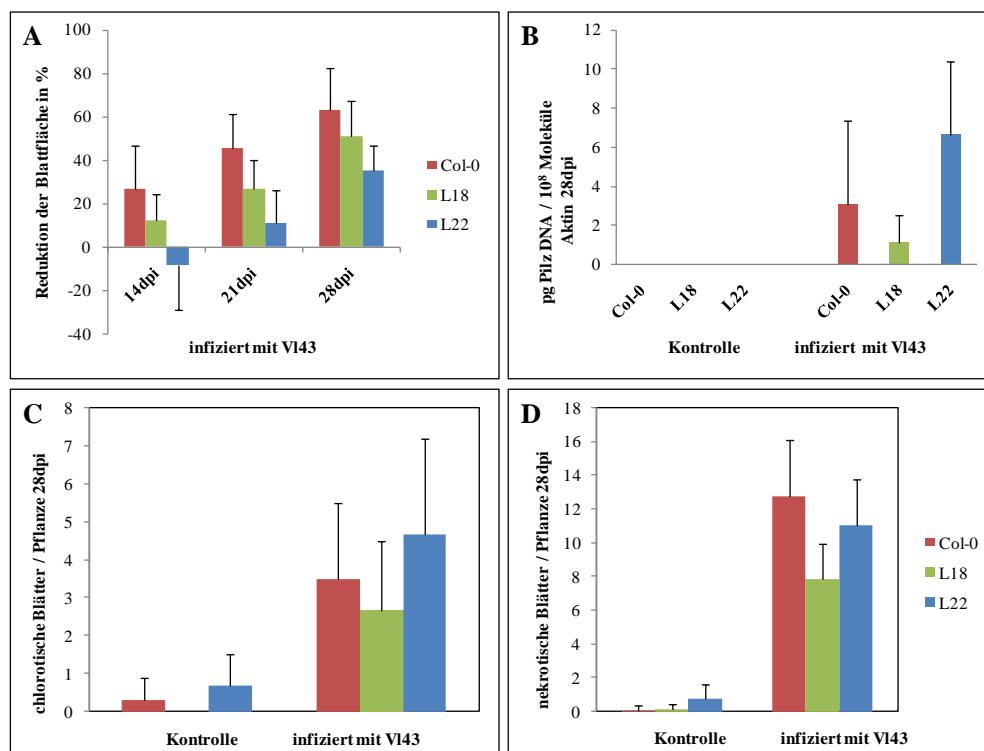


Abb. 41: (A) Prozentuale Reduktion der Blattfläche im Verhältnis zur Kontrolle von Col-0 verglichen mit pPer21:VND7-SRDX L18, L22 im Zeitverlauf 14, 21 und 28 dpi. (B) Vermessung der pilzlichen DNA-Menge 28dpi und (C, D) Bestimmung der chlorotischen und nekrotischen Blätter 28 dpi.

Zum besseren Analyse des Phänotyps wurde die prozentuale Blattflächenreduktion, die VI43-Proliferation und die chlorotischen sowie nekrotischen Blätter quantifiziert (**Abb. 41**). Col-0 zeigte die stärkste Blattflächenreduktion mit 60 %, L18 eine reduzierte mit 50 % und L22 die geringste mit ca. 32 % 28 dpi (**Abb. 41 A**). Über die Proliferation von VI43 ließ sich keine eindeutige Aussage machen aufgrund der hohen Standardabweichung der DNA-Bestimmung. Es scheint aber im Vergleich zum Col-0 Wildtyp keine Unterschiede zu geben (**Abb. 41 B**). Interessanterweise unterschieden sich auch die transgenen Linien, seien es die Kontrollen oder VI43-infizierte, nicht stark von Col-0 in der Gesamt-Anzahl der chlorotischen und nekrotischen Blättern (**Abb. 41 C, D**); lediglich L18 hatte weniger nekrotische Blätter (**Abb. 41 D**).

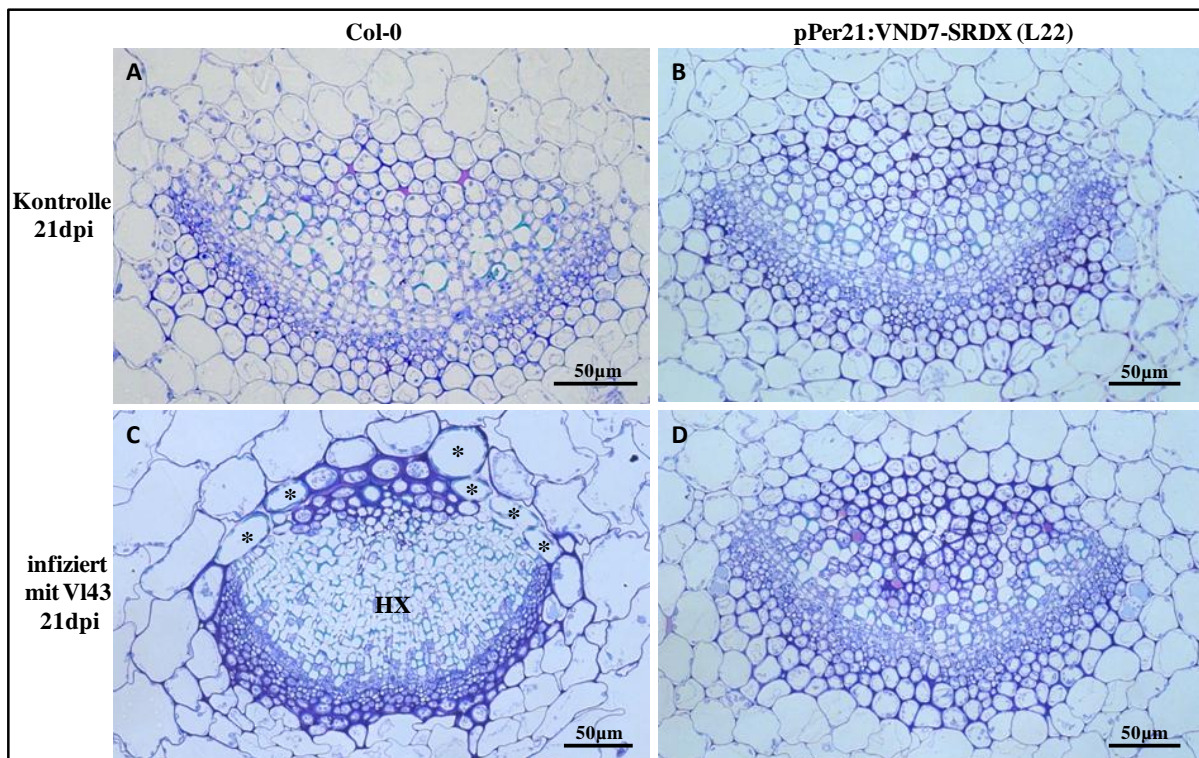


Abb. 42: Toluidin-Blau-gefärbte Blätter des Leitgefäßsystems der Mittelrippe von *A. thaliana* Col-0 WT Kontroll- und mit VI43-infizierte Pflanzen sowie der pPer21:VND7-SRDX L22 21 dpi. (A) Leitgefäßsystem der Col-0 Kontrolle 21 dpi und (C) Leitgefäßsystem von VI43-infiziertem Blatt 21dpi mit hyperplastischem Xylem (HX) sowie mit Sternen markierten transdifferenzierten BSZ. (B) Leitgefäßsystem der pPer21:VND7-SRDX L22-Kontrolle 21 dpi und (D) Leitgefäßsystem von VI43-infiziertem Blatt 21dpi.

Außerdem wurden anatomische Querschnitte der Leitgefäßsysteme der Mittelrippe von Col-0 und pPer21:VND7-SRDX L22 zur weiteren Charakterisierung angefertigt (AG Polle). Dafür wurden Proben zum Zeitpunkt 21 dpi geerntet. Col-0 infiziertes Probenmaterial zeichnete sich im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle durch viel hyperplastisches Xylem (HX) und transdifferenzierte BSZ aus (**Abb. 42 A, C**). Interessanterweise gab es durch Repression von *VND7* in L22 eine starke Veränderung gegenüber infizierten Col-0 Pflanzen. L22 bildete nach

Infektion kein hyperplastisches Xylem aus und eine Transdifferenzierung von BSZ konnte nicht beobachtet werden (**Abb. 42 D**). Der Phänotyp der infizierten Pflanzen entsprach eher dem der nicht-infizierten Kontrollen (**Abb. 42 A, B, D**).

In den Versuchen wurde die Funktionalität der *de novo* Xylemelemente gezeigt (Kapitel 3.3.4.1). Die Notwendigkeit der Transdifferenzierung für die Vermeidung des Welkesymptoms konnte aber nicht nachgewiesen werden.

3.3.4.4 ¹⁴C-Glukose Transportversuch mit *V. longisporum* 43-infizierten Pflanzen

In der VI43-induzierten Transdifferenzierung sind hauptsächlich Bündelscheidezellen betroffen (Kapitel 3.3.1). Diese regulieren den Import von Wasser und Nährstoffen in das Blatt, besonders in der Entwicklung, aber auch den Export während der Seneszenz (Leegood, 2008). Aufgrund der Involvierung der BSZ in Rückgewinnungsprozesse der Nährstoffe während der Seneszenz wurde eine dritte Arbeitshypothese aufgestellt, welche postuliert, dass BSZ eine Funktion bei der pathogen-induzierten Seneszenz haben. Demnach müsste es während der induzierten Seneszenz zu einem Nährstofftransport aus den *source*-Blättern in die *sink*-Blätter kommen, welcher eventuell durch die Umwandlung von BSZ in *de novo* Xylemelemente gestört ist. Da BSZ eine wichtige Funktion im Transport der Stoffe aus dem Xylem beziehungsweise Phloem ins Blattmesophyll und entgegengesetzt besitzen (Leegood, 2008), könnte eine Transdifferenzierung somit bewirken, dass Nährstoffe zurückgehalten werden. Diese könnten dem Pilz in der nekrotrophen Phase somit weiterhin zur Verfügung stehen. Um einen Eindruck zu bekommen, wie die *source-sink*-Verhältnisse in infizierten Pflanzen verändert sind, wurden 21 dpi alte Pflanzen mit ¹⁴C-markierter Glukose behandelt. Nach sechs beziehungsweise 24 Stunden nach Behandlung (hpt: *hours post treatment*) wurden Radiogramme erstellt und direkt die Radioaktivität der Proben gemessen. Dabei wurden *A. thaliana* Col-0 und eine *Verticillium* induzierbare VND7-Repressorlinie (L18) verwendet, um im Vergleich den Einfluss der Transdifferenzierung charakterisieren zu können.

Allgemein zeigten alle Radiogramme nur eine geringe Transportrate in die Blätter vor dem ¹⁴C-Blatt und eine starke in den nachfolgenden Blattbereich bis in die Spitze der Rosette (**Abb. 43 A-D**). Im Vergleich transportierte die transgene Linie (L18) gleich viel ¹⁴C-Glukose in die *sink*-Blätter wie Col-0 (**Abb. 43 A, B**). Die quantitative Messung der Radioaktivität in

den Proben bestätigte die qualitativen Ergebnisse der Radiogramme (**Abb. 43 E**). In infizierten Col-0 Pflanzen war der Transport in die *sink*-Blätter unterhalb der Spross-Spitze deutlich reduziert im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 43 A, C, E**). Der Transport in die Spross-Spitze war nicht beeinflusst. Die infizierte Repressionslinie zeigte die gleiche Transportrate in die Spitze wie infizierte Col-0 Pflanzen, aber eine deutlich höhere in den *sink*-Bereich der Pflanze unterhalb der Spross-Spitze (**Abb. 43 C, D, E**). Bei Betrachtung der insgesamt aus dem markierten Blatt exportierten Radioaktivität aller Ansätze, zeigte sich, dass die infizierte Repressionslinie etwa doppelt so viel Radioaktivität aus dem markierten Blatt exportiert, wie der Wildtyp (**Abb. 43 E**).

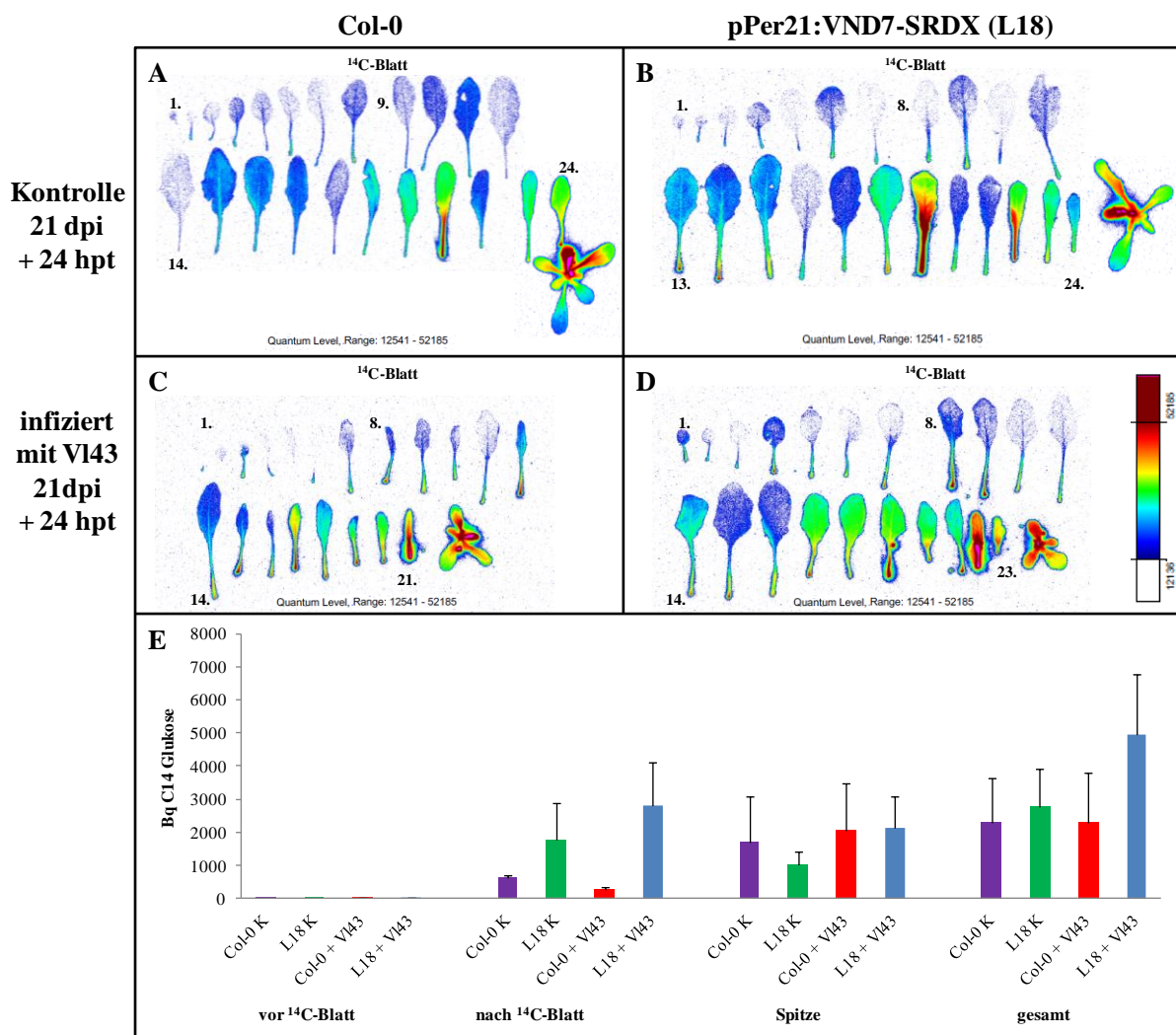


Abb. 43: ¹⁴C-Glukose Transportversuch. (A-D) Radiogramme der einzelnen Ansätze 21 dpi + 24 Stunden nach Behandlung (hpt) von Kontroll- und V143-infizierten *A. thaliana* Pflanzen. Die Zahlen geben die Position des Blattes in der Rosette an. Auf Position 8 bzw. 9 befand sich das C14-Blatt. (A) Col-0 Kontrolle, (B) pPer21:VND7-SRDX (L18) Kontrolle, (C) Col-0 infiziert und (D) pPer21:VND7-SRDX (L18) infiziert. (E) Direkte Vermessung der Radioaktivität [Becquerel] der unterteilten Rosette 21 dpi + 24 hpt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 5 biologischen Wiederholungen.

Die Ergebnisse des Transportversuchs zeigen eindeutig, dass es nach Infektion zu deutlichen Unterschieden in der Transportrate zwischen Col-0 und der Repressionslinie kommt. Demnach könnte in der Tat die biologische Relevanz der Transdifferenzierung in der Blockierung der Nährstoffrückgewinnung zu Nutzen des Pilzes liegen.

4. Diskussion

4.1 *V. longisporum* 43 Infektionsverlauf

In der Literatur ist beschrieben, dass pflanzenpathogene *Verticillium*-Arten (Pegg and Brady 2002) über die Wurzelspitze das Leitgefäßsystem besiedeln, da diese Bereiche keine ausgebildete Endodermis mit Casparischem Streifen besitzen. In den übrigen Wurzelbereichen penetriert der Pilz die Epidermis und wächst inter- oder intrazellular bis zur Endodermis und wird von dieser aufgehalten (**Abb. 7**). In einem in dieser Arbeit entwickelten *in vitro*-Assay konnte dieser Verlauf über die ersten vier Tage der Infektion in *A. thaliana* Col-0 bestätigt werden (**Abb. 7**). Im späteren Verlauf des *in vitro*-Assays überwächst VL43 die ganze Pflanze und schädigt diese dadurch massiv. Diese Situation unterscheidet sich dann von dem natürlichen Infektionsverlauf. Während des Penetrationsvorgangs bewirkt VL43 eine Anschwellung der Hyphenspitze, vergleichbar mit einem Hyphopodium von *Magnaporthe oryzae* (Sylvain *et al.*, 2010). Dabei durchstößt VL43 nach Anverdauen der Zellwand (Talboys, 1958 a) mittels eines invasiven Penetrationszapfens (*penetration peg*) die Epidermis. In *Arabidopsis* besiedelt VL43 innerhalb von 72 Stunden die ganze Wurzel intrazellular bis zur Endodermis. Über die Wurzelspitze erreicht er durch interzelluläres Wachstum das Leitgefäßsystem und wächst dann kontinuierlich in Richtung Hypokotyl. Gleichmaßen kann er auch über Wurzelprimordien das Leitgefäßsystem erreichen und die Pflanze infizieren (Rindfleisch, 2011 Bachelorarbeit, Abt. Lipka). Mit dem in dieser Arbeit etablierten Untersuchungssystem besteht nun die Möglichkeit, Mutanten oder transgene Linien von pilzlicher oder pflanzlicher Seite aus auf veränderten Invasionserfolg zu studieren. Bei natürlicher Infektion kommt es in *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen nur zu einer geringen Symptomausprägung im Dokumentationszeitraum von 28 dpi (**Abb. 32**). Um dieses Problem zu umgehen, werden die Pflanzen unter Laborbedingungen über mechanische Verletzung der Wurzeln infiziert (Veronese *et al.*, 2003). Dabei kann der Pilz über die Wunden sowie abgerissene Wurzelspitzen in die Wurzel problemlos eindringen und diese innerhalb kürzester Zeit in erhöhter Dichte besiedeln. Durch diese Infektionsmethode, die von vielen an *Verticillium* forschenden Arbeitsgruppen benutzt wird, kann eine relativ gleichmäßige Symptomentwicklung erzeugt werden. Unter Laborbedingungen ist die für VL43-Infektion typische Symptomentwicklung *stunting*, *yellow veins* und verfrühte Seneszenz. Diese Symptome sind auch auf ähnliche Weise, aber schwächer, bei einer Infektion unter natürlichen Bedingungen zu beobachten. In der Natur erfolgt die Infektion nicht wie unter

Laborbedingungen über Konidien, sondern über auskeimende Mikrosklerotien. Möglicherweise ist der unter natürlichen Bedingungen langsamere Infektionsverlauf die Ursache dafür, dass der *stunting*-Phänotyp in Rapsfeldern nicht zu finden ist und die anderen Symptome schwächer auftreten. In den folgenden Kapiteln werden die Symptomentwicklungen und deren Ursachen diskutiert.

4.2 Veränderung der Cytokinin-Homöostase nach *V. longisporum* 43-Infektion

Aus der Literatur ist bekannt, dass *Verticillium spec.*-Infektion mit Veränderungen der Cytokinin-Homöostase korreliert. Dieser Prozess wurde schon in den frühen 70er Jahren in der Interaktion *Verticillium spec.* mit *Gossypium hirsutum* oder *V. dahliae* mit *Lycopersicum esculentum* (Sorte: Bonny Best) beobachtet (Misaghi *et al.*, 1972; Patrick *et al.*, 1977). In *Gossypium hirsutum* wurden drei Substanzen mit Cytokinin-Aktivität in Xylemsaft, Blattextrakten und Stammextrakten über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und Kontrollen mit infizierten Proben verglichen. Im Zeitverlauf konnten starke Unterschiede in der Cytokininkonzentration nach Ausbildung der ersten Chlorosen festgestellt werden (Misaghi *et al.*, 1972). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit Wurzelextrakten aus *Lycopersicum esculentum* erzielt, wobei starke Veränderungen erst nach deutlicher Symptomausprägung der Chlorose circa 12 Tage nach Infektion (dpi) einsetzten. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass die Cytokininreduktion mit der starken Chlorophyllabnahme in alten infizierten Blättern und Ausbreitung der Chlorose in jungen Blättern korreliert. Allgemein formuliert, korreliert die Cytokininreduktion mit der abnehmenden Pflanzenvitalität (Patrick *et al.*, 1977). Anschließend wurde die Thematik der Cytokininreduktion, ausgelöst durch *Verticillium spec.*-Infektion, nicht weiter verfolgt. In dieser Arbeit wurde die Erforschung der Thematik wieder aufgenommen, allerdings in der Interaktion *Verticillium longisporum* 43 (V143) mit der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Die Ergebnisse der frühen 70er Jahre dienten als Grundlage für unsere erweiterte Hypothese: *Verticillium spec.* induziert aktiv Seneszenz, um sich in der nekrotrophen Lebensphase an dem abgestorbenen Pflanzenmaterial nähren und folglich massiv proliferieren zu können. Dadurch kann der Pilz seinen Lebenszyklus abschließen. In den Arbeiten der 70er Jahre wurde postuliert, dass die Cytokininreduktion ein Sekundäreffekt der Infektion sei, ohne eine mögliche biologische Relevanz für *Verticillium spec.* zu erörtern. Es war ein Ziel dieser Arbeit, die biologische Relevanz der *Verticillium*-induzierten Cytokininabnahme aufzuklären.

Die Versuchsreihe wurde begonnen mit der Quantifizierung der Cytokininkonzentration in der gesamten Rosette von *V. longisporum* 43-infizierten und Kontrollpflanzen, um zu überprüfen, ob und ab welchem Zeitpunkt eine Cytokininreduktion in diesem System stattfindet. Gemessen wurden *trans*-Zeatin (*tZ*), *cis*-Zeatin (*cZ*), Isopentenyladenin (*iP*) und Dihydrozeatin (*DHZ*) sowie zwei Zwischenstufen (Riboside) und drei Speicherverbindungen (Glukoside) (Werner *et al.*, 2003; Kakimoto, 2003). Interessanterweise kam es schon ab dem Zeitpunkt 7 dpi, zu dem noch keine Krankheitssymptome zu beobachten waren, zu einer stetigen und starken Abnahme der *tZ*-Konzentration (**Abb. 8**). Dies weicht von den Ergebnissen von Patrick *et al.* (1977) ab, die erste geringe zum Zeitpunkt 7 dpi und starke Unterschiede ab 12 dpi in der Cytokininkonzentration feststellten. Eine mögliche Erklärung könnte die verwendeten Infektionsmethoden oder die Pathogen-Wirt-Interaktion selbst sein, die eventuell stärker in *Arabidopsis* als in *L. esculentum* ablief. Um eine homogene starke Infektion mit VI43 in *Arabidopsis* auszulösen, wurden die Wurzeln von Erde befreit und mechanisch verletzt (Veronese *et al.*, 2003). Anschließend wurden sie in einer Sporensuspension inkubiert, so dass über die Wunden viele Pilzsporen leichter und schneller eindringen konnten. Die Verletzungen sind vergleichbar mit Wunden, die bei Nematoden-Fraß entstehen können (Bowers *et al.*, 1996; Back *et al.*, 2002). Bei *L. esculentum* wurde früher nur durch Schnitte in den durchwurzelten Erdballen eine Verletzung durchgeführt und mit einer hohen Sporenkonzentration gegossen. Diese Infektionsmethode führte eventuell zu einer schwächeren Besiedlung als die von uns verwendete in *Arabidopsis*. Wie oben erwähnt, kam es ab 7 dpi zu einer Cytokininabnahme, die zum Anfang und gegen Ende (28 dpi) mit ca. 40 % sehr stark ausfiel und zu den mittleren Zeitpunkten mit 16 % und 27 % schwächer war. Mit dem Cytokinin-sensitiven Promotor-Reporter-GUS Konstrukt pARR5:GUS (Kudryakova *et al.*, 2008), konnte indirekt dieselbe Tendenz der Cytokininreduktion im Zeitverlauf wie bei der quantitativen Cytokininbestimmung gezeigt werden (**Abb. 10**). Die starke Reduktion zum Zeitpunkt 7 dpi initialisierte wahrscheinlich die Krankheitssymptomatik der verfrühten Seneszenz. Chlorosen entwickelten sich erst ab 14 dpi passend zum Expressionsprofil des Seneszenz-korrelierten Gens *SAG12* nach VI43-Infektion (Gan und Amasino., 1995; Schwarzberg *et al.*, 2008) (**Abb. 20**). Dementsprechend scheint eine direkte Korrelation zwischen der Cytokininabnahme und der Seneszenz vorzuliegen (Werner und Schmölling, 2009), bei der die Verringerung der *tZ* Konzentrationen wahrscheinlich die Hauptrolle spielt. Im Vergleich zu *tZ* verhielten sich die Konzentrationen von *cZ*, *iP* und *DHZ* 14 und 21 dpi nach *Verticillium*-Infektion mit leicht erhöhten Gehalten entgegengesetzt. Wir postulieren, dass die Abnahme von *tZ* Seneszenz auslöst, und dass *cZ*, *iP* und *DHZ* aufgrund ihrer

niedrigen Konzentration eine untergeordnete Rolle spielen. Da angenommen wird, dass *tZ* die Hauptrolle in der VI43-induzierten Seneszenz spielt, werden von diesem Cytokinin auch die Konzentrationen der Riboside und Glukoside in Kontroll- und infizierten Pflanzen diskutiert. Im Allgemeinen ließ sich ein gleichmäßiges Muster bei den Cytokinin-Glukosidverbindungen von *tZ* beobachten (**Abb. 44** im Anhang). Die Konzentrationen der Glukoside waren bei den Kontrollen sowie den infizierten Pflanzen relativ konstant. Daraus kann man schließen, dass die infizierten Pflanzen kein freies Cytokinin aus den Speicherstoffen remobilisieren konnten, um der Cytokininabnahme entgegenzuwirken. Es besteht die Möglichkeit, dass VI43 die durch eine β -Glukosidase katalysierte Umwandlung vom Glukosid zum aktiven Cytokinin inhibiert (Sakakibara, 2006), um die Cytokininkonzentration in der Pflanze gering zu halten. Riboside sind Cytokininvorstufen in der Cytokininbiosynthese (Kakimoto, 2003). Es konnte beobachtet werden, dass sich die Konzentrationen der Riboside von *tZ* in infizierten Pflanzen annähernd wie in den Kontrollen verhielten. Eine Störung bei den involvierten Enzymen, wie zum Beispiel der Ribonukleotid-Phosphohydrolase oder der Adenosinnukleosidase, die bei der Synthese von aktiven Cytokininen eine Rolle spielen (Sakakibara, 2006), konnte dementsprechend ausgeschlossen werden. Die Konzentrationsmessungen der Riboside weisen daraufhin, dass die Abnahme der *tZ*-Konzentration nicht auf eine Herunterregulation der Cytokininbiosynthese zurückzuführen ist.

Es ist bekannt, dass Cytokininreduktion in Verbindung mit Seneszenz steht (Werner und Schmölling, 2009), wobei die genauen Mechanismen noch nicht im Detail beschrieben werden konnten. Diese Verbindung konnte auch durch Seneszenz induzierte Aktivierung der Isopentenyltransferase von *Agrobacterium tumefaciens* in transgenen Tabaklinien gezeigt werden. Sie führte zu einer Cytokininkonzentrationserhöhung sowie in Folge zu einer Inhibition der Blattseneszens und sekundär zu erhöhter Samenproduktion (Gan *et al.*, 1995). Auf diesem System basierend wurden ähnliche Ergebnisse auch mit *Medicago sativa* und *Brassica oleracea* erhalten (Chen *et al.*, 2001; Calderini *et al.* 2007). Wird die Cytokinin-Homöostase durch Überexpression von Cytokininoxidasen (CKX1 - CKX4) beeinflusst, so führt dies in *Arabidopsis* oder Tabak zu Zwergwuchs und verstärktem Wurzelwachstum. Werner *et al.* publizierten 2001, dass CKX-Überexpression unerwarteterweise keine verfrühte Seneszenz auslöste. Allerdings lässt sich diese Aussage aufgrund neuerer Untersuchungen möglicherweise nicht mehr halten (pers. Mitteilung Prof. Dr. Schmölling, Institut für Angewandte Genetik, FU Berlin). *Knock-outs* beziehungsweise *knock-downs* einzelner CKX-Gene in *Arabidopsis* führten zu keiner offensichtlichen Veränderung der Seneszenzentwicklung (eigene Beobachtung). Das ist vermutlich durch die Redundanz der

Gene zu erklären, da das *Arabidopsis*-Genom für sieben Cytokininoxidasen codiert. Es ist daher anzunehmen, dass multiple *Knockout*-Mutanten der *CKX*-Gene zu leicht verzögerter Seneszenz führen könnten. Dies ist vergleichbar mit der Situation in transgenen pSAG12:IPT *Arabidopsis* Pflanzen, die Seneszenz-induzierte Cytokininproduktion zeigen (Gan und Amasino, 1995). Werden alle sieben *CKX*-Gene über den CKX-Inhibitor INCYDE (2-chloro-6-(3-methoxyphenylamino) purine) (Zatloukal *et al.*, 2008) blockiert, so wird die Seneszenz drastisch reduziert. Dies konnte in dieser Arbeit für die Interaktion von V143 mit *Arabidopsis* Col-0 gezeigt werden (**Abb. 17**). Die beobachtete Korrelation zwischen der Cytokininreduktion und induzierter Seneszenz basiert wahrscheinlich auf Förderung des Cytokininabbaus durch Cytokininoxidasen, während gleichzeitig die Cytokininbiosynthese unverändert abläuft. Zur weiteren Klärung wurden Expressionsprofile der neun Isopentenyltransferasen (IPT) und der sieben Cytokininoxidasen (CKX) in *Arabidopsis* nach V143-Infektion erstellt. Da die unter Kurztagbedingungen angezogene, nicht blühende Rosette geerntet wurde, konnte aufgrund der Lokalisation oder entwicklungspezifischen Expression von einigen Genen kein Expressionsprofil aufgenommen werden.

Von *IPT1*, *IPT4*, *IPT5*, *IPT7* und *IPT8* konnte kein Expressionsprofil erstellt werden, da sie im Wurzelraum oder im Blütenstand entwicklungsbedingt exprimiert werden (Lokalisationsübersicht: Werner *et al.*, 2006). *IPT2*, *IPT3* und *IPT6* zeigten keine signifikante Induktion nach V143-Infektion und verhielten sich wie die Kontrollen, während *IPT9* leicht herunterreguliert war (**Abb. 48**). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass *Verticillium* nicht die Produktion von Cytokinin negativ beeinflusst oder die Pflanzen mit entsprechender Induktion der Isopentenyltransferasen auf die Cytokininreduktion antworten.

Die Expressionsprofile einiger Cytokininoxidasen hingegen zeigten deutliche Unterschiede zu den Kontrollen (**Abb. 13**, **Abb. 49**), mit denen sich die Degradation von Cytokininen zu den Zeitpunkten 14 bis 28 dpi erklären lässt. Zum Zeitpunkt 14 dpi war *CKX2*, 21 dpi waren *CKX1*, *CKX2*, *CKX3*, *CKX4* (schwach), *CKX5* (schwach) und 28 dpi *CKX2* (stark) und *CKX5* (schwach) induziert. Die restlichen *CKX*-Gene zeigten in diesem Versuch keine Induktion. Aus dem Expressionsprofil der durch *Verticillium*-Infektion beeinflussten *CKX*-Gene kann man schließen, dass die Hauptabnahme der Cytokinine demnach im Apex des Sprosses (*CKX1*, *CKX2*), in jungen Blättern (*CKX4*, *CKX5*), in den Blattachseln (*CKX5*) und in den Stipeln (*CKX2*, *CKX4*) stattfand (Werner *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2006). Die erhöhte Expression einiger *CKX*-Gene stellt wahrscheinlich den Hauptfaktor der Cytokininreduktion zu den Zeitpunkten 14 bis 21 dpi dar, erklärt allerdings nicht die starke Abnahme 7 dpi. Zum Zeitpunkt 7 dpi könnte der Transport von *tZ* oder *tZ* Ribosid aus der Wurzel über das Xylem

in oberirdische Bereiche oder eventuell auch die Synthese von Cytokinin im Wurzelbereich gestört sein. Genaue Aussagen lassen sich nicht treffen, da keine Expressionsstudien von Wurzelproben im Zeitverlauf durchgeführt wurden.

Die Annahme, dass Seneszenz-spezifische *CKX*-Gene existieren, während andere *CKX*-Gene keine Rolle in der Seneszenzausprägung spielen, könnte die Beobachtung erklären, dass in Reis oder *Arabidopsis* Einzel- beziehungsweise Doppelmutationen zu erhöhter Samenproduktion, aber nicht zu verzögerter Seneszenz führen (Ashikari *et al.*, 2005; Bartrina *et al.* 2011). Da die *Arabidopsis* Doppelmutante *ckx3 x ckx5* keinen veränderten Seneszenzphänotyp zeigte, gehen wir davon aus, dass die relativ geringen Induktionen von *CKX3* und *CKX5* während einer *Verticillium*-Infektion eher unbedeutend für die Auslösung der verfrühten Seneszenz sind. Wir postulieren, dass die im Kontrast zu *CKX3* und *CKX5* sehr starke Induktion von *CKX2* die Ursache für die beobachtete Abnahme der Zeatinkonzentration ist. Diese Annahme wird durch die hohe Substratspezifität von *CKX2* für Zeatin gestützt (Galuszka *et al.*, 2007). Weitere Rückschlüsse konnten nicht gezogen werden, da in der Literatur kein Beispiel zu durch Pathogenbefall ausgelöste Cytokinin-Reduktionen zu finden ist. *Plasmodiophora brassicae* moduliert zwar die Cytokininkonzentration der Pflanze, jedoch bewirkt dieses Pathogen im Kontrast zu VI43 eine Erhöhung der Cytokininkonzentration. Dieser Pilz unterdrückt für die Konzentrationserhöhung von Cytokinin die Cytokinin-Degradation. Durch hohe Cytokininkonzentrationen in Kombination mit erhöhten Auxin-Gehalten wird Gallenbildung für eine bessere Proliferation ausgelöst (Siemens *et al.*, 2006).

Wird in der Pflanze unter normalen Bedingungen Seneszenz induziert, so wird diese durch Veränderung des Hormonhaushaltes von Cytokinin gesteuert und über die Cytokinin-Signaltransduktion vermittelt. Während der Seneszenz kommt es zu einem typischen Expressionsprofil von Komponenten der Cytokininsignaltransduktion, bei dem A-Typ *ARRs* herunterreguliert und B-Typ *ARRs* hochreguliert sind (eFP-Browser Daten, <http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Bei der VI43-Infektion kam es auch zu diesem Muster und die Daten zeigen, dass die pathogeninduzierte Seneszenz einer natürlichen Seneszenz entspricht. Einen weiteren Hinweis für eine induzierte, aber natürlich ablaufende Seneszenz gab das Expressionsprofil des Seneszenzmarkergens *SAG12* (Gan und Amasino, 1995), das ab 14 dpi in VI43-infizierten Pflanzen stetig ansteigend induziert war (**Abb. 20**).

Die Cytokininmessungen und die Expressionsdaten zeigen, dass VI43 wahrscheinlich durch Modifikation der Cytokinin-Homöostase über *CKX*-Induktion in der Pflanze aktiv Seneszenz induzierte. In weiteren Versuchen wurde anschließend überprüft, ob eine Stabilisierung der

Cytokinin-Gehalte der induzierten Seneszenz entgegenwirkt und in Folge die Proliferation von VI43 abnimmt. Für diesen Zweck wurden zwei pharmakologische und ein transgener Ansatz gewählt.

Im ersten Experiment wurden *A. thaliana* Col-0 Pflanzen mit 6-Benzylaminopurin (BAP), einem künstlichen Cytokinin, behandelt und dann die Seneszenz quantifiziert durch die Anzahl von chlorotischen und nekrotischen Blättern. Die BAP-Behandlung führte zu einem drastischen Rückgang des Seneszenz-Phänotyps (**Abb. 14**). In früheren Experimenten von Corsini *et al.*, (1988) wurden auch Behandlungen mit Wachstumsregulatoren bei der Interaktion *V. dahliae* mit *Solanum tuberosum* durchgeführt. Dabei führte allerdings nur die Behandlung mit Auxin zu einem positiven Effekt, Cytokinin und Gibberellin zeigten in diesen Experimenten keinen messbaren Effekt. Die gewählten Konzentrationen waren im Verhältnis zu den in unseren Experimenten verwendeten relativ gering. Trotz der reduzierten Seneszenz nach BAP-Behandlung traten das *yellow vein-Symptom* sowie *stunting* weiterhin auf, so dass diese Phänotypen sich nicht über die Cytokininreduktion erklären lassen. Diese Aspekte werden im Transdifferenzierungsabschnitt diskutiert. Das *stunting* war aber geringer als in den Kontroll-behandelten infizierten Pflanzen aufgrund der größeren Blattfläche. Allerdings führte die Behandlung auch zu negativen Effekten, wie Wachstumsreduktionen bei den uninfizierten BAP-behandelten Kontrollpflanzen. Dies lässt sich durch die eingesetzten hohen, unphysiologischen BAP-Konzentration erklären (To *et al.*, 2004). Durch die Stabilisierung der Cytokinin-Homöostase nach BAP-Behandlung verringerte sich auch die Ausbreitung des Pilzes, der demnach die induzierte Seneszenz benötigt, um seinen Lebenszyklus optimal zu durchlaufen. In einem Wachstums-Assay konnte ausgeschlossen werden, dass BAP eine toxische Wirkung auf VI43 hat und dadurch die Proliferation stört. Von Prokopova *et al.* (2010) und Babosha *et al.* (2009) konnte gezeigt werden, dass in der Interaktion *Bremia lactuacae* mit *Lactuca sativa* oder *Erysiphe graminis* mit Weizen ebenfalls exogene Cytokininbehandlungen zu negativen Effekten für den Pilz führten. Im Gegensatz zu der indirekten Beeinflussung von VI43 durch BAP wirkten Cytokinine bei *E. graminis* und *B. lactuacae* jedoch direkt negativ auf die Sporulation und Proliferation der Pilze in der ektophytischen Phase.

Der zweite pharmakologische Ansatz führte zu Ergebnissen mit derselben Tendenz wie bei der BAP-Behandlung. Die Pflanzen wurden mit dem CKX-Inhibitor 2-chloro-6-(3-methoxyphenylamino) purine (INCYDE) besprüht (Zatloukal *et al.*, 2008), der durch kompetitive Hemmung alle sieben CKX-Enzyme blockiert. Durch die daraus resultierende künstliche Anreicherung pflanzeigener Cytokinine kommt es wie bei der BAP-Applikation

schon in den uninfizierten INCYDE-behandelten Kontrollpflanzen zu Wachstumsreduktionen, aber wahrscheinlich auch zu einer erhöhten Photosyntheserate, da die Pflanzen grüner aussehen und dementsprechend mehr Chlorophyll aufweisen. Allgemein kann durch Erhöhung der Cytokininkonzentration die Photosyntheserate positiv beeinflusst werden (Jordi *et al.*, 2000). Der Phänotyp INCYDE-behandelter VL43-infizierter Pflanzen zeigte vergleichbar der BAP-Behandlung einen drastischen Rückgang der Seneszenz und dem entsprechend des relativen *stuntings*. Die pilzliche Proliferation war dem BAP-Experiment vergleichbar stark reduziert. Es konnten daher dieselben Rückschlüsse hinsichtlich des Effekts von Cytokinin auf den pilzlichen Lebenszyklus getroffen werden. Desweiteren hatte INCYDE auch keine toxische Wirkung im sterilen Platten-Assay auf das Wachstum von VL43 gezeigt, so dass die Proliferationsinhibition durch Verzögerung der Seneszenz hervorgerufen wurde.

Für einen genetischen Ansatz zu Untersuchung der Rolle von Cytokinin für die VL43-Pathogenese wurden stabil transformierte Pflanzen mit dem pSAG12:IPT Konstrukt erstellt und homozygote Linien erzeugt (Gan und Amasino 1995; Noh und Amasino, 1999). Durch Alterung der Pflanzen wird ab einem bestimmten Zeitpunkt die Expression von *IPT* durch Aktivierung des Promotors vom Gen *SAG12* induziert. Dadurch kommt es zu einer Anreicherung von Cytokinin in der Pflanze und die transgenen Linien zeigen im uninfizierten Zustand einen um circa eine Woche verzögerten Seneszenzphänotyp, einen höheren Chlorophyllanteil und mehr Seitentriebe vergleichbar mit transgenen pSAG12:IPT Linien von Tabak, Klee und Broccoli (Gan und Amasino 1995; Calderini *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2001) (**Abb. 21**). Unter Kurztagbedingungen war der Phänotyp der transgenen Pflanzen gleich der Kontrolle, da im Zeitraum 7 bis 28 dpi kein Seneszenzprogramm in diesen Pflanzen ablief. Zum Zeitpunkt 35 dpi gab es immer noch keinen Unterschied zur Kontrolle, aber Transkript von *IPT* konnte in den pSAG12:IPT Linien teilweise nachgewiesen werden (**Abb. 50**). Die späte Induktion des *SAG12* Promotors zeigt, dass die Seneszenz unter den von uns gewählten Kurztagbedingungen sehr spät beginnt. Im Experiment sollte über die VL43-induzierte Seneszenz mittels pSAG12:IPT die Cytokinin-Biosynthese induziert und so die Cytokinin-Homöostase stabilisiert werden. In VL43-infizierten Pflanzen wurde ab 14 bis 21 dpi Cytokinin durch induzierte *IPT*-Expression produziert (**Abb. 50**), was zu einer reduzierten Seneszenz, geringerem *stunting* und verminderter Proliferation des Pilzes im Zeitverlauf führte. Die Effekte waren allerdings deutlich schwächer und nicht so homogen wie bei den pharmakologischen Applikationen. Wahrscheinlich lagen geringere Cytokininkonzentrationen als bei den pharmakologischen Ansätzen vor. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Interaktion von *Botrytis cinerea* mit transgenen pSAG12:IPT Tomatenlinien festgestellt (Swartzberg *et*

al., 2008). *Botrytis* induziert auch Seneszenz, die vergleichbar zu unserem System pSAG12- vermittelt die Expression von *IPT* induziert und so die Krankheitssymptome unterdrückt.

Grundsätzlich kann postuliert werden, dass *Verticillium longisporum* 43 Seneszenz durch Modifikation der Cytokinin-Homöostase der Pflanze induziert, um seinen Lebenszyklus zu vollenden. Durch Stabilisierung der Cytokinin-Homöostase kann die Induktion der Seneszenz verhindert werden, so dass der Pilz langsamer proliferiert und viel später erst seinen Lebenszyklus abschließen kann. Die Methode der Phytohormonmodulation bei Pflanzen bietet dem Pilz den Vorteil, sich schnellstmöglich zu verbreiten, ohne auf die natürliche entwicklungsbedingte Seneszenz der Pflanze angewiesen zu sein.

4.3 Charakterisierung der *V.longisporum* 43-induzierten Transdifferenzierung von Bündelscheidezellen zu *de novo* Xylemelementen

Während dieser Arbeit konnte erstmalig ein Prozess in Blättern beobachtet werden, der als pathogeninduzierte Transdifferenzierung eingeordnet werden kann. VL43 induziert spezifisch *de novo* Xylembildung aus Bündelscheidezellen in der gesamten Rosette der Pflanze. Im Allgemeinen versteht man unter einer Transdifferenzierung die Dedifferenzierung einer Zelle, egal welchen Typs, und die anschließende Differenzierung zu einer Zelle mit neuer Bestimmung (Turner *et al.*, 2007). In diesem Fall wurden neue Xylemelemente gebildet. Um auszuschließen, dass die Transdifferenzierung ein spezifisches Phänomen der Interaktion von VL43 mit *A. thaliana* ist, wurde der *V. longisporum* Hauptwirt *Brassica napus* (Sorte: Drakkar) auf VL43-induzierte Transdifferenzierung untersucht (**Abb. 28**). In VL43-infizierten *Brassica napus* Pflanzen wurde ebenfalls Transdifferenzierung der Blatt-Bündelscheidezellen beobachtet. Zusätzlich wurden *Nicotiana benthamiana* und *Solanum lycopersicum* (Sorte: Money Maker) mit *Verticillium dahliae* 380 (Vd830) infiziert und parallel auch auf *de novo* Xylemelemente untersucht (**Abb. 38**, **Abb. 39**). In infizierten Tomaten konnte in chlorotischen Blattrandbereichen und in infizierten Tabakpflanzen über das Blatt verteilt Transdifferenzierung beobachtet werden. Aufgrund der hoch kompatiblen Interaktion zwischen Vd830 und Tabak kam es zu Welke, erhöhter Zelltodrate und es konnten nur vereinzelt transdifferenzierte Zellen beobachtet werden. Der Welke-Phänotyp wurde wahrscheinlich durch die Abgabe von toxischen Substanzen induziert (Wang *et al.*, 2004). Allgemein lässt sich aus diesen Beobachtungen schlussfolgern, dass der Prozess der Transdifferenzierung von Bündelscheidezellen zu *de novo* Xylemelementen nicht VL43-

Brassicaceae spezifisch ist, sondern auch an *Solanaceae* von anderen *Verticillium*-Gattungen während der Pathogenese ausgelöst werden kann. Dieser Prozess in Blättern wurde noch in keiner anderen Interaktion zwischen Pilzen und Pflanzen beobachtet. Die von Baayen (1986) berichtete pathogeninduzierte Xylembildung in Nelke verläuft nach einem anderen Muster: *Fusarium oxysporum* induziert Xylemelement-Regeneration im Stängel von Nelken im zuvor gebildeten hyperplastischen Xylemparenchym. Die *de novo* Xylemelemente werden erst nach der Hyperplasie-Reaktion gebildet und verlaufen neben dem ursprünglichen Xylem, welches durch Hyphen oder Gelbildung verstopft ist (Harling *et al.*, 1984).

In infizierten *Arabidopsis*-Pflanzen wurde der Zeitverlauf der Transdifferenzierung charakterisiert. Des Weiteren wurde untersucht, mit welchen weiteren Krankheitssymptomen die *de novo* Xylembildung im Zusammenhang steht. Interessanterweise korrelierte die Transdifferenzierung von Bündelscheidezellen mit dem *yellow vein*-Symptom und *stunting* (**Abb. 25**). Alle diese Symptome wurden ab 14 Tagen nach Infektion (dpi) beobachtet. Ab diesem Zeitpunkt nimmt die Transdifferenzierungsrate kontinuierlich stark zu, so dass 28 dpi etwa 70 - 80 % der Bündelscheidezellen (BSZ) transdifferenziert waren. Einige der neuen Xylemelemente ähnelten aufgrund ihrer spiralförmigen Struktur Protoxylem und andere Elemente sahen durch ihre netzartigen Strukturen Metaxylem-ähnlich aus. Teilweise ließen sich in einem Element ansatzweise beide Strukturen beobachten. In der vaskulären Morphogenese spielen *Vascular Related Nac Domain* Transkriptionsfaktoren (VNDs) eine wichtige Rolle (Kubo *et al.*, 2005). Die Funktionen von *Arabidopsis VND1* bis *VND5* konnten bisher nicht bestimmt werden. *VND6* und *VND7* werden als Regulatoren für Metaxylem beziehungsweise Protoxylembildung eingeordnet.

Das *yellow vein*-Symptom basiert demnach auf der Degradation der Chloroplasten in BSZ während der Dedifferenzierung und anschließender Differenzierung zu *de novo* Xylem. Die Chloroplastendegradation in Bündelscheidezellen führt zu Seneszenz und reduzierter Pflanzenvitalität (Janacek *et al.*, 2009). Des Weiteren lässt sich durch diesen Prozess möglicherweise auch der *stunting*-Phänotyp von infizierten Pflanzen erklären. Zum Zeitpunkt 14 dpi befindet sich die Pflanze noch im Wachstum, mit Zellteilung in meristematischen Geweben und Zellelongation. Durch die Transdifferenzierung zu Protoxylem- und Metaxylem-ähnlichen Strukturen wird das Leitgefäßsystem mit nicht streckungsfähigen Zellen ummantelt und blockiert dadurch die Zellelongation der übrigen Zellen, wie zum Beispiel der Epidermis- oder Mesophyllzellen. Das *stunting* wird dabei wahrscheinlich durch den Metaxylemanteil der Transdifferenzierung bewirkt, da Metaxylem nicht mehr streckungsfähig ist. Außerdem lässt sich durch diese Strukturänderung auch der Phänotyp der

gerollten Blätter erklären. Die Gruppe Kubo *et al.* (2005) produzierte *VND7* Überexpressionslinien in *Arabidopsis*, die ektopische Transdifferenzierung verschiedener Zelltypen aufwiesen. Diese Pflanzen zeigten ebenfalls Kleinwuchs und leichtes Blattrollen (**Abb. 32**). Ein weiteres Indiz, dass der *stunting*-Phänotyp mit der Transdifferenzierung zusammenhängt, gaben *Arabidopsis*-Linien in denen *Verticillium*-induzierte Transdifferenzierung supprimiert ist (**Abb. 40**). Durch Inhibierung der Transdifferenzierung war in den transgenen Linien das Ausmaß des *stuntings* nach Infektion stark reduziert und der Phänotyp des Blattrollens war nicht mehr zu beobachten. Die nicht auf Transdifferenzierung zurückzuführende Wachstumsreduktion wurde wahrscheinlich durch vom Pilz abgegebene toxische Substanzen ausgelöst (Wang *et al.*, 2004).

Neben der Transdifferenzierung der Blattleitgefäße kam es auch zu Transdifferenzierungsprozessen im Leitgefäßsystem der Mittelrippe eines Blattes (**Abb. 26**) und ektopischer Xylembildung ausgehend von Epidermiszellen im Bereich des Überganges der Wurzel zum Hypokotyl (**Abb. 27**). Im Mittelrippenleitgefäßsystem der Blätter transdifferenzierten auch die Bündelscheidezellen zu *de novo* Xylemelementen. Zudem ließ sich die Bildung von hyperplastischem Xylem beobachten, die auf erhöhter Aktivität des Kambiums basiert. Die Hyperplasie konnte schon in vielen Pilz-Pflanze-Interaktionen gezeigt werden; unter anderem in der Interaktion von *Verticillium albo-atrum* mit Hopfen, *F. oxysporum* mit Nelke oder *Ceratocystis fagacearum* mit Eiche (Talboys, 1958; Harling *et al.*, 1984; Schoeneweiss, 1959). Hyperplastisches Xylem wird nach Pathogenbefall zur Aufrechterhaltung des Wassertransportes gebildet, da das ursprüngliche Xylemgefäßsystem durch Pilzhyphen oder aufgrund von Abwehrreaktionen der Pflanze mit Gelen und Tylosen verstopft ist. Die Transdifferenzierung von Bündelscheidezellen des Mittelrippenleitgefäßsystems zu Xylemelementen könnte *Verticillium*-spezifisch sein und wurde bis jetzt noch nicht in anderen Pflanze-Pathogen-Interaktionen beschrieben. Die ektopische Bildung von Xylemelementen aus Wurzelepidermiszellen, visualisiert durch 35S:MAP4-GFP (Marc *et al.*, 1998), hat wahrscheinlich keine größere Bedeutung. Sie scheinen keine Funktion zu haben, da sie isoliert von existierendem Xylem vorliegen und nur selten in Bereichen des Wurzel-Hypokotylübergangs zu finden waren.

Expressionsanalysen der *VNDs* in ganzen Rosetten zeigten mit Ausnahme von *VND3* ab dem Zeitpunkt 14 dpi korrelierend mit dem Blattphänotyp der Transdifferenzierung eine schwache bis starke Induktion nach V143-Infektion, (**Abb. 29**, **Abb. 52**). Das in der Protoxylembildung involvierte *VND7* ist 4- bis 7-mal stärker induziert als *VND6*. Dieses Expressionsprofil korreliert mit der Beobachtung, dass die durch Transdifferenzierung gebildeten

Xylemelemente meist Protoxylem-ähnlich sind beziehungsweise der Protoxylemanteil in einem *de novo* Xylemelement deutlich höher ist. Bei *VND7* kam es bereits zum Zeitpunkt 7 dpi zu einem leichten Expressionsanstieg, was darauf hinweist, dass der Prozess der Transdifferenzierung relativ früh in der Pflanze induziert wird. Inwieweit die starken Induktionen von *VND1*, 2, 4 und 5 eine Rolle in der *de novo* Xylembildung spielen ist nicht zu erklären, da ihre Funktionen noch nicht beschrieben werden konnten (Kubo *et al.*, 2005).

Promotor-Reporter-GUS-Studien von *VND7* unterstützten die Daten der Expressionsanalysen. Vom Zeitpunkt 7 dpi an konnte eine kontinuierlich starke GUS-Aktivität in VL43-infizierten Pflanzen gemessen werden. Histologische Analysen zeigten eine schwache GUS-Färbung im Leitgefäßsystem der Kontrollen und zusätzlich eine starke Färbung in BSZ der infizierten Pflanzen. 14 dpi war die GUS-Färbung in transdifferenzierten Zellen noch nachweisbar, aber die GUS-Aktivität war weitaus schwächer als zum Zeitpunkt 7 dpi. Die Abnahme der Färbung lässt sich durch die Apoptose der Zelle während der Transdifferenzierung erklären und der daraus rückgängigen Transkriptmenge von *VND7*. Allgemein konnte in den Kontrollen sowie in den infizierten nur eine GUS-Färbung in Bereichen beobachtet werden, in denen aktuell Differenzierung stattfand.

Als weitere Kontrolle für die Bedeutung der VNDs in der pathogeninduzierten Transdifferenzierung wurde die Expression von *Asymmetric Leaves2-Like19* (*ASL19*) und *ASL20* überprüft. Diese Gene wirken in einer *feedback*-Schleife mit *VND6* und *VND7* und greifen somit regulatorisch in die Xylemdifferenzierung ein (Soyano *et al.*, 2008). Die Expressionsanalysen zeigten, dass sich beide Gene in ihrer Expression während der *Verticillium*-Infektion ähnlich wie *VND6* und *VND7* verhalten (**Abb. 31**).

Der pathogeninduzierten Transdifferenzierung liegen dementsprechend ähnliche Mechanismen zugrunde, wie sie während der natürlichen Xylemdifferenzierung ablaufen (Turner *et al.*, 2007; Ohashi und Fukuda, 2010). Inwieweit diese starke Veränderung der pflanzlichen Morphologie eine biologische Relevanz für den Pilz oder für die Pflanze selbst hat, wird im nächsten Kapitel diskutiert.

4.3.1 Biologische Relevanz der Transdifferenzierung

Zur Klärung der biologischen Relevanz wurden folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

1. Die Transdifferenzierung fördert die Proliferation von VI43 in der Pflanze.
2. Der Wassertransport in der Pflanze wird durch Neubildung von Xylem aufrechterhalten und verhindert Welke.
3. Die Transdifferenzierung blockiert teilweise die Seneszenz-bedingte Nährstoffrückgewinnung in der Pflanze aus mit *Verticillium*-infizierten Blättern.

Die drei Arbeitshypothesen werden im Folgenden diskutiert:

De novo Xylemelemente fördern die Proliferation von VI43

Viele pflanzenpathogene Organismen, seien es Pilze oder Bakterien, modifizieren ihren Wirt morphologisch, um besser proliferieren zu können. Dafür induziert *Agrobacterium tumefaciens* Tumorbildung in der Pflanze (Akiyoshi *et al.*, 1984), *Plasmodiophora brassicae* Gallenbildung (Siemens *et al.*, 2006) und *Ustilago maydis* Maisbeulenbrand zur Sporulation (Brefort *et al.* 2009). Da es sich bei *Verticillium longisporum* um ein vaskuläres Pathogen handelt, könnte die Möglichkeit bestehen, dass der Pilz die Transdifferenzierung aktiv induziert, um seinen Wirt besser besiedeln zu können. Hinweise lieferten Infektionsversuche mit VI43 und VND7-Überexpressionslinien, die ektopische Xylembildung in der ganzen Pflanze zeigen (Kubo *et al.* 2005). In dem Versuch erfolgte die Infektion ohne mechanische Verletzung der Wurzeln, so dass der Pilz auf natürliche Weise penetrieren musste. Dabei konnte beobachtet werden, dass VI43 in *A. thaliana* Col-0 Pflanzen nur eine schwache Symptomatik mit einigen chlorotischen Blättern und kein *stunting* im Versuchszeitraum auslöste. Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit dem Infektionsablauf in der Natur. Die VND-Überexpressionslinie zeigte hingegen eine starke Symptomausprägung mit chlorotischen und nekrotischen Blättern, starkem *stunting* und Absterben einiger Pflanzen während des Versuchszeitraums (**Abb. 32**). Dieser Symptomverlauf ist vergleichbar mit einer Col-0 Erdinfektion nach mechanischer Wurzelverwundung unter Laborverhältnissen (Veronese *et al.*, 2003). Demzufolge förderte das artifiziell gebildete Xylem das Eindringen und eventuell auch die Proliferation des Pilzes. Betrachtet man die Penetration und den Infektionsverlauf im Wurzelraum der 35S:VND7 Linie, wird klar, warum der Pilz sich so stark ausbreitete (**Abb. 33**). In der Wurzel der 35S:VND7 Linie sind unregelmäßig Zellen des Parenchyms, der

Endodermis, des Perizykels oder des Zentralzylinders transdifferenziert mit Ausnahme der Epidermis. Zusätzlich förderte das transdifferenzierte Parenchym die Ausbreitung des Pilzes in Richtung Zentralzylinder, da er von transdifferenziertem Xylemelement zu Xylemelement intrazellulär schneller wachsen konnte als in Col-0 Wurzeln. Hauptsächlich half dem Pilz aber die Aufhebung der natürlichen Blockade der Endodermis (Pegg und Brady 2002). Neben den endodermisfreien Zonen der Wurzel konnte der Pilz den Zentralzylinder nun auch über transdifferenzierte Endodermiszellen über die gesamte Wurzel besiedeln. Folglich stieg im Vergleich zu Col-0 der prozentuale Anteil an Pilz, der den Zentralzylinder erreichte und sich über das vaskuläre System verbreitete. Durch diese geförderte Besiedlung wuchs der Pilz in Sterilkultur auch proportional schneller auf der Wurzeloberfläche von 35S:VND7-Wurzeln, als auf Col-0 Pflanzen (**Abb. 34**). Die erhöhte Anfälligkeit der VND7-Überexpressionspflanzen gegenüber V143 resultiert daher aus dem Fehlen der Endodermis in Bereichen in denen die Endodermiszellen zu Xylem umgewandelt wurden. Das Durchbrechen der Endodermisbarriere erlaubte eine stärkere massive Besiedlung als in Kontrollpflanzen.

Betrachtet man hingegen die *de novo* Xylemelemente aus BSZ in V143-infizierten Col-0 Pflanzen, so scheinen diese nicht zu erhöhter Proliferation zu führen. In **Abb. 36** werden Trypan-Blau gefärbte transdifferenzierte BSZ 28 dpi gezeigt, in denen kein Pilz zu sehen ist. Außerdem konnte zu keinem Zeitpunkt V143-Wachstum in transdifferenzierten BSZ dokumentiert werden. Dies führt zu dem Schluss, dass die Xylemelemente nicht der Proliferation des Pilzes dienen, in Kontrast zu der 35S:VND7 Linie, bei der sie im Wurzelraum förderlich waren.

Falls der Pilz die *de novo* Xylemelemente für seine Proliferation nutzen sollte, so besteht die Möglichkeit, dass er Transdifferenzierung aktiv induziert. Zur Klärung wurden auf V143-Flüssigkultur basierende Extrakte, Kulturmedienüberstände, Xylemsaft von infizierten *Brassica napus* Pflanzen sowie apoplastische Waschflüssigkeit von *Arabidopsis* und *Brassica napus* in einem Zellkulturassay auf Transdifferenzierungsaktivität getestet (Kubo *et al.* 2005) (**Abb. 35**, **Abb. 53** - **Abb. 55**). In einigen Untersuchungsansätzen wurde eine erhöhte Zellsterberate, die wahrscheinlich auf toxischen Proteinen (Wang *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2006) oder auf einer Abwehrreaktion gegenüber Chitin basiert (Miya *et al.*, 2007), beobachtet. Eine Transdifferenzierung oder eine erhöhte Transdifferenzierungsrate wurde durch die getesteten Extrakte in dem Zellkulturassay nicht ausgelöst. V143 scheint demnach nicht aktiv Metabolite zu produzieren, die in der Lage sind, Transdifferenzierung auslösen oder aber, der Prozess wurde von der Zellsterberate vollständig überlagert und konnte daher nicht beobachtet werden.

Nach dem derzeitigen Standpunkt widerlegen die Daten die Hypothese der Proliferationsförderung. *Verticillium* war nicht in transdifferenzierten BSZ zu finden und Pilzextrakte oder Extrakte aus infizierten Pflanzen induzierten keine Transdifferenzierung im Zellkulturassay. Die stärkere Symptomausprägung der VND7-Überexpressionslinie ist wahrscheinlich nicht auf eine Förderung der pilzlichen Proliferation zurückzuführen. Sie beruht hauptsächlich auf der modifizierten Endodermis, die eine Eintrittspforte für den Pilz darstellt und somit die Penetrationsrate des Pilzes erhöht.

De novo Xylemelemente dienen der Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes

Nachdem die Proliferationstheorie durch experimentelle Daten nicht gestützt werden konnte, wurde die Rolle der *de novo* Elemente für die Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes infizierter Pflanzen untersucht. *Verticillium*-infizierte Pflanzen bilden hyperplastisches Xylem, um die mit Tylosen oder Gelen blockierten Xylemgefäße zu ersetzen, so dass der Transpirationssog bestehen bleibt (Talboys, 1958). Dieser Prozess, der auf erhöhter kambialer Aktivität beruht, ist eine Nebenreaktion der Pilzabwehr. Im Blattleitgefäßsystem ist Thyllenbildung um den Pilz am Wachstum zu hindern nicht möglich. Thyllenbildung geht von Xylemparenchymzellen aus, die nicht im Blattleitgefäßsystem von *Arabidopsis* vorliegen. Da keine Thyllenbildung abläuft könnte der Pilz ungehindert das Leitgefäßsystem besiedeln und es somit verstopfen. Dies führte zu der Theorie, dass die Pflanze BSZ transdifferenzieren lässt, um mit VI43 verstopfte Gefäße zu umgehen. Floerl *et al.* (2010) zeigte durch Messungen des osmotischen Drucks und des relativen Wassergehaltes, dass VI43 keinen negativen Einfluss auf den Wasserhaushalt hat. Es ist zu klären, inwieweit transdifferenzierte BSZ dazu beitragen, den Wasserhaushalt infizierter Pflanzen zu stabilisieren. Zur Überprüfung, ob die *de novo* Xylemelemente funktional sind und zum Wassertransport beitragen können, wurden die Blätter mit Safranin-O Lösung "gefüttert" (Freeman *et al.*, 2009). Safranin-O färbte alle Xylemstrukturen und den Xylemsaft des ursprünglichen Leitgefäßsystems sowie der *de novo* Xylemelemente (**Abb. 37**). Demnach sind die transdifferenzierten BSZ funktional und mit dem ursprünglichen Leitsystem verbunden. Allerdings konnten in infizierten Blättern keine Bereiche gefunden werden, die nicht gefärbt waren. Dies lässt den Schluss zu, dass VI43 das Leitgefäßsystem nicht komplett blockiert, sondern den Transpirationssog wahrscheinlich nur reduziert.

Um eine Korrelation zwischen der Stabilisierung der Wasserhaushaltes und der Bildung von *de novo* Xylemelementen zu finden, wurden Infektionen mit *Verticillium dahliae* (Stamm

Vd830) durchgeführt. Vd830 induziert bei hoch kompatibler Pathogen-Wirt-Interaktion Welke (Talboys 1964; Fradin und Thomma 2006), die möglicherweise durch die *de novo* Xylemelementbildung bei VI43 verhindert wird. Allerdings ist zu beachten, dass Welke auch durch vom Pilz sezernierte Proteine induziert werden kann (Wang *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2006) und nicht nur durch Wassermangel.

Es wurde *Solanum lycopersicum* (Rheinlands Ruhm) mit Vd830 infiziert, wobei es zu keinen Welke-Symptomen, aber zur Transdifferenzierung von BSZ in chlorotischen Blattrandbereichen kam (**Abb. 38**). Die Pathogen-Wirt-Interaktion war im dokumentierten Zeitbereich relativ schwach, da es nur zu geringem *stunting* und einigen Chlorosen kam. Entsprechend unserer Hypothese könnten die *de novo* Xylemelemente Welke in infizierten Bereichen verhindern.

Die Infektion von *Nicotiana benthamiana* mit Vd830 verlief deutlich stärker als die von *S. lycopersicum* (**Abb. 39**). Im dokumentierten Zeitbereich kam es schon ab 7 dpi zu einer deutlichen Symptomausbildung mit *stunting*, beginnender Welke und Reduktion des Chlorophylls. Bereits 14 dpi waren einige Pflanzen abgestorben, andere zeigten ausgeprägteres *stunting* und chlorotische sowie nekrotische Blätter. Ausgehend vom Xylem kam es zu Zelltod der BSZ und der Mesophyllzellen vergleichbar mit der Situation in infiziertem Hopfen (Talboys, 1958). In diesen Zellen waren bräunliche, granulierte Strukturen zu erkennen. Transdifferenzierte Zellen konnten nur vereinzelt gefunden werden. Bei dieser hoch kompatiblen Interaktion wurde das *stunting* nicht durch Transdifferenzierung ausgelöst, sondern durch Schädigung der Pflanze und daraus folgendem Zelltod. Die granulierten Strukturen könnten auf kollabierte Vakuolen, Chloroplasten und Zellinhalte zurückzuführen sein. Möglicherweise wurde der Prozess der Xylemneudifferenzierung durch zu hohe Toxin-Konzentrationen gestört (Wang *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2006), so dass dieser, abgesehen von Transdifferenzierung einzelner Zellen, nicht ablaufen konnte. In wie weit ein Zusammenhang zwischen möglichen Toxinen und mangelnder Transdifferenzierung für den Ausbildung des Welke-Phänotyps besteht, könnte durch Induzierung von zusätzlichen Xylemelementen in Tabak geklärt werden. Diese müsste allerdings spezifisch zur Transdifferenzierung von BSZ zu *de novo* Xylem führen. Zusammenfassend lassen die Daten die Interpretation zu, dass es mangels unvollständiger Transdifferenzierung und einer möglichen starker Toxinwirkung zu Welkeerscheinungen, basierend auf einer Störung des Wasserhaushaltes, kommt.

Zur weiteren Untersuchung der Arbeitshypothese, dass *de novo* Xylemelemente der Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes dienen, wurden transgene Linien erzeugt, die nicht

mehr oder nur teilweise in der Lage sind, Transdifferenzierung durchzuführen (**Abb. 40**). In Anlehnung an die Arbeit von Kubo *et al.* (2005) wurden transgene *A. thaliana* Col-0 Pflanzen mit dem Konstrukt pPer21:VND7-SRDX transformiert. Der Promotor *PER21* ist in infizierten Pflanzen ab 9 dpi induziert (Tappe, 2008), so dass die Repression der Transdifferenzierung durch *Verticillium*-Infektion ausgelöst wird. Durch Inhibition der Transdifferenzierung kam es zu einer deutlichen Veränderung der Symptomentwicklung (**Abb. 40**). Die Pflanzen zeigten allerdings keine Welke. Die Hypothese, dass *de novo* Xylemelemente den Wasserhaushalt stabilisieren kann dementsprechend nicht zu treffen. Des Weiteren zeigten sie reduziertes *stunting* (diskutiert in Kapitel 4.3), keine Störung der VI43-Proliferation und eine nahezu gleiche Anzahl von chlorotischen und nekrotischen Blättern wie Col-0 (**Abb. 41**). Der untere Teil der Rosette prägte deutliche Krankheitssymptome aus, der obere hingegen sah relativ gering infiziert aus. Die Blätter waren grüner und deutlich größer als bei Col-0 infizierten Pflanzen. Die Entstehung des Phänotyps wird im nächsten Teil diskutiert.

Des Weiteren kam es im Leitgefäßsystem der Mittelrippe der transgenen Linie 22 zur vollständigen Repression der Bildung von *de novo* Xylemelementen aus BSZ (**Abb. 42**). Interessanterweise fand auch keine hyperplastische Xylembildung statt, deren Bildung dementsprechend auch auf den VNDs beruhen muss. Da es in den transgenen Linien zu keiner Welke kommt, scheint *Arabidopsis* nicht mit Thyllenbildung und Gelen auf eine *Verticillium*-Infektion als Abwehr zu reagieren (Thyllen und Gele wurden nicht in mikroskopischen Untersuchungen gefunden: interne Kommunikation mit der AG Polle). Demzufolge wird das Leitgefäßsystem wahrscheinlich nur teilweise von VI43 besiedelt, so dass der Transpirationssog in der transgenen Linie durch die pilzlichen Verstopfungen nicht signifikant beeinflusst wird.

Da es scheint, dass die Transdifferenzierung der BSZ keine wichtige Funktion für die Wasser-Homöostase hat, könnte sie eine Rolle in der Nährstoffrückgewinnung beziehungsweise Nährstoffverteilung in der Pflanze spielen. Diese Hypothese wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

BSZ-Transdifferenzierung blockiert teilweise die Seneszenz-bedingte Nährstoffverteilung in der Pflanze

Die dritte Hypothese beruht auf der Überlegung, dass die durch den Pilz ausgelöste Seneszenz zu einem Nährstoffexport in dem betroffenen Blatt führen würde. Transdifferenzierung der BSZ unterdrückt möglicherweise den Nährstoffexport aus dem befallenen Blatt, so dass der

Pilz diese Nährstoffe in der nekrotrophen Phase weiterhin zur Verfügung hat (Leegood, 2008).

In C3-Pflanzen bestehen Bündelscheidezellen aus einem Kranz dicht gepackter Parenchymzellen, die das vaskuläre System in Blättern umschließen und somit zwischen Mesophyll und vaskulärem Gewebe lokalisiert sind (Lüttge *et al.*, 2002). Dementsprechend können die BSZ als Verbindung zwischen beiden Geweben angesehen werden. Interessanterweise beinhalten die BSZ circa 15 % der Chloroplasten eines Blattes und spielen eine wichtige Rolle in der Photosynthese (Kinsman und Pyke 1998). Von Jynacek *et al.* (2009) wurde gezeigt, dass die Photosynthese in BSZ eine wichtige Rolle für den Shikimat-Biosyntheseweg, die Ausbildung der Seneszenz und die Pflanzenvitalität spielt. Über ein trans-aktiviertes *hairpin* Konstrukt des Chlorophyllsynthasegens (CS) konnte gezielt die Chlorophyll-Akkumulation in BSZ reduziert werden. Daraus resultierte ein *yellow vein*-Symptom vergleichbar mit dem durch VI43-Infektion ausgelösten Symptom. Des Weiteren regulieren die BSZ den Import von Wasser und Nährstoffen in das Blatt, besonders in der Entwicklung, aber auch den Export während der Seneszenz (Leegood, 2008). Durch *source*- und *sink*-Verhältnisse in der Pflanze werden Nährstofftransporte maßgeblich gesteuert. Für folgende Prozesse wie Stickstoffimport und -export (Brugiere *et al.*, 2005; Kichey *et al.*, 2005), Schwefelassimilation (Takahashi *et al.*, 2000) oder Kohlenhydratsynthese (Koroleva *et al.*, 2000) konnten Zusammenhänge in Bezug auf BSZ in Abhängigkeit vom Entwicklungsgrad der Pflanze beschrieben werden.

Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, inwieweit *source-sink* Verhältnisse durch *Verticillium*-Infektion beeinflusst werden, wurde ein Versuch mit radiomarkierter ¹⁴C-Glukose durchgeführt (**Abb. 43**).

In diesem Versuch wurde pro Pflanze ein *source*-Blatt von *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen und transgenen pPer21:VND7-SRDX (L18) Pflanzen, jeweils infiziert und nicht infiziert, mit ¹⁴C-Glukose (= ¹⁴C-Blatt) gefüttert. Von den Pflanzen wurden Autoradiogramme erstellt und zusätzlich die Radioaktivität in *source*- und *sink*- Blättern nach Veraschung der Proben direkt gemessen. Bei allen Ansätzen fand so gut wie kein Transport in Richtung alter Blätter statt (vor ¹⁴C-Blatt). Dadurch konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem ausgewählten Blatt (7tes-10tes der Rosette von 21 dpi alten Pflanzen) definitiv um ein *source*-Blatt der Pflanze handelte. Ein Transport fand nur in Richtung der Blätter nach dem ¹⁴C-Blatt statt und in die Rosettenspitze. Die Ergebnisse zeigten, dass die transgene Linie (L18) tendenziell mehr Saccharose (¹⁴C-Glukose wird in Saccharose eingebaut) exportieren kann als Col-0. Dieses Phänomen beruht wahrscheinlich auf der reduzierten Transdifferenzierungsrate in der Linie

(L18). Der Transport in die *sink*-Blätter nach dem ^{14}C -Blatt war in Col-0 Kontrollpflanzen höher als in infizierten. Dies entspricht der Theorie, dass die Transdifferenzierung den Transport teilweise inhibiert. Die *sink*-Stärke in dem Vegetationskegel war deutlicher höher als in *sink*-Blättern, da die Nährstoffe in der Spitze für weiteres Wachstum gebraucht werden. Verantwortlich könnte dafür die geringere Transdifferenzierungsrate in jungen Blättern der Rosettenspitze sein (nicht dokumentierte Beobachtung) im Vergleich zu *source*-Blättern oder der bereits im Transdifferenzierungsprozess befindlichen *sink*-Blätter. Demnach könnten die *de novo* gebildeten Xylemelemente den Reimport inhibieren.

In der L18-Linie war dieses Phänomen nicht zu beobachten, da es in der Linie nur zur vereinzelt Bildung von *de novo* Xylemelementen kam und somit konnte die ^{14}C -Glukose in die *sink*-Blätter und den Vegetationskegel ohne Störung reimportiert werden. Dabei war der Transport in die *sink*-Blätter deutlich höher als bei V143-infizierten Col-0 Pflanzen. Der Phänotyp der physiologisch geteilten Rosette lässt sich durch diese Beobachtungen erklären. Durch eine stärkere Rückgewinnung von Nährstoffen aus infizierten, seneszenten Blättern wuchs in den transgenen Pflanzen der *sink*-Bereich der Rosette deutlich besser und sah proportional zu infizierten Col-0 Pflanzen wesentlich vitaler und grüner aus.

Die "Gesamt" Radioaktivität der einzelnen Ansätze zeigte, dass die V143-infizierten L18 Pflanzen mehr ^{14}C -Glukose aufgenommen hatten als Col-0 und die nicht infizierten L18. Dementsprechend könnte eine V143-Infektion in diesem Experimentaufbau bei fehlender Transdifferenzierung zu höheren Aufnahmeleistungen führen.

Der Transportversuch ergab erste Erkenntnisse, dass die Transdifferenzierung der BSZ möglicherweise einen negativen Effekt auf die Verteilung von Saccharose in V143-infizierten Col-0 Pflanzen im Kontrast zu der transgenen Linie hat. Zum einen ist der Saccharoseimport in den *sink*-Bereich gestört und zum anderen resultiert die Transdifferenzierung in einer geringeren Exportrate aus seneszenten Blättern. Diese beiden Aspekte könnten zu einer Nährstoffanreicherung in den infizierten Blättern führen und dem pilzlichen Wachstum förderlich sein.

Weitergehende Analysen sind nötig, um zu zeigen, dass die Hypothese zum Einfluss von Transdifferenzierung auf Nährstoffexport aus infizierten Blättern vertretbar ist. Der Saccharosetransportversuch erlaubt keine Rückschlüsse auf den Transport anderer Nährstoffe. In weiteren Experimenten, wie $^{14}\text{CO}_2$ -Begasung oder Transporteranalysen, wie zum Beispiel des Saccharosetransporters SUC2, soll die Hypothese im Detail weiter überprüft werden. Eine Nährstoffanalyse in der physiologisch geteilten Rosette der transgenen Linie nach V143-Infektion könnte weitere Hinweise auf eine Inhibition des Nährstofftransportes geben.

5. Zusammenfassung

Verticillium longisporum (V143) ist ein bodenbürtiger Pilz, dessen Hauptwirt Raps ist. V143 infiziert die Pflanzen über die Wurzeln und breitet sich systemisch über das Leitgefäßsystem in der Pflanze aus. Es konnte in dieser Arbeit erfolgreich ein *in vitro*-Assay etabliert werden, der eine zellbiologische Charakterisierung der Proliferation von *Verticillium* in *Arabidopsis* Wurzeln erlaubte und der für etwaige "Mutantenscreens" verwendet werden könnte. Die Analysen zeigten, dass *V. longisporum* über endodermisfreie Zonen, wie zum Beispiel der Wurzelspitze, das Leitgefäßsystem besiedelte. Ansonsten wurde die Ausbreitung des Pilzes von der Endodermis in der Wurzeldifferenzierungszone blockiert. Der systemische Infektionsverlauf von V143 in *Arabidopsis* wurde weiter in den Blättern zellbiologisch analysiert und dabei konnte spezifisch in Blattgeweben ein Transdifferenzierungsphänomen beobachtet werden. Die allgemeine Symptomentwicklung mit *stunting*, *yellow-veins* und verfrühter Seneszenz zeigte in Raps und *Arabidopsis* unter Laborbedingungen keine Unterschiede, so dass die Modellpflanze *Arabidopsis* für Infektionsanalysen genutzt werden konnte. Der Fokus dieser Arbeit lag auf den Symptomen der verfrühten (induzierten) Seneszenz und der beobachteten Transdifferenzierung von Bündelscheidezellen zu *de novo* Xylemelementen.

Die Ergebnisse der Arbeit deuten an, dass *V. longisporum* aktiv Seneszenz induziert, um die nekrotrophe Phase des Pilzes und die Vollendung seines Lebenszyklus vorzubereiten. Es kam von frühen Zeitpunkten der Infektion an zu einer starken Reduktion der Cytokininkonzentration, die als Folge Seneszenz auslöste. Die Modifikation der Cytokinin-Homöostase wird durch erhöhte Expression der Cytokininoxidasen bewirkt, wobei der genaue Mechanismus, wie *Verticillium* dies steuert, weiterhin unbekannt ist. Durch pharmakologische und genetische Ansätze konnte eine Stabilisierung der Cytokinin-Homöostase erreicht werden, die zu einer deutlichen Reduktion der V143-induzierten Seneszenz und daraus resultierend zu einer inhibierten Proliferation des Pilzes führte. Dementsprechend liegt eine direkte Korrelation zwischen reduzierter Cytokininkonzentration und Seneszenz vor. Des Weiteren bewirkt die Unterdrückung der pathogeninduzierten Seneszenz eine Störung im Lebenszyklus des Pilzes. Dadurch kann er nicht optimal aus der biotrophen in die nekrotrophe Phase seines Lebens wechseln und es kommt somit nicht zur Bildung von Mikrosklerotien. Erstmals konnte in dieser Arbeit ein in der Wirtspflanze stattfindender Transdifferenzierungsprozess durch V143-Infektion beschrieben werden. Dabei werden hauptsächlich Bündelscheidezellen *de novo* zu Xylemelementen umgewandelt. Gelegentlich

ist dieser Prozess auch in Epidermiszellen im Wurzel-Hypokotyl-Übergang zu beobachten. Die Transdifferenzierung der Bündelscheidezellen korreliert mit dem *yellow vein*-Symptom und ist wahrscheinlich ein Teilfaktor für den *stunting*-Phänotyp (verursacht durch den streckungsunfähigen Metaxylemanteil in den *de novo* Xylemelementen).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der genetische Mechanismus der Transdifferenzierung auf den Prozessen der natürlichen Xylementwicklung basiert, die über VNDs (NAC-Transkriptionsfaktoren) gesteuert wird. Des Weiteren wurde versucht, die biologische Relevanz für dieses Phänomen zu belegen. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass *Verticillium* die *de novo* Xylemelemente für eine bessere Proliferation benutzt, da der Pilz in diesen nicht nachweisbar war. Im Zellkulturassay lösten weder Xylemsaft oder apoplastische Waschflüssigkeit infizierter Pflanzen noch pilzliches Kulturmedium Transdifferenzierung aus. Es erscheint also unwahrscheinlich, dass VI43 die *de novo* Xylembildung für eine bessere Proliferation aktiv induziert und nutzt.

Die *de novo* gebildeten Xylemelemente könnten zur Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes dienen. Für die Theorie spricht die nachgewiesene Funktionalität der neugebildeten Xylemelemente. Auch das Ausbleiben von Welke in Vd830-infizierten Tomatenpflanzen und die Welkeerscheinungen in Vd830-infizierten Tabakpflanzen mangels starker Transdifferenzierung unterstützten die Hypothese. Allerdings führte eine Unterdrückung der Transdifferenzierung durch VND7-Repression zu keiner Welke in *Arabidopsis*, so dass diese Theorie durch die bisher erhaltenen Ergebnisse nicht unterstützt wird.

Interessanterweise führte die Blockierung der Transdifferenzierung zu einem leicht veränderten Krankheitsbild. Die Pflanzen zeigten nach Infektion eine physiologische Zweiteilung der Rosette, wobei der *source*-Bereich deutlich Seneszenz aufwies, der *sink*-Bereich hingegen weitestgehend grün und relativ uninfiziert aussah. Dementsprechend wurde eine Hypothese aufgestellt, dass die Transdifferenzierung möglicherweise ein Prozess ist, um den Reimport von Nährstoffen in *sink*-Bereiche der Pflanze zu stören. Damit könnte der Pilz diese in der nekrotrophen Phase selber nutzen. Durch einen C14-Glukose Transportversuch konnten erste Hinweise auf veränderte *sink-source* Verhältnisse in der infizierten Pflanze erhalten werden.

6. Literaturverzeichnis

Agrios G. N. (2005). Plant pathology. *Academic Press*. **922**.

Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gordon M. P. (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5994–98.

Armstrong D. J., Burrows W. J., Skoog F., Roy K. L., Söll D. (1969). Cytokinins: distribution in transfer RNA species of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **63**(3): 834-41.

Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T. (2005). Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* **309**: 741–45.

Baayen R. P. (1986). Regeneration of vascular tissues in relation to *Fusarium* wilt resistance of carnation. *Neth. J. Pl. Path.* **92**: 273-285.

Babosha A. V., Riabchenko A. S., Avetisian T. V. (2009). Influence of exogenous cytokinins on dynamics of development and differentiation of infection structure of the causal organism of wheat powdery mildew. *Tsitologiya* **51**(7): 602-11.

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.

Barbara D. J. and Clewes E. (2003). Plant pathogenic *Verticillium* species: How many of them are there? *Molecular Plant Pathology* **4**: 297-305.

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* **5**: 854-856.

Barrow K. D and Chain E. B. (1969). The wilting toxins of *Fusicoccum amygdali*. *Biochem J.* **114**(1): 4-5.

Bartrina I., Otto E., Strnad M., Werner T., Schmülling T. (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. **23**(1):69-80.

Beckers G. J. M., Spoel S. H. (2006). Fine-tuning plant defense signalling: salicylate verses jasmonate. *Plant Biol.* 8:1-10.

Beckman C. H. (1987). The nature of wilt diseases of plants. *St. Paul, Minn.: APS Press*

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.

- Bhat R. G. and Subbarao K. V.** (1999). Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, **89**: 1218-1225.
- Bilyeu K. D. , Cole J. L., Laskey J. G., Riekhof W. R., Esparza T. J., et al.** (2001). Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* **125**: 378-86.
- Bishop C. D. and Cooper R. M.** (1983). An ultrastructural-study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonisation of susceptible cultivars. *Physiological Plant Pathology* **23**(3): 323-343.
- 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 Sci.* **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.
- Brefort T., Doehlemann G., Mendoza-Mendoza A., Reissmann S., Djamei A., Kahmann R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol.* **47**: 423-45.
- Brovko F. A., Vasileva V. S., Lushnikova A. L., Selivankina S. Y., Karavaiko N. N., Boziev K. M., Shepelyakovskaya A. O., Moshkov D. A., Pavlik L. L., Kusnetsov V. V., Kulaeva O. N.** (2010). Cytokinin-binding protein (70 kDa) from etioplasts and amyloplasts of etiolated maize seedlings and chloroplasts of green plants and its putative function. *J Exp Bot.* **61**(12): 3461-74.
- Brownlee B. G, Hall R. H, Whitty C. D.** (1975). 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2-isopentenyl)adenine. *Can J Biochem.* **53**(1): 37-41.
- Brugiè`re N., Dubois F., Masclaux C., Sangwan R. S, Hirel B.** (2000). Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* **211**:519-527.
- Brzobohaty B, Moore I, Kristoffersen P, Bako L, Campos N.** (1993). Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**: 1051-54.
- Buckley P. M., Wyllie T. D. and De Vay 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. und Kehr J.** (2004). Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta* **219** (4): 610-618.
- Calderini O., Bovone T., Scotti C., Pupilli F., Piano E., Arcioni S.** (2007). Delay of leaf senescence in *Medicago sativa* transformed with the *ipt* gene controlled by the senescence-specific promoter SAG12. *Plant Cell Rep* **26**:611-615.

- Cano-Delgado A., Yin Y. H., Yu C., Vafeados D., Mora-Garcia S., et al.** (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development* **131**: 5341-5351.
- Carlsbecker A., Helariutta Y.** (2005). Phloem and xylem specification: pieces of the puzzle emerge. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 512-17.
- Chen Long-Fang O., Hwang J. Y., Charng Y. Y., Sun C. W. and Yang S. F.** (2001). Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation. *Molecular Breeding* **7**: 243-257.
- Choe S. W., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Tissier C.P., et al.** (1999). The *Arabidopsis* *dwf7/ste1* mutant is defective in the Delta(7) sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **11**: 207-221.
- Choi J., Huh S. U., Kojima M., Sakakibara H., Paek K. H., Hwang I.** (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev Cell.* **19**(2):284-95.
- 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.
- 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.
- Corsini D. L., Thompson C. and Pavek J. J.** (1989). The effect of plant growth regulators on *Verticillium* wilt of potato. *Plant Pathologist* **66**:125-136.
- Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K. and Scheible W. R.** (2005). Genomewide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**: 5-17.
- D'Agostino I. B., Derue J., Kieber J. J.** (2000). Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology* **124**: 1706-1717.
- 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.
- Deak, M., Kiss, G. B., Koncz, C., and Dudits, D.** (1986). Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene-transfer. *Plant Cell Reports* **5**: 97-100.
- Demura T., Tashiro G., Horiguchi G., Kishimoto N., Kubo M., et al.** (2002). Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 15794-15799.

- Dixelius C., Happstadius I. and Berg G.** (2005). *Verticillium* wilt on Brassica oilseed crops - A Swedish perspective. *Journal of Swedish Seed Association* **115**: 36-48.
- Dixon R. A.** (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.
- 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.
- Eynck C., Koopmann B., Grunewaldt-Stoecker G., Karlovsky P. and v. Tiedemann A.** (2007). Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *Eur J Plant Pathol* **118**, 259-274.
- Floerl S.** (2008) Identifizierung und Charakterisierung extrazellulärer Proteine unter dem Einfluss von *Verticillium longisporum* in *Arabidopsis thaliana* und Raps (*Brassica napus*). *Text PhD Thesis*. <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.
- Floerl S., Druebert1 C., Aroud H. I., Karlovsky P. and A. Polle** (2010). Disease symptoms and mineral nutrition in *Arabidopsis thaliana* in response to *Verticillium longisporum* V143 infection. *Journal of Plant Pathology* **92**(3): 695-702
- Fradin E. and Thomma B. P. H. J.** (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* (7)2: 71-86.
- Freeman B. J. and Beattie G. A.** (2009). Bacterial growth restriction during host resistance to *Pseudomonas syringae* is associated with leaf water loss and localized cessation of vascular activity in *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* **22**(7): 857-867.
- Fukuda H. and Komamine A.** (1980). Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* **65**: 57-60.
- Galuszka P., Frebort I., Sebela M., Sauer P., Jacobsen S., Pec P.** (2001). Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur. J. Biochem.* **268**: 450-61.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmölling T., Frébort I.** (2007). Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 255-267.
- Gan S. and Richard M. Amasino** (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**

-
- Gillissen B., Bürkle L., André B., Kühn C., Rentsch D., Brandl B. and Frommer W. B.** (2000). A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12**: 291-300.
- Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B.** (2002). Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **49**: 161-69.
- 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*
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.
- Harling R., Taylor G. S. and Charlton W. A.** (1984). Xylem vessel regeneration in carnation in response to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi. *Neth. J. Pl. Path.* **90**: 173-176.
- 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.
- Heyl A. and Schmülling T.** (2003). Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:480-488.
- Heyl A., Werner T., Schmülling T.** (2006). Cytokinin metabolism and signal transduction. *Annual Plant Review* (Hedden P., Thomas S. G) *Plant Hormone Signaling* **24**: 93-123.
- Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O. E., Huhndorf S.** (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research* **111**: 509-47.
- Hornig H.,** (1985). Spätschäden durch *Phoma lingam* und *Verticillium dahliae*? *Raps* **3**(2) 57-58.
- Hunter D. E., Darling H. M., Stevenson F. J. and Cunningham C. E.** (1968). Inheritance of resistance to *Verticillium* wilt in Wisconsin. *Am. Potato J.* **45**: 72-78.
- Hutchison C. E. and Kieber J. J.** (2002). Cytokinin Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**: 47-59.
- Huynh L. N., Van Toai T., Streeter J. and Banowetz G.** (2005). Regulation of flooding tolerance of SAG12:ipt *Arabidopsis* plants by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, **56**(415): 1397-1407.
- Hwang I. & Sheen J.** (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**.

- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T.** (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**(6823): 1060-1063.
- Iven Tim** 2009. Transkriptomanalyse der Arabidopsis-Wurzel nach Infektion mit dem pilzlichen Pathogen *Verticillium longisporum* und Identifizierung von transkriptionellen Regulatoren der Pathogenantwort. *PHD-Thesis*
- Iwasaki T., Shibaoka H.** (1991). Brassinosteroids act as regulators of tracheary-element differentiation in isolated *Zinnia* mesophyll-cells. *Plant Cell Physiol.* **32**: 1007-1014.
- Janacek S. H., Trenkamp S., Palmer B., Brown N. J., Parsley K., Susan S., Astley H. M., Rolfe S. A., Quick W. P., Fernie A. R. and Hibberd J. M.** (2009). Photosynthesis in cells around veins of the C3 plant *Arabidopsis thaliana* is important for both the shikimate pathway and leaf senescence as well as contributing to plant fitness. *The Plant Journal* **59**: 329-343.
- Jansky S., Rouse D. I. and Kauth P. J.** (2004). Inheritance of resistance to *Verticillium dahliae* in diploid interspecific potato hybrids. *Plant Dis.* **88**: 1075-1078.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**(13): 3901-3907.
- 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.
- Jun Y.,Bride P. D. and Evan H. C.** (1991). An integrated approach to the taxonomy of the genus *Verticillium*. *Journal of General Microbiology* **137**: 1437-1444.
- Kakimoto T.** (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* **42**: 677-85.
- Kakimoto T.** (2003). Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 605-27.
- 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.
- Karapapa V. K., Bainbridge B. W. and Heale J. B.** (1997). Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycol. Res.* **101**: 1281-1294.
- Kawchuk L., Hachey J., Lynch D. R., Klcsar F.van Rooijen G., Waterer D. R., Robertson A., Kokko E., Byers R., Howard R. J., Fischer R. and Prüfer D.** (2001). Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**: 6511-6515.
- Kiba T., Aoki K., Sakakibara H., Mizuno T.** (2004). Arabidopsis response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the wol cytokinin-receptor mutant. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1063-1077.

- Kiba T., Yamada H., Mizuno T.** (2002). Characterization of the *ARR15* and *ARR16* response regulators with special reference to the cytokinin signaling pathway mediated by the *AHK4* histidine kinase in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **43**(9): 1059-1066.
- Kichey T., Le Gouis J., Sangwan B., Hirel B., Dubois F.** (2005). Changes in the cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase during flag leaf senescence in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Cell Physiology* **46**: 964-974.
- Kim H. J., Ryu H., Hong S. H., Woo H. R., Lim P. O., Lee I. C., Sheen J., Nam H. G., Hwang I.** (2006). Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**(3): 814-9.
- Kinsman E. A., Pyke K. A.** (1998). Bundle sheath cells and cell specific plastid development in *Arabidopsis* leaves. *Development* **125**: 1815-1822.
- Koroleva O. A., Tomos A. D., Farrar J., Roberts P., Pollock C. J.** (2000). Tissue distribution of primary metabolism between epidermal, mesophyll and parenchymatous bundle sheath cells in barley leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**:747-755.
- Köllmer I.** (2009). PHD-Thesis: Funktionelle Charakterisierung von *CKX7* und cytokininregulierten Transkriptionsfaktorgenen in *Arabidopsis thaliana*.
- Kranz F., Schmutterer H. und Koch W.** (1979). Krankheiten, Schädlinge und Unkräuter im tropischen Pflanzenbau. *Verlag Paul Parey* 680S.
- Kruijt M., de Kock M. J. D. and de Wit P. J. G .M.** (2005). Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 85-97.
- Kubo M., Udagawa M., Nishikubo N., et al.** (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* **19**: 1855-1860.
- Kudryakova, Kusnetsov V. V., Shtratnikova V. Y., Kulaeva O. N.** (2008). Effects of cytokinin and senescence-inducing factors on expression of PARR5-GUS gene construct during leaf senescence in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Growth Regul.* **56**: 21-30.
- Leegood R. C.** (2008). Roles of the bundle sheath cells in leaves of C3 plants. *Journal of Experimental Botany.* Vol. **59**, **7**:1663-1673.
- Li J. M., Chory J.** (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**: 929-938.
- Lichtenthaler H. K.** (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 47-65.
- 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.
- Loake G. and Grant. M.** (2007). Salicylic acid in plant defense-the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 466-472.

- Lüttge U., Kluge M., Bauer G.** (2002). Botanik. Wiley-VCH, 4. verbesserte Auflage
- Lynch D. R., Kawchuck L. M. and Hachey J.** (1997). Identification of a gene conferring high levels of resistance to *Verticillium* wilt in *Solanum chacoense*. *Plant Dis.* **81**: 1001-1014.
- Mahonen A. P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P. N., Helariutta Y.** (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes Dev.* **14**: 2938-2943.
- Marc J., Granger C. L., Brincat J., Fisher D. D., Kao T., McCubbin A. G. and Cyr R. J.** (1998). A GFP-MAP4 Reporter Gene for Visualizing Cortical Microtubule Rearrangements in Living Epidermal Cells. *Plant Cell* **10**: 1927-1940.
- Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Von Saltza M. H, Strong F. M.** (1955). Structure and synthesis of kinetin. *J. Am. Chem. Soc.* **77**(9): 2662-2663.
- Miller C.O.** (1961). A kinetin like compound in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**(2): 170-4.
- Misaghi I., Devay J. E., Kosuge T.** (1972). Changes in Cytokinin activity associated with the development of Verticillium wilt and water stress in cotton plants. *Physiol. Plant Pathol.* **2**(3): 187-196.
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H., Shibuya N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104** (49):19613-8.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T.** (2006). Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**(44): 16598-603.
- Mok D. W. S., Mok M. C.** (2001). Cytokinin Metabolism and Action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology* **52**: 89-118.
- Morris R. O., Bilyeu K. D., Laskey J. G, Cheikh N. N.** (1999). Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem Biophys Res Commun.* **255**(2): 328-33.
- Moubayidin L., Di Mambro R. and Sabatini S.** (2009). Cytokinin-auxin crosstalk (Review). *Cell Press.*
- Murashige T. and Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Nagata N., Asami T., Yoshida S.** (2001). Brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, inhibits development of secondary xylem in cress plants (*Lepidium sativum*). *Plant Cell Physiol.* **42**(9): 1006-1011.
- Noh Y. S., Amasino R. M.** (1999). Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Mol Biol.* **41**(2):181-94.

- Ohashi-Ito K. and Fukuda H.** (2010). Transcriptional regulation of vascular cell fate. *Curent Opinion in Plant Biology* **13**:1-7.
- Olsson, S., and Nordbringhertz, B.** (1985). Microsclerotial germination of *Verticillium dahliae* as affected by rape rhizosphere. *Fems Microbiology Ecology* **31**: 293-299.
- Paces V, Werstiuk E, Hall R. H.** (1971). Conversion of N-(Delta-Isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in *Tobacco* tissue. *Plant Physiol.* **48**(6): 775-8.
- Palmer C. S., Saleeba J. A., Lyon B. R.** (2005). Phytotoxicity on cotton ex-plants of an 18.5 kDa protein from culture filtrates of *Verticillium dahliae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **67**: 308-318.
- Patrick T. W., Hall R., and Fletcher R. A.** (1977). Cytokinin levels in healthy and *Verticillium*-infected tomato plants. *Can. J. Bot.* **55**(4): 377-382.
- Pegg G. F. and Brady B. L.** (2002). *Verticillium* Wilts. Wallingford: CABI
- Prokopová J., Spundová M., Sedlářová M., Husicková A., Novotný R., Dolezal K., Naus J., Lebeda A.** (2010). Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiol Biochem.* **48**(8): 716-23.
- Rahman M., Mundt C. C. , Wolpert T. J. , Riera-Lizarazu O.** (2001). Sensitivity of wheat genotypes to a toxic fraction produced by *Cephalosporium gramineum* and correlation with disease susceptibility. *Phytopathology* **91**(7): 702-7.
- Rindfleisch S.** (2011). Infektionsuntersuchungen von *Arabidopsis thaliana* durch *Verticillium longisporum* und *Verticillium dahliae* und Analyse veränderter Sensitivität durch Mutation der prä- und postinvasiven Abwehrmechanismen. *Bachelorarbeit, Georg August Universität Göttingen.*
- Robert-Seilaniantz A., Navarro L., Bari R. , Jones J. D.** (2007). Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**:372-379.
- Russel S.** (1974). Cellulolytic activity of *Verticillium albo-atrum*. *Acta. Microbiol. Pol. B.* **6**(3): 97-103.
- 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.
- Sachs T.** (1991). Cell polarity and tissue patterning in plants. *Development* **91**: 83-93.
- Sakakibara H.** (2006). Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 431-49.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R.** (1977). DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-7.
- Santner A., Calderon-Villalobos L. I. A. & Estelle M.** (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* **5**(5).

- Schaible L., Cannon O. S. and Waddoups V. (1951).** Inheritance of resistance to *Verticillium* wilt in a tomato cross. *Phytopathology* **41**: 986-990.
- Scheres B., Dilaurenzio L., Willemsen V., Hauser M. T., Janmaat K., et al. (1995).** Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **121**: 53-62.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupkova E., Bartrina M. I. (2003).** Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J. Plant Res.* **116**: 241-52.
- Schoeneweiss, D. E. (1959).** Xylem formation as a factor in oak wilt resistance. *Phytopathology* **49**: 335-337.
- Sieburth L. E., Deyholos M. K. (2006).** Vascular development: the long and winding road. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 48-54.
- Siemens J., Keller I., Sarx J., Kunz S., Schuller A., Nagel W., Schmülling T., Parniske M., Ludwig-Müller J. (2006).** Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Mol Plant Microbe Interact.* **19**(5): 480-94.
- Simko, I., Costanzo, S., Haynes, K. G., Christ, B. J. and Jones, R. W. (2004).** Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) through a candidate gene approach. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 217-224.
- Singh S, Braus-Stromeier S. A., Timpner C., Tran V. T., Lohaus G., Reusche M., Knüfer J., Teichmann T., von Tiedemann A., Braus G. H. (2010).** Silencing of *Vlaro2* for chorismate synthase revealed that the phytopathogen *Verticillium longisporum* induces the cross-pathway control in the xylem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**(6): 1961-76.
- Skoog F, Armstrong D. J. (1970).** Cytokinins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **21**: 359-84.
- Snyder W. C. und Smith, S. N. (1981).** Fungal wilt diseases of plants. *Academic Press*, 25-50.
- Soyano T., Thitamadee S., Machida Y. and Chuaa N.-H. (2008).** ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE19/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN30 and ASL20/LBD18 Regulate Tracheary Element Differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**: 3359-3373.
- Steinbach P., Edner M., Kreye H. Wolf A. (2004).** Standortbezogene Risikobewertung für den Erreger der „Rapswelke“ *Verticillium longisporum* auf der Grundlage der Quantifizierung des Bodeninokulums. (www.ufop.de/downloads/Abschlussbericht_Rapswelke.pdf).
- Sitte P., Weiler E. W., Kadereit J. W., Bresinsky A., Körner C. (2002).** Strasburger - Lehrbuch der Botanik, 35. Auflage, Spektrum Verlag.
- Suzuki T., Sakurai K., Imamura A., Nakamura A., Ueguchi C., Mizuno T. (2000).** Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in

His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **64**(11): 2486-9.

Swartzberg D., Kirshner B., Rav-David D., Elad Y., Granot D. (2008). *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the IPT gene. *Eur. J. Plant Pathol.* **120**: 289-297.

Sylvain M., Ruairidh S., Oakeley E., Angliker H, Paszkowskia U. (2010). Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* **22**: 3177-3187.

Takahashi H., Watanabe-Takahashi A., Smith F. W., Blake-Kalff M., Hawkesford M. J., Saito K. (2000). The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **23**:171-182.

Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T. (2001). Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol.* **42**(1): 85-93.

Takei K., Takahashi T., Sugiyama T., Yamaya T., Sakakibara H. (2002). Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *J. Exp. Bot.* **53**(370):971-7.

Talboys P. W. (1958). Association of tylosis and hyperplasia of xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Brit. mycol. Soc.* **41**(2): 249-260.

Talboys P. W. (1958 a). Degradation of cellulose by *Verticillium Albo-atrum* *Trans. Brit. mycol. Soc.* **41**(2): 242-248.

Talboys P. W. (1964). A concept of host-parasite relationship in *Verticillium* wilt diseases. *Nature* **202**: 361-364

Talboys P. W. (1972). Resistance to vascular wilt fungi. *R. Soc. Lond. B.* **181**: 319-332.

Tappe H. (2008). *Verticillium* induced Genes. Dissertation. *Georg-August-Universität Göttingen*

Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978). 5`-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**: 545-47.

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**

To J. P. C, Deruère J., Maxwella B. B., Morris M., Hutchison C. E., Ferreira F. J, Schaller G. E. and Kieber J. J. (2007). Cytokinin regulates Type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *The Plant Cell* **19**: 3901-3914.

-
- To J. P., Haberer G., Ferreira F. J., Deruère J., Mason M. G., Schaller G. E., Alonso J. M., Ecker J. R., Kieber J. J.** (2004). Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**(3): 658-71.
- Truman W., Bennett M. H., Kubigsteligt I., Turnbull C., Grant M.** (2007). *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**: 1057-1080.
- Turner S., Gallois P., and Brown D.** (2007). Tracheary element differentiation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 407-33.
- Ueguchi C., Koizumi H., Suzuki T. and Mizuno T.** (2001). Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **42**(2) 231-235.
- Ueguchi C., Sato S., Kato T., Tabata S.** (2001). The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**(7): 751-5.
- Ugglä C., Moritz T., Sandberg G., Sundberg B.** (1996). Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:9282-9286.
- Vadassery J., Ritter C., Venus Y., Camehl I., Varma A., Shahollari B., Novák O., Strnad M., Ludwig-Müller J., Oelmüller R.** (2008). The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol Plant Microbe Interact.***10**: 1371-83.
- Van Loon L.C., Rep M. and Pieterse C. M. J.** (2006). Significance of inducible defenselated proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**: 135-162.
- 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.
- 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.
- Wang J. Y. , Cai Y., Gou J. Y., Mao Y. B., Xu Y. H., Jiang W. H., Chen X. Y.** (2004). VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting. *Appl Environ Microbiol.* **70**(8): 4989-95.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmülling T.** (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**: 2532-50.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T.** (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 10487-92.
- Werner T., Köllmer I., Bartrina I., Holst K. and Schmülling T.** (2006). New Insights into the Biology of Cytokinin Degradation. *Plant Biol.* **8**: 371-381.

-
- Werner T., Schmülling T. (2009).** Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**
- Whitty C. D., and Hall R. H. (1974).** A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Biochem. Cell Biol.* **52(9)**: 789-799.
- Wightman R. and Turner S. R. (2008).** The roles of the cytoskeleton during cellulose deposition at the secondary cell wall. *The Plant Journal* **54**: 794-805.
- 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.
- Wilson R. A and Talbot N. J (2009).** Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Review Microbiology* **7**: 185-195.
- Yokoyama A., Yamashino T., Amano Y., Tajima Y., Imamura A., Sakakibara H. and Mizuno T. (2007)** Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in Cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **48(1)**: 84-96.
- Zare R., Gams W. (2008).** A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycological Research* **112**: 811-824.
- Zatloukal M., Gemrotová M., Dolez K., Havlík L., Spíchal L., Strnad M. (2008).** Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**: 9268-9275.
- 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*. *J. Phytopathol.* **150**: 112-119.
- Zhong R., Richardson E. A., and Ye Z.-H. (2007a).** The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 2776-2792.
- Zhong R., Richardson E.A., and Ye Z.-H. (2007b).** Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. *Planta* **225**: 1603-1611.

7. Anhang

7.1 Konzentrationsveränderungen der Cytokinin-Zwischenstufen und Speicherverbindungen nach VI43-Infektion

Neben den Cytokinen *trans*-Zeatin (*tZ*), *cis*-Zeatin (*cZ*), Isopentenyladenin (*iP*) und Dihydrozeatin (*DHZ*) wurden die Konzentrationen der jeweiligen Zwischenstufen der Cytokininbiosynthese -ribosid, -ribosid-5`monophosphat und die Speicherverbindungen -O-glukosid, -ribosid-O-glukosid und -9-glukosid gemessen. Das Pflanzenmaterial stammte aus Erdinfektionsversuchen unter Kurztagbedingungen und wurde im Zeitverlauf 7 - 28 dpi geerntet. Verglichen wurden die Konzentrationen der Kontrollen mit dem VI43-Infektionsansatz.

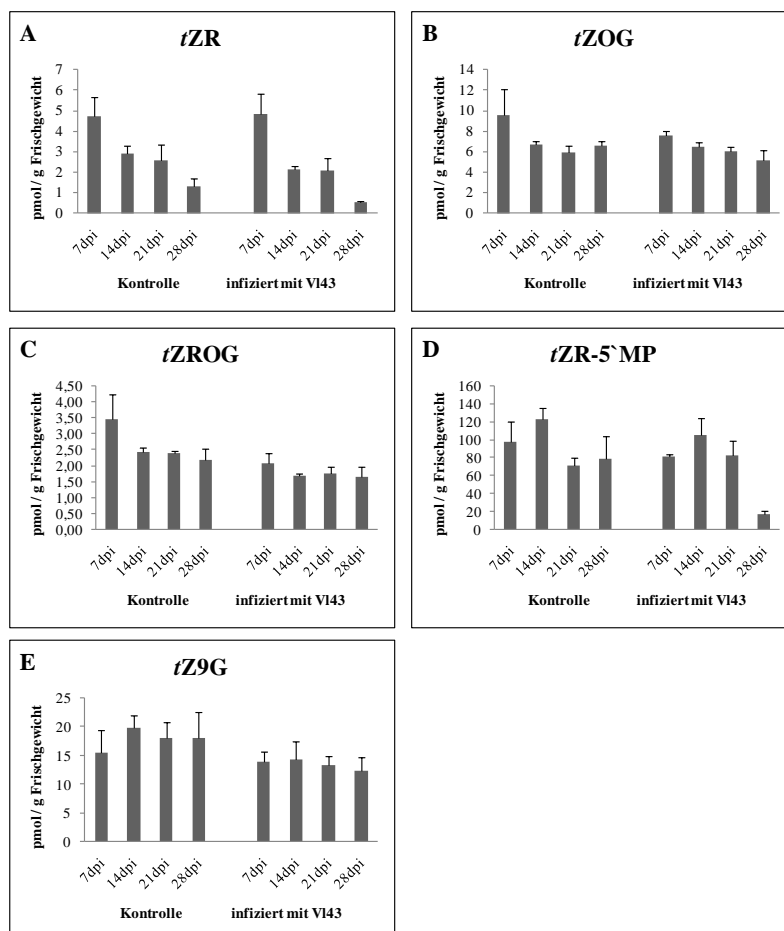


Abb. 44: Bestimmung der Konzentration von *trans*-Zeatin Vorstufen / Speicherstoffen in Col-0 Kontroll- und mit VI43-infizierten Pflanzen (im Zeitverlauf 7, 14, 21, 28 dpi) unter Kurztagbedingungen. (A) Konzentration von *trans*-Zeatin ribosid (*tZR*), (B) *trans*-Zeatin-O-glukosid (*tZOG*), (C) *trans*-Zeatin ribosid-O-glukosid (*tZROG*), (D) *trans*-Zeatin ribosid-5`monophosphat (*tZR-5`MP*) und *trans*-Zeatin-9-glukosid (*tZ9G*). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte in n = 9 Pflanzen (3*3 vereinte Proben).

Die *tZ*-Zwischenstufen und -Speicherverbindungen zeigten keine großen Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Proben (**Abb. 44 A-E**), einzig *tZR*-5`MP lag 28dpi in stark verminderter Konzentration vor (**Abb. 44 D**).

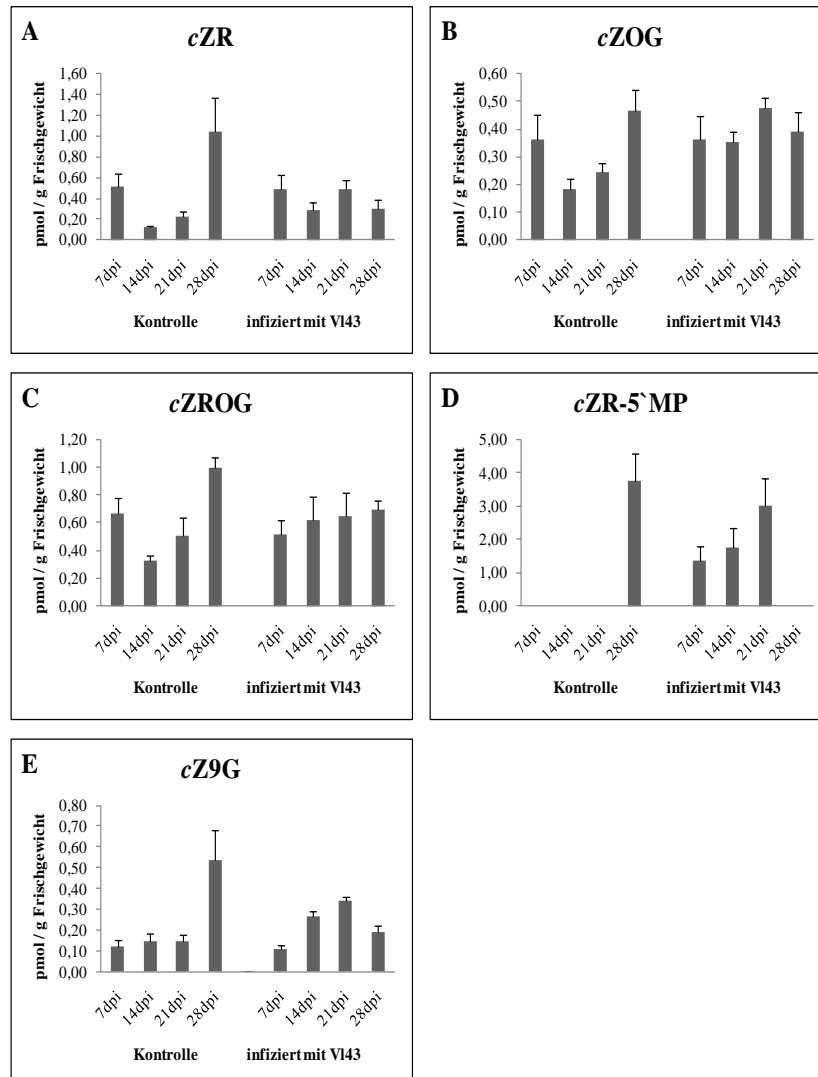


Abb. 45: Bestimmung der Konzentration von *cis*-Zeatin-Vorstufen / -Speicherstoffen in Col-0 Kontroll- und mit VI43 infizierten Pflanzen (im Zeitverlauf 7, 14, 21 und 28 dpi) unter Kurztagbedingungen. (A) Konzentration von *cis*-Zeatin-ribosid (*cZR*), (B) *cis*-Zeatin-O-glukosid (*cZOG*), (C) *cis*-Zeatin-ribosid-O-glukosid (*cZROG*), (D) *cis*-Zeatin-ribosid-5`-monophosphat (*cZR*-5`MP) und *cis*-Zeatin-9-glukosid (*cZ9G*). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte in n = 9 Pflanzen (3*3 vereinte Proben).

Die Konzentrationen der *cZ*-Zwischenstufen und -Speicherverbindungen waren im Allgemeinen relativ gering im Vergleich zu denen von *tZ* (**Abb. 45**). Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass die Konzentrationen der Speicherverbindungen nach der Infektion im Zeitverlauf relativ konstant blieben (**Abb. 45 B, C, E**). Die Zwischenstufe *cZR* verhielt sich ähnlich der Kontrolle (**Abb. 45 A**), wobei die Verbindung *cZR*-5`MP von 7 - 21 dpi deutlich

in infizierten Pflanzen anstieg und dann 28 dpi nicht mehr detektierbar war im Kontrast zur Kontrolle (**Abb. 45 E**).

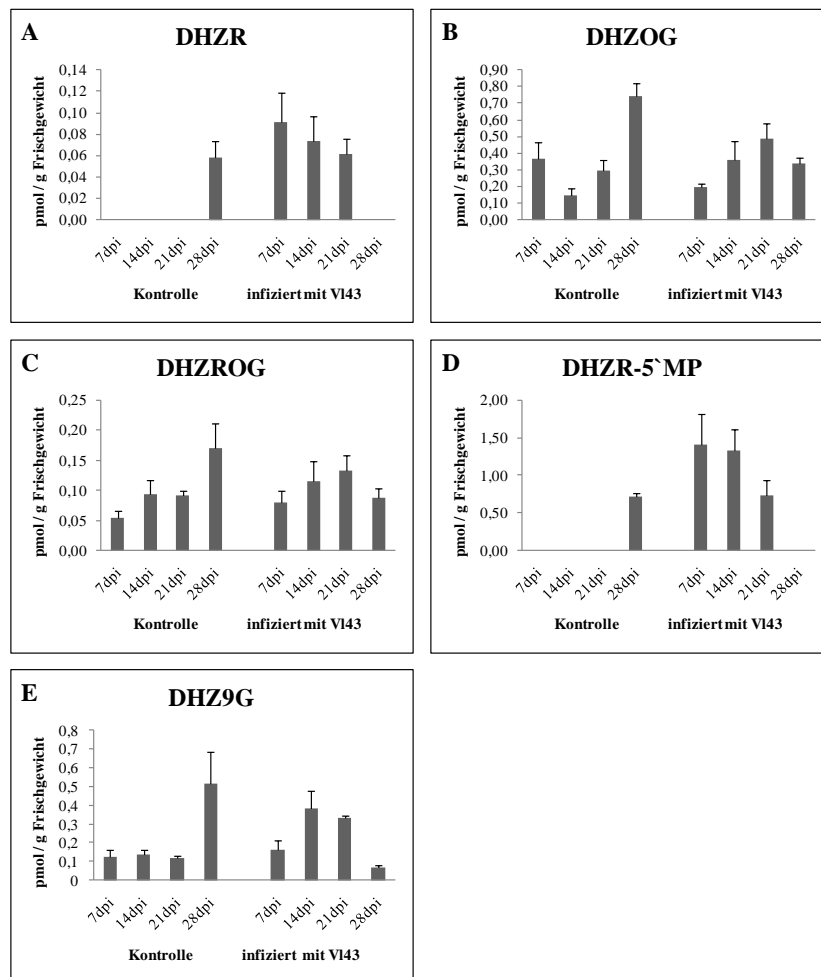


Abb. 46: Bestimmung der Konzentration von Dihydrozeatin-Vorstufen / -Speicherstoffen in Col-0 Kontroll- und mit VI43 infizierten Pflanzen (im Zeitverlauf 7, 14, 21 und 28 dpi) unter Kurztagbedingungen. (A) Konzentration von Dihydrozeatin-ribosid (DHZR), (B) Dihydrozeatin-O-glukosid (DHZOG), (C) Dihydrozeatin-ribosid-O-glukosid (DHZROG), (D) Dihydrozeatin-ribosid-5`-monophosphat (DHZR-5`MP) und Dihydrozeatin-9-glukosid (DHZ9G). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte in n = 9 Pflanzen (3*3 vereinte Proben).

Die Verteilung der drei DHZ-Speicherverbindungen in Kontrollpflanzen zeigte eine Zunahme der Konzentration bis zum Zeitpunkt 28 dpi (**Abb. 46 B, C, E**). Gleiches gilt für die Proben der infizierten Pflanzen bis 21 dpi, deren Konzentrationen meistens höher waren als die der Kontrollen. Im Vergleich zur Kontrolle war in infizierten Pflanzen zum Zeitpunkt 28dpi die Konzentration immer geringer. Die Zwischenstufen DHZR und DHZR-5`MP waren in den Kontrollen nur 28 dpi detektierbar und zum selben Zeitpunkt nicht in den infizierten Pflanzen (**Abb. 46 A, D**). Zu den anderen Zeitpunkten war in den infizierten Pflanzen eine deutliche Konzentration messbar (**Abb. 46 A, D**). In infizierten Pflanzen war der Verlauf der

Zwischenstufen nahezu gleich. Bei 7 dpi lag die höchste Konzentration vor und fiel fortlaufend ab.

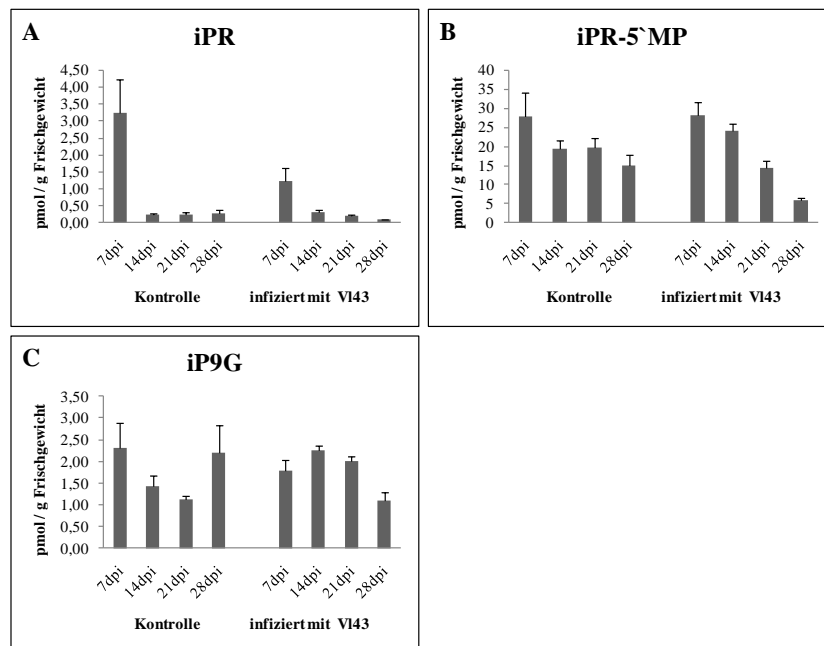


Abb. 47: Bestimmung der Konzentration von Isopentenyladenin-Vorstufen / -Speicherstoffen in Col-0 Kontroll- und mit VI43-infizierten Pflanzen (im Zeitverlauf 7, 14, 21, 28 dpi) unter Kurztagbedingungen. (A) Konzentration von Isopentenyladenin-ribosid (iPR), (B) Isopentenyladenin-O-glukosid (iPOG), (C) Isopentenyladenin-ribosid-O-glukosid (iPROG), (D) Isopentenyladenin-ribosid-5`-monophosphat (iPR-5`MP) und Isopentenyladenin-9-glukosid (iP9G). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte in n = 9 Pflanzen (3*3 vereinte Proben).

Die Zwischenstufen der iP Biosynthese iPR, iPR-5`MP und die Speicherverbindung iP9G konnten vermessen werden in Kontrast zu den Cytokininkonjugaten iPROG und iPOG, die nicht detektierbar waren (**Abb. 47**). Bei den Ribosid-Verbindungen gab es keine großen Unterschiede zwischen dem Kontroll- und Infektionsansatz (**Abb. 47 A, B**). Einzig die Konzentration von iPR-5`MP war bei VI43-infizierten Pflanzen ab 21 dpi stärker rückläufig als in den Kontrollen (**Abb. 47 B**). Die Speicherverbindung iP9G zeigte ein deutliches Profil. Zu den Zeitpunkten 7 und 28 dpi war die Konzentration in der Kontrolle höher im Vergleich zu den infizierten, wohingegen zu den Zeitpunkten 14 und 21 dpi es genau andersherum war (**Abb. 47 C**).

7.2 Expressionsanalysen von Isopentenyltransferasen nach V143-Infektion

Von vier der neun Isopentenyltransferasen (*IPT2*, *3*, *6* und *9*) konnten Expressionsprofile nach V143-Infektion aufgenommen werden (**Abb. 48**). *IPT2* und *IPT3* zeigten keine Induktion nach Infektion (**Abb. 48** A, B). *IPT6* war zum Zeitpunkt 21 dpi 6-fach über der Kontrolle hochreguliert (**Abb. 48** C). *IPT9*-Expression war herunterreguliert zu den Zeitpunkten 7 und 28 dpi (**Abb. 48** D).

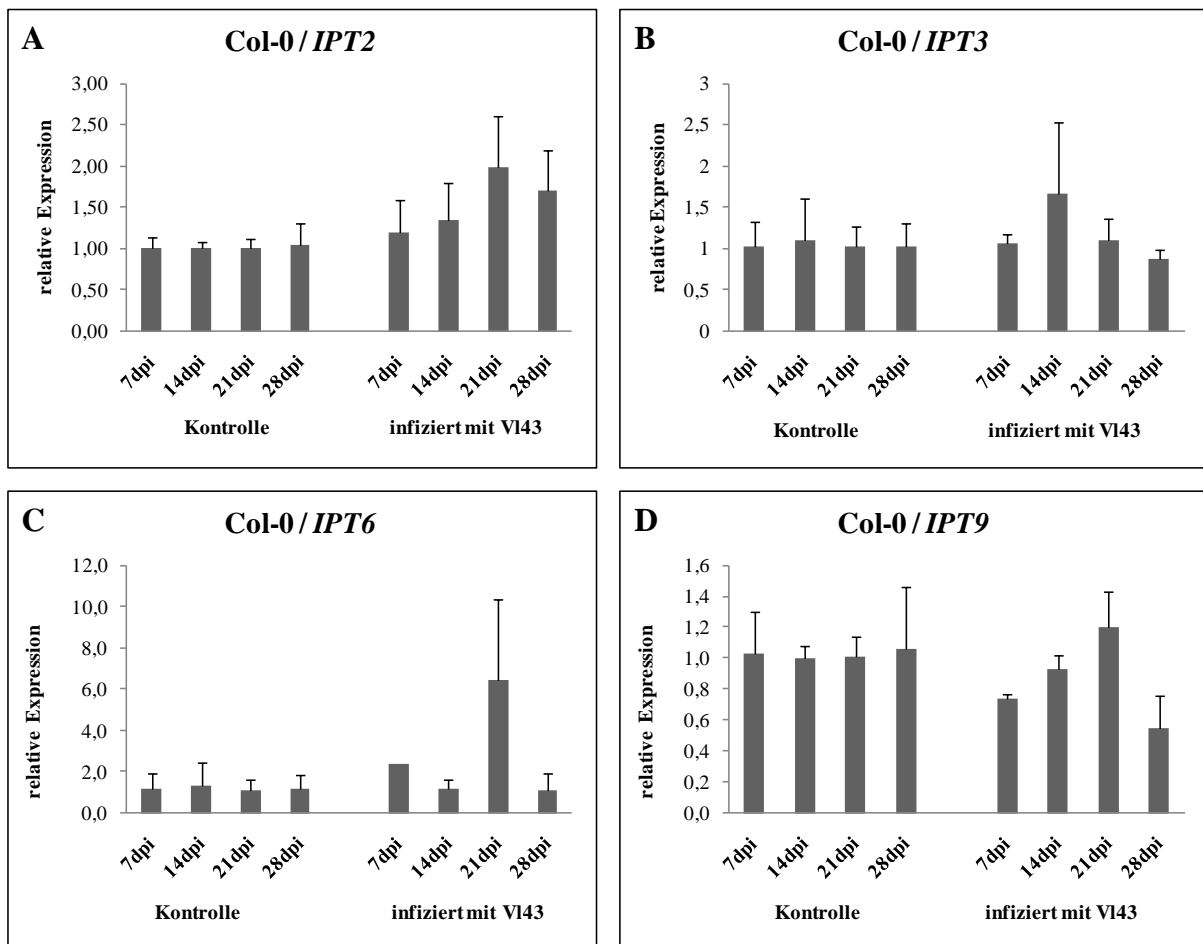


Abb. 48: Quantitative RT-PCR von V143-infizierten und Kontrollpflanzen der folgenden Isopentenyltransferasen (IPTS): (A) *IPT2*, (B) *IPT3*, (C) *IPT6* und (D) *IPT9* im Ökotyp Col-0. Im Zeitverlauf von 7, 14, 21 und 28 dpi wurden die Pflanzen geerntet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 9 Pflanzen (3*3 vereinte Proben) aus drei biologischen Wiederholungen.

7.3 Expressionsanalysen von Cytokininoxidasen nach VI43-Infektion

Unter Berücksichtigung der Standardabweichung kann bei *CKX4* von einer leichten und bei *CKX6* von keiner Transkriptzunahme nach Infektion ausgegangen werden (Abb. 49 A, C). *CKX5* zeigte Änderungen nach VI43-Infektion im Vergleich zur Kontrolle, wobei zu den Zeitpunkten 7, 14 dpi das Gen herunterreguliert und 21, 28 dpi ca. 2-fach induziert war (Abb. 49 B). Das Expressionsprofil von *CKX7* war nur zum Zeitpunkt 7 dpi gegenüber der Kontrolle durch Transkriptabnahme verändert (Abb. 49 D).

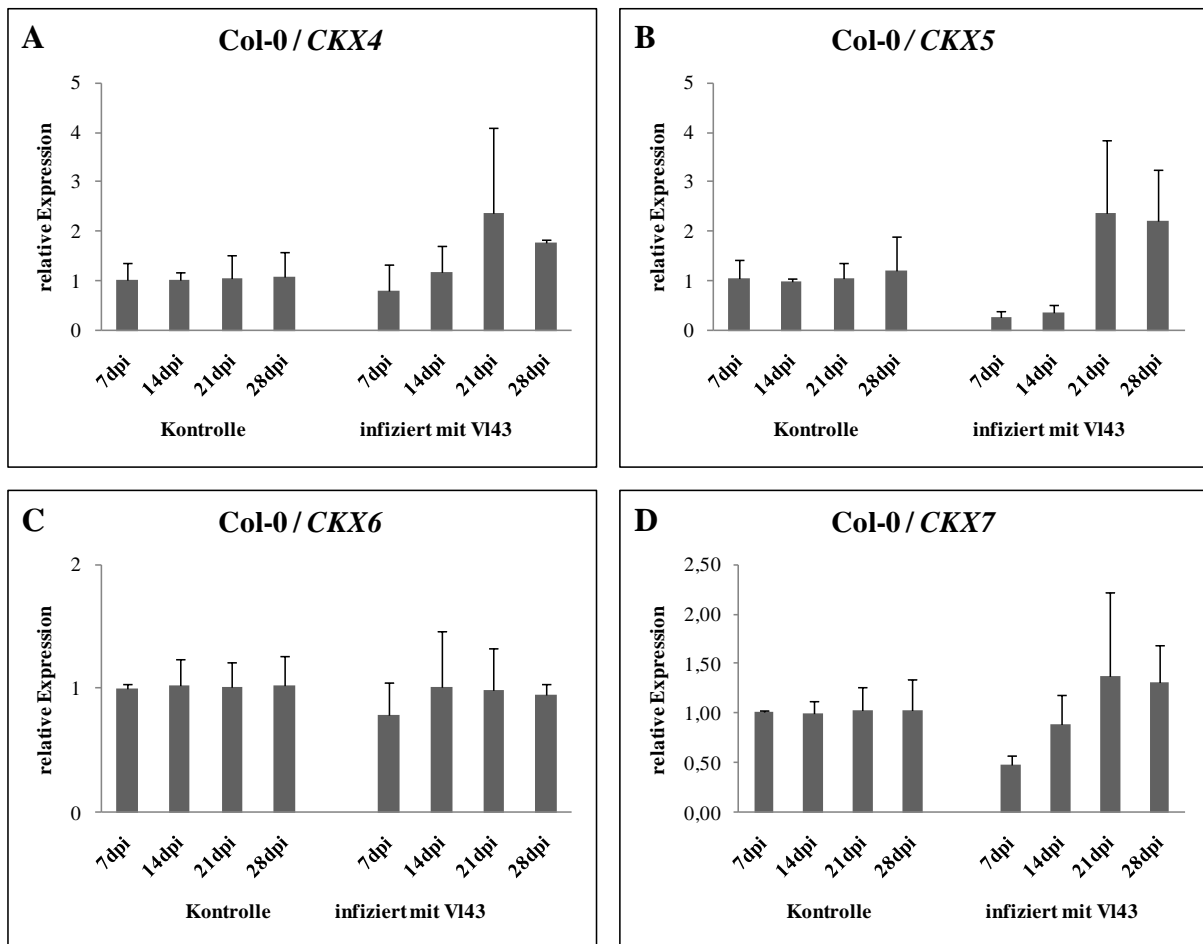


Abb. 49: Quantitative RT-PCR von VI43-infizierten und Kontrollpflanzen der folgenden Cytokininoxidasen (CKX): (A) *CKX4*, (B) *CKX5*, (C) *CKX6* und (D) *CKX7* im Ökotyp Col-0. Im Zeitverlauf von 7, 14, 21 und 28 dpi wurden die Pflanzen geerntet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von n = 9 Pflanzen (3*3 vereinte Proben) aus drei biologischen Wiederholungen.

7.4 Expressionsanalysen von *A. tumefaciens*-IPT in Col-0 und transgenen pSAG12:IPT Linien

Mittels qRT-PCR wurde die Expression des *IPT*-Gens von *A. tumefaciens* in homozygoten pSAG12-IPT Linien nach V143-Infektion untersucht, um die pathogen-induzierte Expression nachzuweisen. Die Expressionsprofile sind zur Referenz *UBQ5* dargestellt. Zur Kontrolle wurden auch Col-0 Pflanzen überprüft, in denen kein Transkript nachweisbar war (**Abb. 50 A**). Grundsätzlich war in den Kontrollen der transgenen Linien unter Kurztagbedingungen der SAG12-Promotor nicht aktiv (**Abb. 50 B-D**). Lediglich in der Linie L16-2 war zum Zeitpunkt 35 dpi eine geringe Expression nachweisbar (**Abb. 50 C**). In V143-infizierten Pflanzen war das Konstrukt ab 14 dpi induziert (**Abb. 50 B, D**). Im Vergleich der drei Linien untereinander zeigte die Linie L16-2 die stärkste Induktion (**Abb. 50 C**).

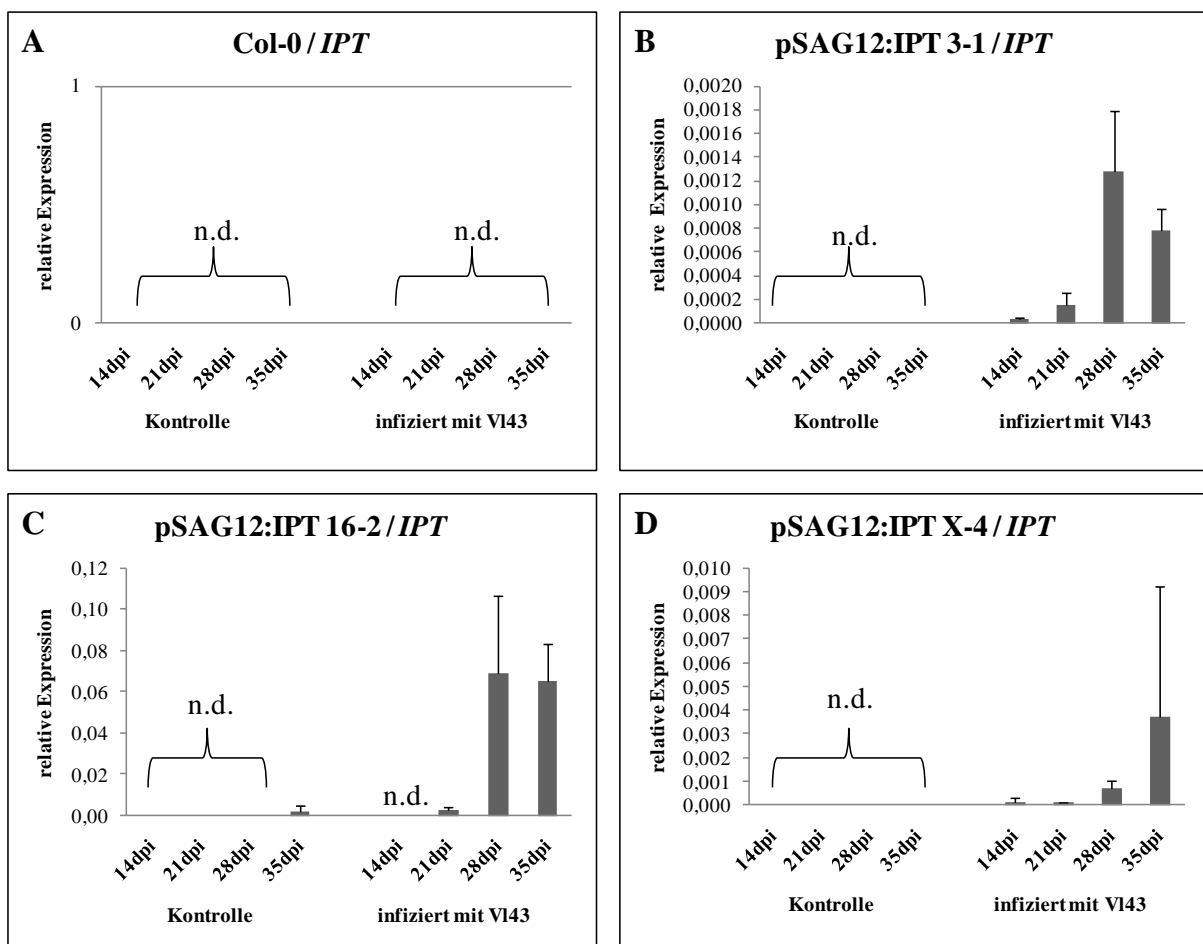


Abb. 50: Quantitative RT-PCR von V143-infizierten und Kontrollpflanzen der *IPT* von *A. tumefaciens* in (A) Ökotyp Col-0, (B) pSAG12:IPT 3-1, (C) pSAG12:IPT 16-2 und (D) pSAG12:IPT X-4. Im Zeitverlauf von 14, 21, 28 und 35 dpi wurden die Pflanzen geerntet. Aufgetragen sind die $\Delta\Delta CT$ -Werte. Alle Proben wurden mit Ubiquitin5 verrechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von $n = 9$ Pflanzen (3×3 vereinte Proben) aus drei biologischen Wiederholungen.

7.5 Charakterisierung transgener pSAG12:IPT Linien nach V143-Infektion

Die Ergebnisse aller drei Transgenen Linien haben ohne Ausnahme die gleiche Tendenz (Abb. 22, Abb. 51). Für die Linie 3-1 beziehungsweise X-4 (Abb. 51) zählen die Ergebnisbeschreibungen der Linie 16-2 (Text zu Abb. 22).

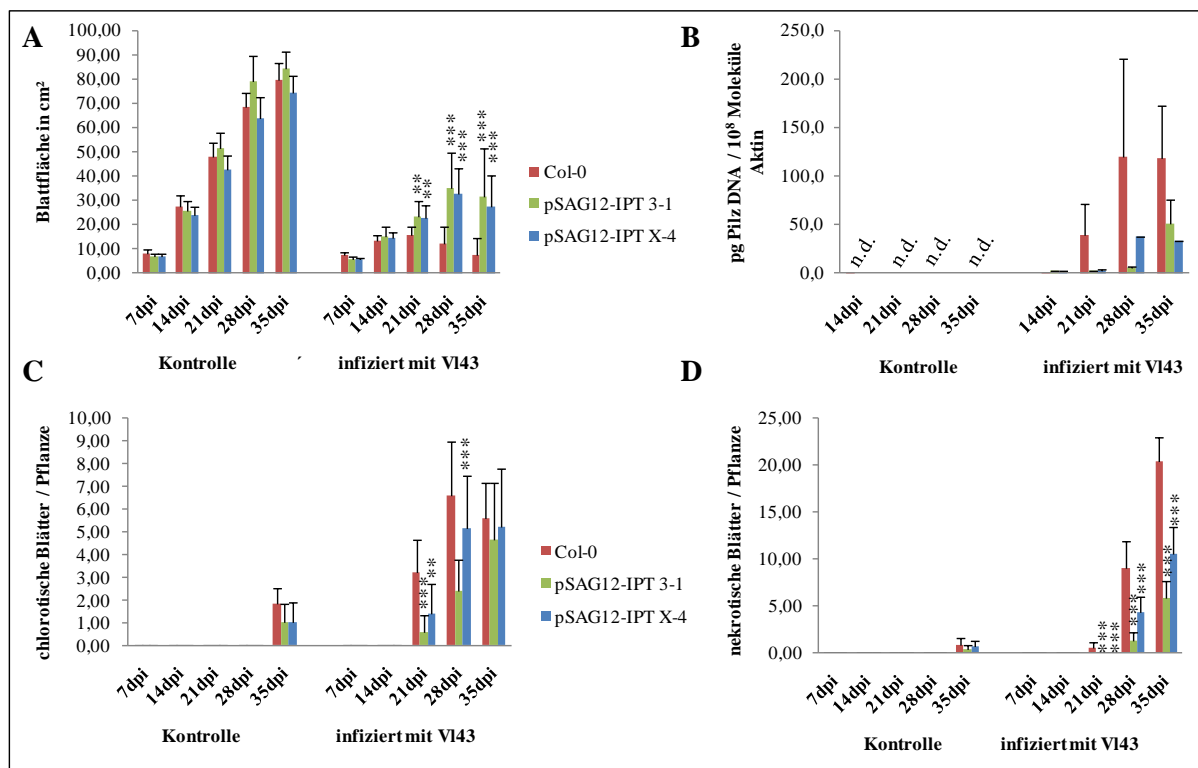


Abb. 51: Ergänzende Daten zu **Abb. 21** von Kontroll- und V143-infizierten *A. thaliana* Col-0 WT-Pflanzen und pSAG12:IPT transgenen Linien (im Zeitverlauf 7, 14, 21, 28 und 35 dpi) unter Kurztagbedingungen. (A) Vermessung der Blattfläche, (B) Bestimmung der pilzlichen DNA-Menge, (C) Bestimmung der chlorotischen, (D) der nekrotischen Blätter in Col-0, pSAG12:IPT 3-1 und pSAG12:IPT X-4, jeweils Kontrolle und V143-infiziert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte, mit allgemein n = 18 und (B) n = 9 (3*3 vereinte Probe) biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch zwei ($P \leq 0,01$) oder drei ($P \leq 0,001$) Sterne gekennzeichnet.

7.6 Expressionsanalysen von *VND1* - *VND5* nach *VI43*-Infektion

Die Expressionsprofile nach *VI43*-Infektion von *VND1* - *VND5* im wurden Zeitverlauf 7 - 28 dpi abgebildet (**Abb. 52**). Da *VND1* - *VND5* keinen Phänotyp durch Überexpression zeigten (Kubo *et al.*, 2005) und dementsprechend wahrscheinlich keine regulatorische Funktionen in der Xylembildung haben, werden sie hier extra betrachtet. Die Induktion ist zur infizierten Kontrolle normiert und das Probenmaterial stammt aus einem Kurztagversuch. Es ist möglich, die *VNDs* in zwei Gruppen zu unterteilen. Alle zeigten gemeinsam ab 14 dpi eine Transkripterhöhung, mit Ausnahme von *VND3*. In Gruppe eins befindet sich *VND1* und *VND2*, die beide sehr stark hochreguliert waren. *VND1* war maximal 50-fach und *VND2* ca. 100-fach 28 dpi induziert (**Abb. 52** A, B). In Gruppe zwei ließen sich *VND3* - *VND5* einordnen, die alle eine schwächere Steigerung der Transkriptmenge zeigten als Gruppe eins (**Abb. 52** C-E). Die Maximalinduktion war zum Zeitpunkt 28 dpi bei *VND4* mit ca. 19-fach zu finden (**Abb. 52** D).

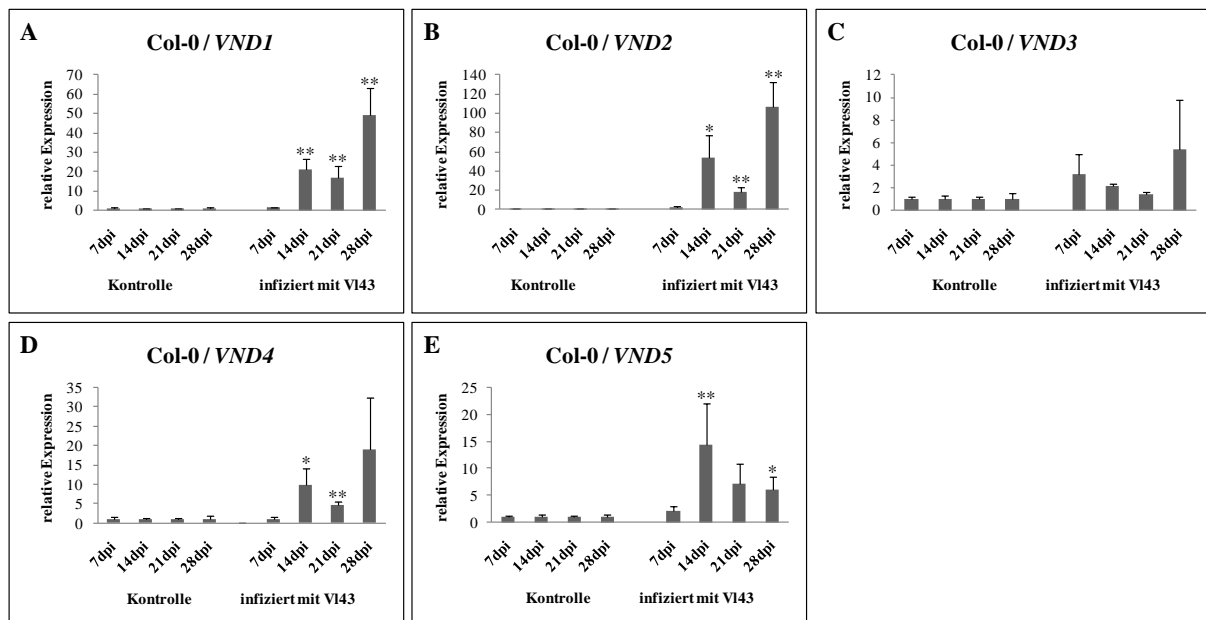


Abb. 52: Quantitative RT-PCR von *VI43*-infizierten und Kontrollpflanzen der folgenden *Vascular Related Nac Domain* (VND) Transkriptionsfaktoren: (A) *VND1*, (B) *VND2*, (C) *VND3*, (D) *VND4* und (E) *VND2* im Ökotyp *Col-0*. Im Zeitverlauf von 7, 14, 21 und 28 dpi wurden die Pflanzen geerntet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte von $n = 9$ Pflanzen (3*3 vereinte Proben) aus drei biologischen Wiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Pflanzen sind durch einen ($P \leq 0,05$) oder zwei ($P \leq 0,01$) Sterne gekennzeichnet.

7.7 Analysen von Pilzfaktoren auf Transdifferenzierungsaktivität

In den **Abb. 53 - Abb. 55** sind die Daten zu den Extrakten, Kulturmedien und dem Xylemsaft sowie AWF von *Brassica napus* dargestellt. Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse folgendermaßen darstellen: keine Behandlung induzierte Transdifferenzierung oder erhöhte die Transdifferenzierungsrate in der eingesetzten Zellsuspensionskulturen. Lediglich die Rate an Zelltod variierte. Die Versuche wurden von Dr. Arata Yoneda im Labor von Prof. Dr. Taka Demura (Yokohama Institute, Productivity Systems Research Group, Plant Science Center Plant Riken) durchgeführt.

Apoplastische Waschflüssigkeit / Xylemsaft *B. napus* (Drakkar) 21dpi

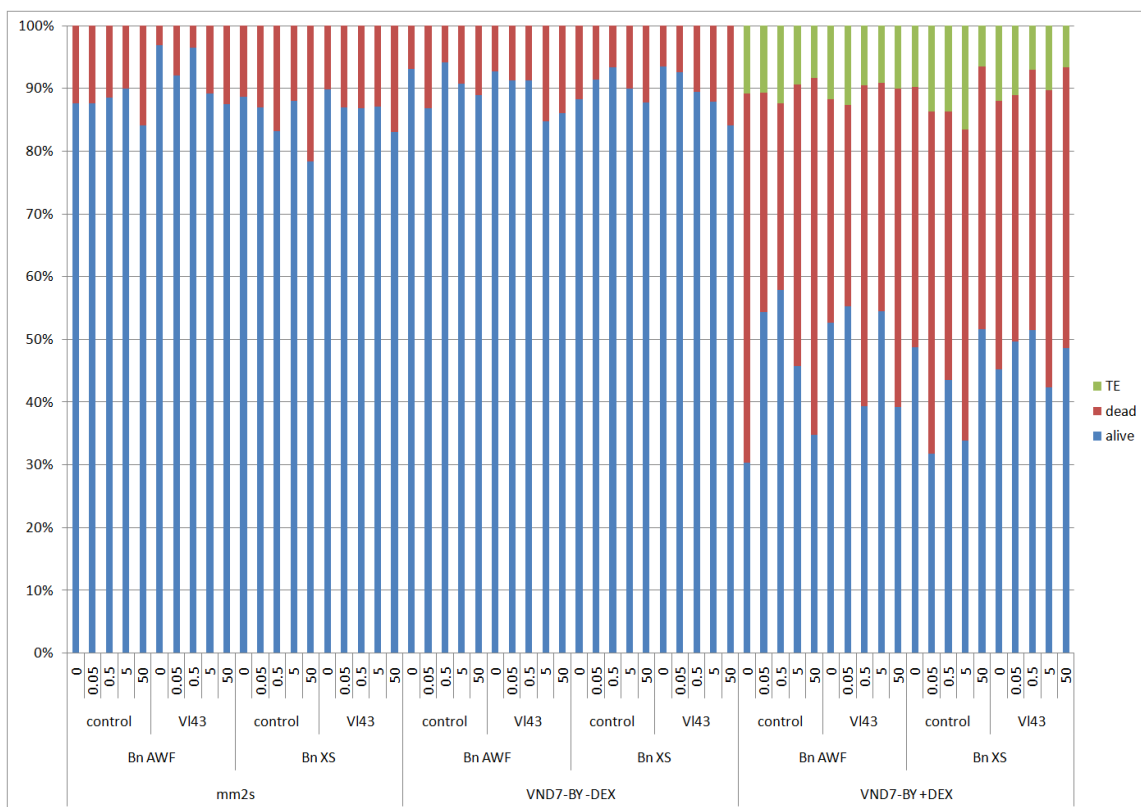


Abb. 53: Untersuchung von apoplastischer Waschflüssigkeit (AWF) / Xylemsaft (XS) von *B. napus* (Drakkar) Kontroll- und VI43-infizierten Pflanzen 21 dpi im Transdifferenzierungs-Testsystem der Gruppe Taka Demura (Durchgeführt von Dr. Arata Yoneda). Benutzt wurden mm2d-*Arabidopsis*-Suspensionszellen und Dexamethason induzierbare VND7-BY Tabaksuspensionszellen. Getestet wurden jeweils 0; 0,1; 1; 10 und 100 µl der AWF / XS und dabei wurde der prozentuale Anteil der transdifferenzierten, toten und überlebenden Zellen bestimmt. Die AWF wurde von der AG Polle zur Verfügung gestellt und der XS von der AG Feussner. Abkürzungen: mm2s = Arabidopsiszellkultur, VND7-BY = Tabakzellkultur (Dexamethason-induzierbar (Dex.))

Kulturüberstand verschiedener Medien

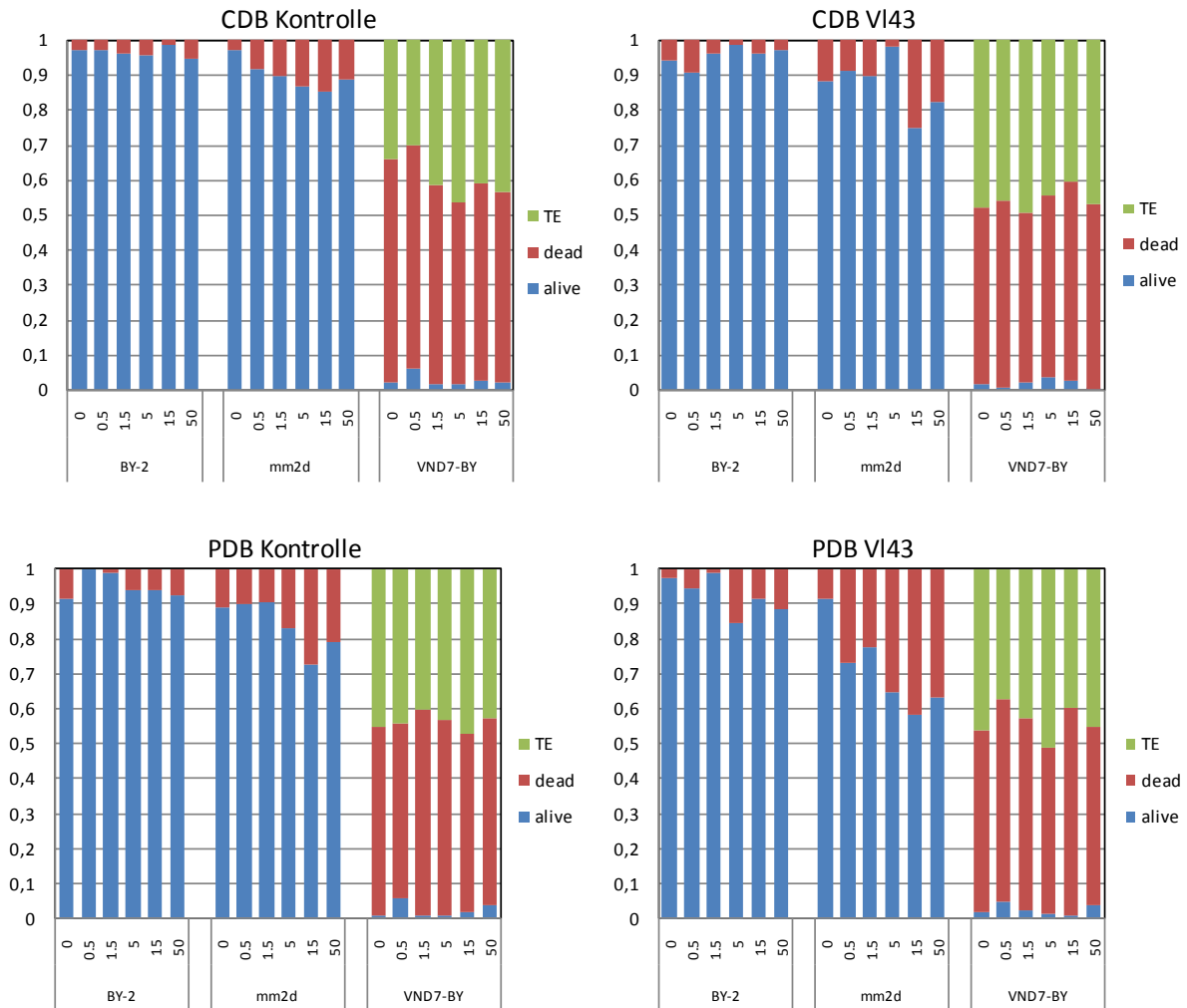


Abb. 54: Untersuchung von Kulturüberständen der Flüssigmedien *Potato Dextrose Broth* (PDB) / *Czapek Dox Broth* (CDB) im Transdifferenzierungs-Testsystem der Gruppe Taka Demura (Durchgeführt von Dr. Arata Joneda). Untersucht wurden jeweils Kontroll- und mit VI43-versetzte Überstände nach zweiwöchiger Inkubation. Benutzt wurden BY-2-Tabaksuspensionszellen, mm2d-*Arabidopsis*-Suspensionszellen und Dexamethason induzierbare VND7-BY-Tabaksuspensionszellen. Getestet wurden jeweils 0, 0.5, 1.5, 5, 15, und 50 µl der Überstände und dabei wurde der prozentuale Anteil (0-1) der transdifferenzierten, toten und überlebenden Zellen bestimmt.

Extrakte von Flüssigpilzkulturen

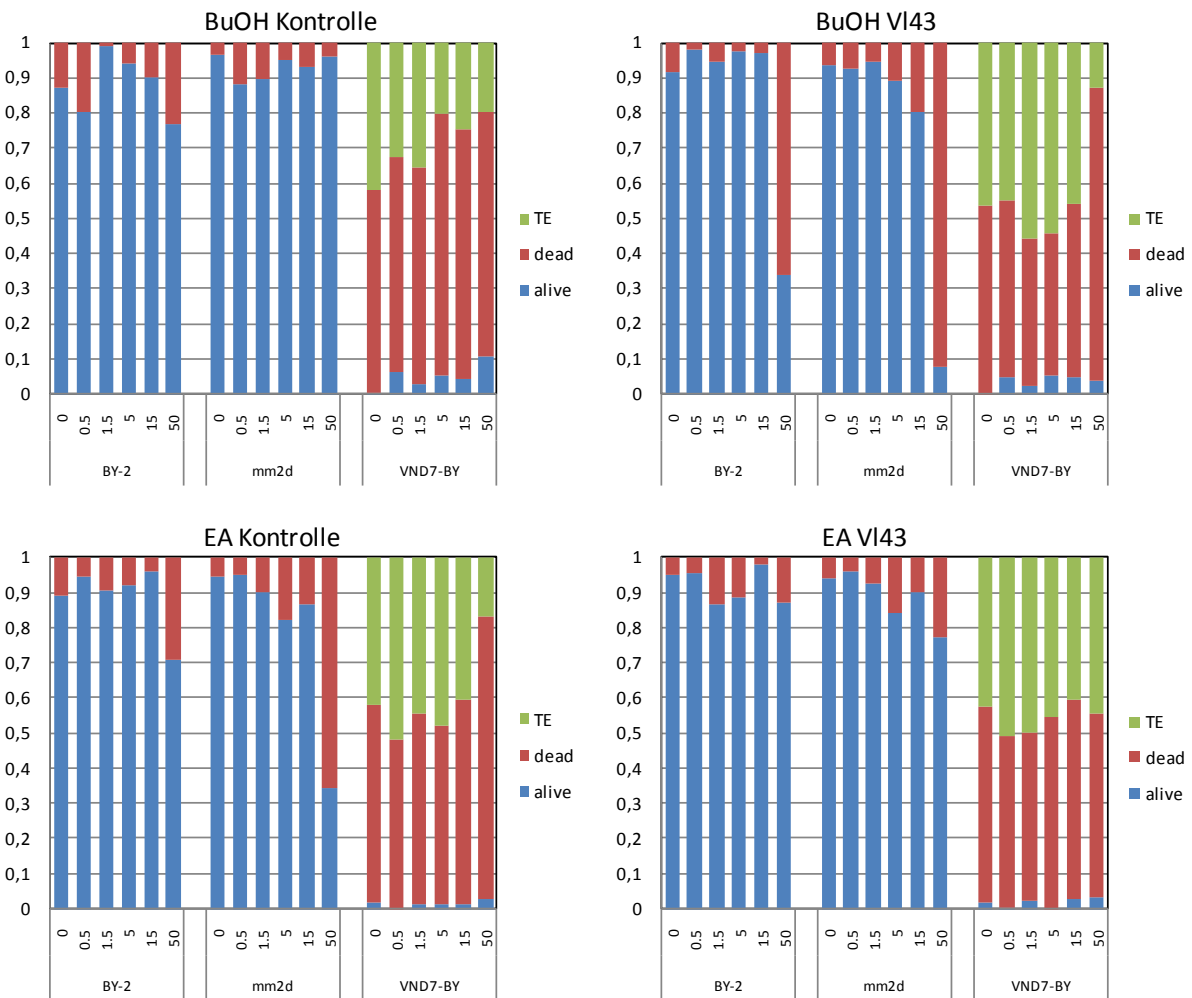


Abb. 55: Untersuchung von Butanol (BuOH)- / Ethylacetat (EA)-Extrakten von VI43-Flüssigkulturen im Transdifferenzierungs-Testsystem der Gruppe Taka Demura (Durchgeführt von Dr. Arata Joneda). Untersucht wurden jeweils Kontroll- und mit VI43-versetzte Extrakte der VI43-Flüssigkultur-Überstände nach vierwöchiger Inkubation. Benutzt wurden BY-2-Taksuspensionszellen, mm2d-*Arabidopsis*-Suspensionszellen und Dexamethason induzierbare VND7-BY-Tabaksuspensionszellen. Getestet wurden jeweils 0, 0.5, 1.5, 5, 15, und 50 μl der Überstände und dabei wurde der prozentuale Anteil (0-1) der transdifferenzierten, toten und überlebenden Zellen bestimmt. Die Extrakte wurden von der AG Karlovsky zur Verfügung gestellt.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der letzten 3 1/2 Jahre fachlich und privat auf dem Weg dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Dr. Thomas Teichmann, der mir überhaupt erst die Chance gegeben hat, diese Arbeit durchzuführen. Er hatte die ganzen Jahre über immer eine offene Tür und ein offenes Ohr für allerlei Probleme, die *Verticillium* so mit sich brachte und nahm sich immer die Zeit, um mit Rat und Tat das spannende Projekt voranzutreiben. Trotz einiger Startschwierigkeiten im ersten verfluchten Jahr, half mir seine optimistische und menschliche Art, meinen Weg zu finden und das Projekt zu dem zu machen, was es heute ist. Neben kritischen Diskussionen, produktiven Gesprächen und Ermahnungen, nicht die Kontrollen zu vergessen, gab er mir stets die Freiheit, Dinge auszuprobieren, die mir durch den Kopf schwirrten. Vielen Dank für alles auf diesem steinigen Weg, der uns durch viele Tiefs aber auch besondere Hochs, zum Ziel führte.

Mein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Volker Lipka, der unsere kleine Gruppe mit offenen Armen bei seinem Antritt in Göttingen herzlich übernommen hat und mir die Möglichkeit gab, in seiner Gruppe diese Arbeit anzufertigen. Auch für die konstruktive Kritik und Diskussionsbereitschaft zu jeder Zeit, die meinem Projekt zugutekamen, bin ich ihm sehr dankbar. Außerdem ist die positive Bereitschaft zu erwähnen, die er dem einen oder anderen Vortrag von mir widmete, um sie für Tagungen zu perfektionieren.

Danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. Gatz, die sich bereit erklärte, das Korreferat meiner Arbeit zu übernehmen und meinen Fortschritt wohlwollend beurteilte und mir mit zahlreichen Ideen und Anregungen geholfen hat. Des Weiteren muss ihr stetiges Engagement, die Forschergruppe zu leiten und voranzubringen, auch erwähnt werden, das mit einer gelungenen Tagung in Göttingen endete.

Bei Prof. Dr. Gerhard Braus sowie Prof. Dr. Andrea Polle, Prof. Dr. Volker Lipka und Prof. Dr. Jan Schirawski bedanke ich mich für die Bereitschaft, meine Prüfungskommission zu bilden.

Besonderer Dank geht noch einmal an Thomas Teichmann, Volker Lipka und Nicole Frohn für die intensive Korrektur dieser Arbeit.

Ein Dank auch an alle Mitglieder der Forschergruppe für die gute Kooperation und den regen Diskussionen über *Verticillium*. Besonders sei hier die gute Zusammenarbeit mit Van Tuan Tran, Susanna Braus-Stromeyer und Prof. Dr. Gerhard Braus erwähnt, die für uns *Verticillium* zum Leuchten brachten. Auch möchte ich besonders Christine Drübert und Frau Prof. Dr. Andrea Polle für die gute Kooperation in Bezug auf histologische Untersuchungen, der Produktion von apoplastischer Waschflüssigkeit und der Planung des Transportversuchs danken. Dabei sind nicht die technischen Assistentinnen Monika Franke Klein und Merle Fastenrath zu vergessen, die Teile der Kooperationsarbeiten durchführten. Und noch einen Dank an Mareike Possienke, die mich in die Geheimnisse der Xylemsafernte einweihte und so manchen Milliliter mit mir erntete.

Allen Mitarbeitern unserer Abteilung: Christian Löpfke, Rene Fuchs, Elena Petutschnig, Marnie Schwarz, Marcel Wiermer, Magdalena Plath, Charlotte Roth, Anja Auspurg und ehemaligen Christine Klapprodt und Juliane Horlacher sei gedankt für die angenehme Arbeitsatmosphäre, den netten Runden beim Mittag, der ständigen Hilfsbereitschaft und den vielen kleinen innerbetrieblichen Feiern. Mein weiterer Dank geht an unsere technischen Assistentinnen Gaby Schaueremann, Sabine Wolfarth und Melanie Klenke, die mir immer mal wieder hilfreich zur Seite standen und sich dem Chaos im Labor immer tapfer entgegenstellen.

Meinen Bachelor- / Master-Studenten Yana Pioch, Sören Rindfleisch und Karin Thole sei hiermit auch gedankt, die sich voller Begeisterung *Verticillium* stellten.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Gatz für die zahlreichen netten Gespräche. Besonders seien dabei Anjali und Sonja zu nennen, die meinen Weg mit *Verticillium* teilen und immer erheiternde Worte parat hatten. Auch nicht zu vergessen sei Hella Tappe, die mir den Umgang mit *Verticillium* beibrachte.

Des Weiteren danke ich: dem ganzen LARI-Team, vor allem Thomas Klein und Gabriele Lehmann für ihre immer hilfsbereite Art rund um den *Verticillium* Transportversuch,....

Prof. Taka Demura für die Bereitstellung diverser transgener Linien und seinem Mitarbeiter Dr. Arata Yoneda, der zahlreiche Stunden damit verbracht hat, Extrakte und Lösungen für uns auf Transdifferenzierungsaktivität zu testen und.....

Prof. Miroslav Strnad für die Cytokininvermessungen und besonders Lukáš Spíchal für die Bereitstellung des Cytokinin-Inhibitors.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Angelika und Hermann Reusche bedanken, die mich auf meinem Lebensweg und in allen meinen Entscheidungen immer unterstützten und mir überhaupt erst meinen beruflichen Werdegang ermöglichten. Dafür danke ich euch beiden aus ganzem Herzen.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Nicole für ihre Unterstützung, Geduld und ihrem Verständnis während meiner gesamten Studienzzeit. Sie war immer für mich da, auch wenn mich *Verticillium* mal wieder zum Wahnsinn trieb, weil er sich nicht so verhielt, wie er sollte. Danke für die Unterstützung in meinen stressigen Phasen und für Opferung von so mancher Stunde deines Lebens beim Korrekturlesen. Danke mein Schnuff!

Lebenslauf

Michael Reusche

Diplom-Biologe

Geboren am 27.06.1982 in Peine

1988 - 1992	Grundschule Oberg
1992 - 1994	Orientierungsstufe Groß Ilsede
1994 - 2001	Gymnasium Groß Ilsede
2001	Abitur in den Fächern: Mathematik, Biologie, Deutsch, Erdkunde
2001 - 2002	Zivildienst: Krankenhaus Peine
2002 - 2003	Berufsausbildung zum Steuerfachangestellten
WS 2003 - 2008	Studium im Fachbereich Biologie an der TU-Braunschweig
2005	Diplom-Vorprüfung
2007	mündliche Diplomprüfung in den Fächern: Hf. Mikrobiologie, 1. Nf. Botanik, 2. Nf. Zellbiologie
2007 - 2008	Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R.R. Mendel Thema: „Lokalisierung der Moco-Biosynthese mittels Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) und Immunogold-Technik“
2008 - 2011	Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Fachbereich Biologie Thema: „Analyse der <i>Verticillium longisporum</i> induzierten Seneszenz und Transdifferenzierung in <i>Arabidopsis thaliana</i> “